

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E BIOMEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E  
FISIOPATOLOGIA

FÁBIO AUGUSTO KURSCHIEDT

Vírus Zika em sêmen: elucidação da história natural e sua influência na saúde  
reprodutiva masculina

Maringá  
2021

FÁBIO AUGUSTO KURCHEDIT

Vírus Zika em sêmen: elucidação da história natural e sua influência na saúde  
reprodutiva masculina

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biociências e Fisiopatologia.

Área de concentração: Biociências e Fisiopatologia Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Márcia Edilaine Lopes Consolaro  
Co-Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Raquel Pantarotto Souza Padovan

Maringá  
2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

K96v

Kurscheidt, Fábio Augusto

Vírus Zika em sêmen: elucidação da história natural e sua influência na saúde reprodutiva masculina / Fábio Augusto Kurscheidt. -- Maringá, PR, 2021.  
113 f.: il. color., figs., tabs., maps.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Edilaine Lopes Consolaro.

Coorientadora: Profa. Dra. Raquel Pantarotto Souza Padovan.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia (PBF), 2021.

1. Zika vírus - Fertilidade. 2. Sêmen. 3. Carga viral. 4. Trato genital masculino. I. Consolaro, Márcia Edilaine Lopes, orient. II. Padovan, Raquel Pantarotto Souza, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina. Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia (PBF). IV. Título.

CDD 23.ed. 615

# FOLHA DE APROVAÇÃO

FÁBIO AUGUSTO KURSCHEIDT

Vírus Zika em sêmen: elucidação da história natural e sua influência na saúde reprodutiva masculina

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biociências e Fisiopatologia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

## COMISSÃO JULGADORA

Prof.<sup>a</sup> Dra. Márcia Edilaine Lopes Consolaro  
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof.<sup>a</sup> Dra. Fabrícia Gimenes  
Universidade Estadual de Maringá

Prof.<sup>a</sup> Dra. Cristiane Suemi Shinobu Mesquita  
Universidade Estadual de Maringá

Prof.<sup>a</sup> Dra. Vânia Ramos Sela da Silva  
Universidade Estadual de Maringá

Prof.<sup>a</sup> Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler  
Universidade de São Paulo

Aprovada em: 24/02/2021

Local de defesa: De forma remota

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, a minha esposa Raquel, aos meus filhos Nicolas e Valentina e a minha mãe Albarina.

## AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus pelas oportunidades e pela sua presença inovadora; pela sabedoria e inspiração na realização deste trabalho.

A minha esposa Raquel, companheira, amiga nos momentos difíceis e um porto seguro para os meus medos e desafios; por ser compreensiva pelos períodos em que estive ausente. O seu carinho, amor e confiança no meu trabalho foi muito importante.

Aos meus filhos Nicolas e Valentina que me inspiram a ser uma pessoa melhor a cada dia.

A minha mãe Albarina, guerreira, que apesar das dificuldades sempre me apoiou a estudar e crescer como pessoa e profissional.

A minha irmã Luciane e sobrinha Caroline que aclamam tudo que faço e sempre me engrandecem com seus elogios.

A minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dra. Márcia E. L. Consolaro, que me orientou todos esses anos, desde o mestrado, sempre dando seu melhor, acreditando no meu potencial, dando oportunidades e me fazendo crescer cientificamente. Só tenho a agradecer por todos os momentos, pela sua paciência e confiança.

A minha co-orientadora Prof.<sup>a</sup> Dra. Raquel S. P. Padovan que foi um suporte importante em todas as etapas do doutorado, desde a elaboração do projeto, resumo para simpósio e realização dos PCRs em minhas amostras de sêmen. O seu *feedback* preciso, inteligente e ético deixou marcas importantes no meu trabalho.

Aos pacientes que concordaram em participar desta pesquisa. Que os resultados possam contribuir para o diagnóstico precoce e tratamento das suas doenças.

Aos professores do programa PBF que compartilharam seus conhecimentos, o meu muito obrigado.

Ao meu amigo Dr. Edilson Damke, que foi meu suporte científico e técnico durante todo meu percurso na UEM. Agradeço por sua paciência e disponibilidade para sempre ajudar em minhas dúvidas.

Aos meus amigos do mestrado e doutorado do PBF, onde foram compreensivos em minhas solicitações, bem como prestativos em todos os momentos que necessitei.

## EPÍGRAFE

A mente que se abre para alguma  
coisa nova, nunca mais será a  
mesma.

(Albert Einstein)

A persistência é o caminho do  
êxito.

(Charles Chaplin)



## Vírus Zika em sêmen: elucidação da história natural e sua influência na saúde reprodutiva masculina

### RESUMO

Zika vírus (ZIKV) é um *flavivírus* transmitido predominantemente pela picada do mosquito *Aedes aegypti* infectado, com a maioria dos casos assintomáticos. De 2007 a 2019 estima-se que mais de 80 países foram acometidos pela epidemia causada por esse vírus, que pode ser transmitido não somente por vetores artrópodes, como também por via sexual. Esse fato eleva os riscos epidemiológicos associados à infecção por ZIKV, devido à suscetibilidade de novas rotas de disseminação viral. A transmissão materno-fetal do ZIKV foi documentada durante a gravidez, existindo relação com aborto, microcefalia e outras desordens neurológicas. O ZIKV pode infectar o sistema reprodutor masculino (SRM) e persistir em células somáticas e germinativas testiculares, bem como em espermatozóides, levando à morte celular e atrofia testicular. Foi relatado que o ZIKV pode ser detectado no sêmen dos homens por mais de 300 dias após o surgimento dos sintomas da infecção e que o vírus possui capacidade de se replicar no SRM, sendo as células de Sertoli um dos seus principais alvos. A necessidade de prevenir a transmissão do ZIKV em clínicas de fertilidade é uma preocupação adicional, pois pode estar presente até mesmo no sêmen de doadores assintomáticos e, portanto, devem ser considerados métodos para detectar o vírus e prevenir os potenciais efeitos prejudiciais do ZIKV sobre os indivíduos e filhos. Uma vacina contra o ZIKV pode ser uma forma importante de proteger a população da infecção e ser um passo no controle da doença. Além disso, a vacinação poderia proteger contra danos ao SRM e, conseqüentemente, evitar futuros problemas de fertilidade. Compreender os mecanismos associados à infecção por ZIKV pode ser uma chave para o desenvolvimento de novos tratamentos, bem como da elucidação do seu impacto na fertilidade masculina.

**Palavras-chave:** Zika vírus. Sêmen. Carga viral. Trato genital masculino. Fertilidade.

## Zika virus in semen: elucidation of natural history and its influence on male reproductive health

### ***ABSTRACT***

Zika virus (ZIKV) is a flavivirus transmitted predominantly by the bite of the infected *Aedes aegypti* mosquito, with the majority of cases asymptomatic. From 2007 to 2019 it is estimated that more than 80 countries were affected by the epidemic caused by this virus, which can be transmitted not only by arthropod vectors, but also sexually. This fact raises the epidemiological risks associated with ZIKV infection, due to the susceptibility of new routes of viral dissemination. The maternal-fetal transmission of ZIKV was documented during pregnancy, with a relationship with abortion, microcephaly and other neurological disorders. ZIKV can infect the male reproductive system (MRS) and persist in somatic and germ testicular cells, as well as in sperm, leading to cell death and testicular atrophy. It has been reported that ZIKV can be detected in men's semen for more than 300 days after the onset of infection symptoms and that the virus has the ability to replicate in MRS, with Sertoli cells being one of its main targets. The need to prevent transmission of ZIKV in fertility clinics is an additional concern, as it may be present even in the semen of asymptomatic donors and, therefore, methods to detect the virus and prevent the potential harmful effects of ZIKV on individuals and children. A ZIKV vaccine can be an important way to protect the population from infection and be a step in controlling the disease. In addition, vaccination could protect against damage to the MRS and, consequently, prevent future fertility problems. Understanding the mechanisms associated with ZIKV infection can be a key to the development of new treatments, as well as the elucidation of their impact on male fertility.

***Keywords:*** Zika virus. Semen. Viral charge. Male genital tract. Fertility.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Mapa de transmissão comprovada do ZIKV no mundo até janeiro 2016. ....	2
<b>Figura 2</b> - Mapa mundial de áreas de risco de infecção pelo ZIKV, até julho de 2019. ....	19
<b>Figura 3</b> - Curva epidêmica dos casos prováveis de ZIKV, por semanas epidemiológicas de início de sintomas, Brasil, 2019 e 2020.....	2
<b>Figura 4</b> - Estrutura da partícula de ZIKV.....	26
<b>Figura 5</b> - Ciclo replicativo do ZIKV .....	27
<b>Figura 6</b> - Análise filogenética do ZIKV com base no genoma completo das linhagens Africana e Asiática. ....	28
<b>Figura 7</b> - O mosquito <i>Aedes</i> introduzindo o vírus ZIKV no hospedeiro .....	31
<b>Figura 8</b> - Coinfecções por arbovírus ocorrem como resultado de infecção simultânea ou sequencial .....	32
<b>Figura 9</b> - Sintomas da infecção por ZIKV.....	33
<b>Figura 10</b> - Ilustração representativa da bainha de mielina normal e danificada na SGB.....	34
<b>Figura 11</b> - Sintomas típicos da SGB .....	34
<b>Figura 12</b> - Estrutura conceitual de Síndrome Congênita pelo ZIKV .....	35
<b>Figura 13</b> - Criança com microcefalia moderada ou grave associada a infecção pelo ZIKV. ....	36
<b>Figura 14</b> - Ciclo de transmissão do ZIKV .....	37
<b>Figura 15</b> - Ovos de <i>Aedes Aegypti</i> .....	38
<b>Figura 16</b> - Transmissão vertical e doença congênita induzida pelo ZIKV. ....	39
<b>Figura 17</b> - Rotas sugerida pelo ZIKAV para superar a barreira placentária.....	40
<b>Figura 18</b> - Células de Sertoli e de Leydig: corte histológico testículo.....	44
<b>Figura 19</b> - Barreira hemato-testicular: corte histológico do túbulo seminífero. ....	46
<b>Figura 20</b> - Potenciais reservatórios de ZIKV no trato reprodutor masculino .....	47
<b>Figura 21</b> - Diagnóstico do ZIKV de acordo com o tempo de evolução dos sintomas: método molecular. ....	49
<b>Figura 22</b> - Diagnóstico do ZIKV de acordo com o tempo de evolução dos sintomas: método sorológico. ....	50

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> - Casos confirmados de ZIKV por ano de notificação: 2015 até 2020, Brasil .....	21
<b>Gráfico 2</b> - Número de casos confirmados de SCZ por ano de notificação .....	23
<b>Gráfico 3</b> - Número de óbitos por DENV, CHIKV e ZIKV no período de 2016 a 2020, Brasil .....	25

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Distribuição dos óbitos pelo ZIKV, por faixa etária, Brasil - 2016 a 2020, Brasil .....	25
<b>Tabela 2</b> - Tabela comparativa das linhagens Africana e Asiática do ZIKV .....	29
<b>Tabela 3</b> - Frequência dos principais sinais e sintomas ocasionados pela infecção pelos vírus da Dengue, Zika e Chikungunya .....	48
<b>Tabela 4</b> - Diagnóstico diferencial para ZIKV .....	48
<b>Tabela 5</b> - Interpretação dos resultados dos testes moleculares para o diagnóstico da DENV e ZIKV para pacientes com doença clinicamente compatível e risco de infecção por ambos os vírus.....	55
<b>Tabela 6</b> - Interpretação dos resultados dos testes de sorologia IgM e PRNT para o diagnóstico da DENV e ZIKV para pacientes com doença clinicamente compatível e risco de infecção por ambos os vírus .....	55
<b>Tabela 7</b> - Lista de medicamentos com potencial para ação anti-ZIKV .....	57
<b>Tabela 8</b> - Plataformas de vacinas para infecção do ZIKV .....	59
<b>Tabela 9</b> - <i>Status</i> de desenvolvimento de vacina contra o ZIKV .....	62

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1</b> - Situação epidemiológica de casos prováveis de infecção pelo ZIKV notificados entre dezembro de 2019 e dezembro de 2020, por região e Estado com maior número de casos notificados .....	22
<b>Esquema 2</b> - Situação epidemiológica da Síndrome Congênita associada ao ZIKV de 2015 a 2020, por região e estado com maior número de casos confirmados .....	23
<b>Esquema 3</b> - Números de casos confirmados de SCZ em 2020, por município. ....	24
<b>Esquema 4</b> - Vias de transmissão do ZIKV.....	36
<b>Esquema 5</b> - Recomendações para testes de ZIKV para mulheres grávidas sintomáticas que fizeram sexo com parceiro que vive ou viajou para áreas de risco para ZIKV.....	51
<b>Esquema 6</b> - Recomendações para testes de DENV e ZIKV para mulheres grávidas sintomáticas com viagem recente para áreas de transmissão ativa da DENV e risco para ZIKV.....	52
<b>Esquema 7</b> - Recomendações de testes de ZIKV para mulheres grávidas têm um feto com achados de ultrassom pré-natal consistentes com SCZ que vivem ou viajaram para áreas com risco de ZIKA durante a gravidez.....	53
<b>Esquema 8</b> - Recomendações para testes de DENV e ZIKV para pessoas não grávidas com uma doença clinicamente compatível e risco de infecção por ambos os vírus.....	54

Tese elaborada e formatada conforme as  
normas das publicações científicas:

*Nature Reviews Urology*

Disponível em:

<https://www.nature.com/nruol/for-authors>

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I</b> .....	18
1. HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO ZIKA VÍRUS .....	18
2. ZIKA VÍRUS.....	26
2.1. Estrutura viral.....	26
2.2. Ciclo viral.....	27
2.3. Linhagens virais .....	28
2.4. Nova linhagem no Brasil .....	30
3. PATOGÊNESE DO ZIKV .....	30
3.1. Infecção.....	30
3.2. Coinfecção com outros arbovírus .....	31
4. QUADROS CLÍNICOS .....	32
4.1. Geral.....	32
4.2. Síndrome de Guillain-Barré.....	33
4.3. Síndromes Congênitas pelo ZIKV .....	35
4.3.1. Microcefalia .....	35
5. FORMAS DE TRANSMISSÃO .....	36
5.1. Vetorial .....	36
5.1.1. Infectividade do mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	37
5.2. Materno-fetal.....	38
5.2.1. Incidência .....	38
5.2.2. Mecanismo de ação.....	39
5.3. Aleitamento materno.....	41
5.4. Saliva.....	41
5.5. Transfusão de sangue .....	41
5.6. Sexual.....	42
5.6.1. Evidências iniciais de transmissão sexual.....	42
5.6.2. Tempo de permanência do ZIKV nos fluidos genitais .....	43
6. ZIKV NO TRATO REPRODUTOR MASCULINO .....	44
6.1. <i>Locus</i> de infecção por ZIKV .....	44
6.2. Barreira hemato-testicular e ZIKV .....	45
7. DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL DO ZIKV .....	47
7.1. Diagnóstico clínico .....	47



7.2. Diagnóstico laboratorial.....	49
7.2.1. Método direto.....	49
7.2.2. Métodos indiretos.....	50
7.2.3. Recomendações internacionais .....	51
8. ZIKA VÍRUS – TRATAMENTO E VACINA .....	56
8.1. Tratamento .....	56
8.2. Vacina .....	57
9. JUSTIFICATIVA .....	63
10. OBJETIVOS .....	64
10.1 Geral.....	64
10.2 Específicos .....	64
11. REFERÊNCIAS .....	65
<b>CAPÍTULO II</b> .....	79
1.Artigo: <i>Persistence and clinical relevance of Zika virus in the male genital tract</i> .....	80
2.Experimentação científica .....	99
2.1 Objetivos .....	99
2.2 Metodologia.....	99
2.2.1 Coleta de amostras de sêmen.....	101
2.2.2.Extração de RNA .....	103
2.2.3 Detecção do RNA do ZIKV pela técnica de qRT-PCR .....	103
2.2.4 Resultados obtidos.....	104
<b>CAPÍTULO III</b> .....	106
CONCLUSÕES .....	106
PERSPECTIVAS FUTURAS .....	108
ANEXO 1 .....	109
<i>Guidelines for authors of review articles</i> .....	110

## CAPÍTULO I

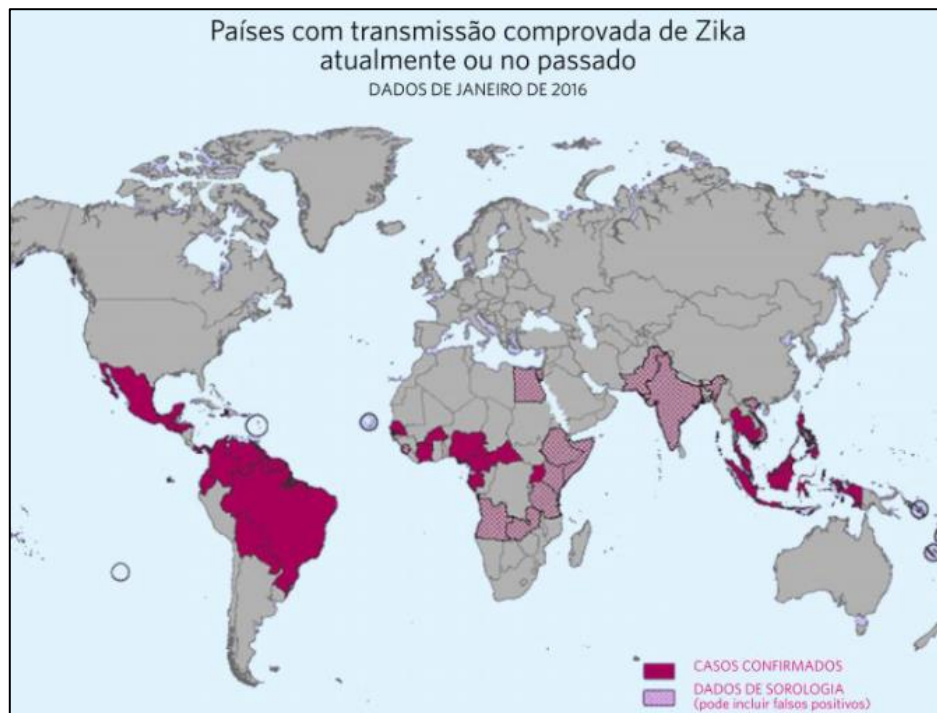
### 1. HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA DA INFEÇÃO PELO ZIKA VÍRUS

O Zika vírus (ZIKV) é um arbovírus (*arthropod borne virus*) do gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, transmitido principalmente por vetores artrópodes, através da picada das fêmeas dos mosquitos do gênero *Aedes*, predominantemente pelo *Aedes aegypti*. O ZIKV foi isolado pela primeira vez em macacos *Rhesus*, no ano de 1947 na floresta Zika, em Uganda, país da África Central, onde era conhecido como um patógeno zoonótico. O primeiro caso em humano foi registrado em 1952 na Nigéria. Posteriormente, disseminou-se para a Ásia na década de 1960<sup>(1)</sup>. O primeiro grande surto da doença causado pela infecção pelo ZIKV foi relatado na Ilha de Yap em 2007, na Micronésia, onde infectou cerca de 70% da população, com duração de três meses, não havendo registro de hospitalizações nem de óbitos relacionados à doença <sup>(2)</sup>.

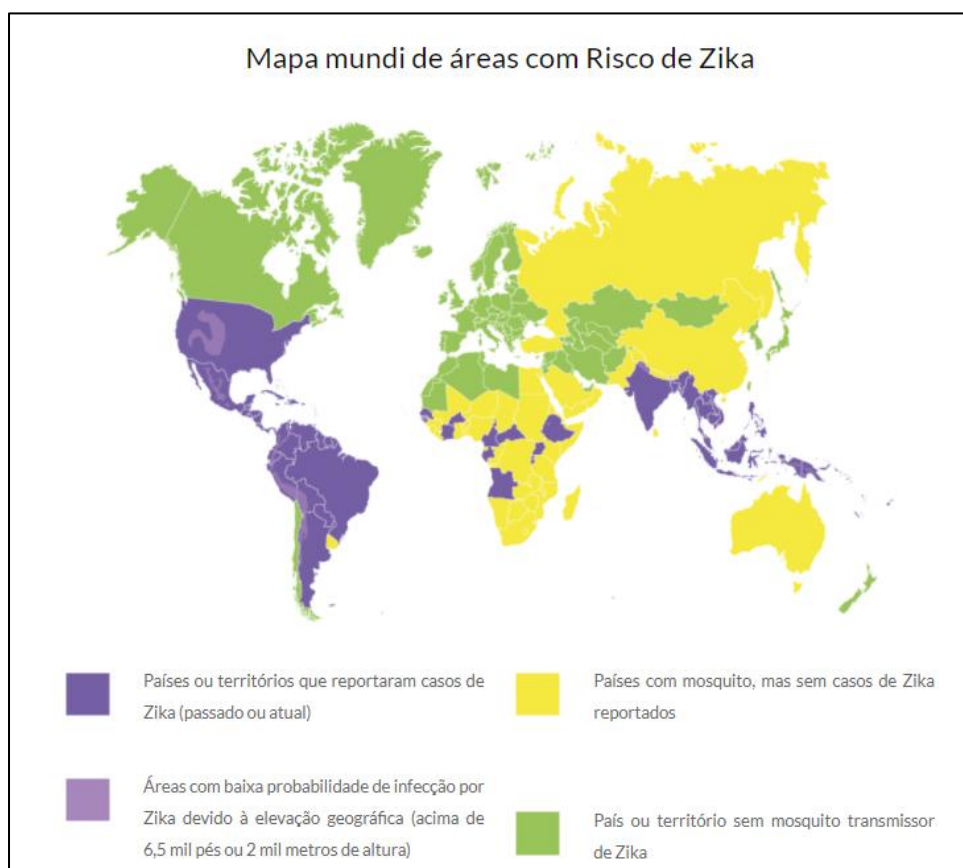
Em 2013 ocorreu uma epidemia na Polinésia Francesa (composto por 67 ilhas distribuídas em cinco arquipélagos, que na época possuía aproximadamente 270 mil habitantes), com uma estimativa de 30.000 infecções sintomáticas, onde foi observado um aumento do número de casos de Síndrome de Guillain-Barré (SGB). Contudo, a suspeita mais forte era que a SGB estivesse associada à febre Chikungunya (CHIKV) que também ocorria naquele momento. Também houve o relato de dois casos de transmissão perinatal do ZIKV de mães para recém-nascidos, sem consequências importantes <sup>(3)</sup>.

Posteriormente, o vírus começou a se espalhar por todo o hemisfério ocidental, juntamente com outros arbovírus como Dengue (DENV) e CHIKV, começando um surto no Brasil em 2014, sendo que mais de 48 países nas Américas foram afetados <sup>(4)</sup> (Figura 1).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), até julho de 2019 um total de 87 países e territórios apresentavam evidências de transmissão autóctone ou vetorial do ZIKV, distribuídos em quatro regiões: África, Américas, Sudeste Asiático e Região do Pacífico Ocidental. Nas Américas, a transmissão vetorial do ZIKV foi encontrada em todos os países, exceto no Chile, Uruguai e Canadá <sup>(5, 6)</sup> (Figura 2).



**Figura 1** - Mapa de transmissão comprovada do ZIKV no mundo até janeiro 2016. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/images/stories/SalaZika/atualizacao%20033.pdf?ua=1> <sup>(4)</sup>



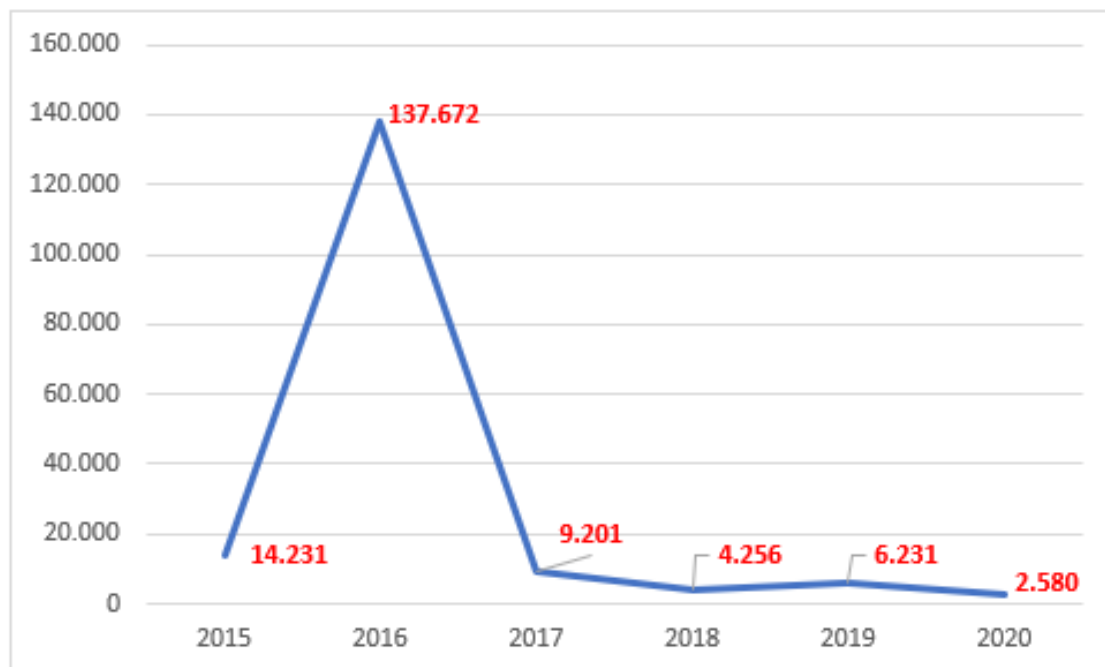
**Figura 2** - Mapa mundial de áreas de risco de infecção pelo ZIKV, até julho de 2019. Disponível em: <https://www.esquerda.net/en/artigo/zika-uma-infografia/41081> <sup>(7)</sup>

Inicialmente, acreditou-se que a introdução do ZIKV no Brasil havia ocorrido em 2014, possivelmente durante a Copa do Mundo de Futebol. Entretanto, verificou-se que pode ter ocorrido um ano antes, entre maio e dezembro de 2013, período coincidente com a realização da Copa das Confederações, ocorrida entre julho e agosto de 2013. Em menos de um ano após sua introdução, o ZIKV se espalhou por todas as regiões do Brasil, embora com distribuição desigual entre essas, sendo maior o número de casos nas regiões Nordeste e Sudeste. A doença passou a exibir transmissão continuada em grande parte do território brasileiro. A sua circulação iniciada no Nordeste pode ter passado despercebida devido ao fato de que maioria das infecções é assintomática ou apresenta sintomas leves, além da circulação concomitante de outros arbovírus como a DENV<sup>(8)</sup>.

Em outubro de 2015, a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS) foi notificada pela Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco sobre o aumento do número de casos de microcefalia no estado. Em novembro de 2015, foi declarada “Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional” (ESPIN) devido ao padrão atípico de ocorrência de microcefalia no Brasil, sendo encerrado em maio de 2017. A SVS/MS lançou o primeiro boletim epidemiológico sobre microcefalia na terceira semana de novembro de 2015, sendo que neste mesmo mês, pesquisadores do Instituto Evandro Chagas (IEC), da SVS, isolaram o ZIKV no cérebro de um recém-nascido com microcefalia que faleceu. Com esse achado, o Ministério da Saúde (MS) declarou comprovada a implicação do ZIKV na ocorrência do surto de microcefalia. A partir daí foi elaborado pelo MS o Plano Nacional de Enfrentamento à Microcefalia, que foi lançado em 5 de dezembro de 2015, onde foi dividido em três eixos de ação: a) mobilização e combate ao mosquito; b) atendimento às pessoas; c) e desenvolvimento tecnológico, educação e pesquisa<sup>(8,9)</sup>.

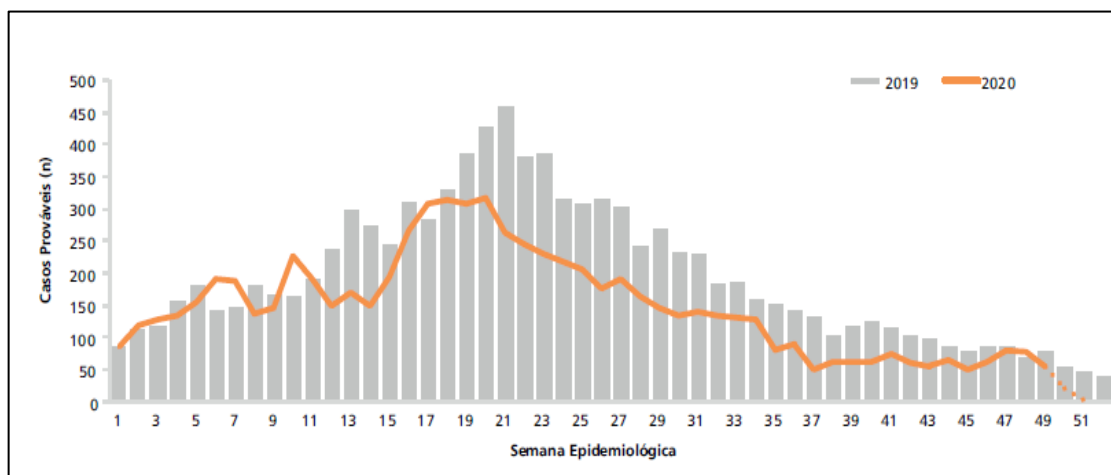
Em fevereiro de 2016, a OMS declarou “Emergência em Saúde Pública de Importância Internacional” (ESPII), após pronunciamento da Diretora Geral da OMS, Margaret Chan, onde reconheceu a gravidade da ameaça à saúde associada à contínua disseminação do ZIKV e sua relação com gravidez e microcefalia, na América Latina e no Caribe, sendo necessário a tomada de ações urgentes para investigar e entender melhor essa relação. O ESPII foi encerrado em novembro de 2016<sup>(8,9)</sup>.

Entre o período de 2015 a 2020, houve no Brasil 174.171 casos confirmados de ZIKV, tendo seu maior pico em 2016 com 137.672 casos<sup>(10)</sup> (Gráfico 1).



**Gráfico 1** - Casos confirmados de ZIKV por ano de notificação: 2015 até 2020 no Brasil. Fonte: DataSUS. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/zikabr.def> <sup>(10)</sup>

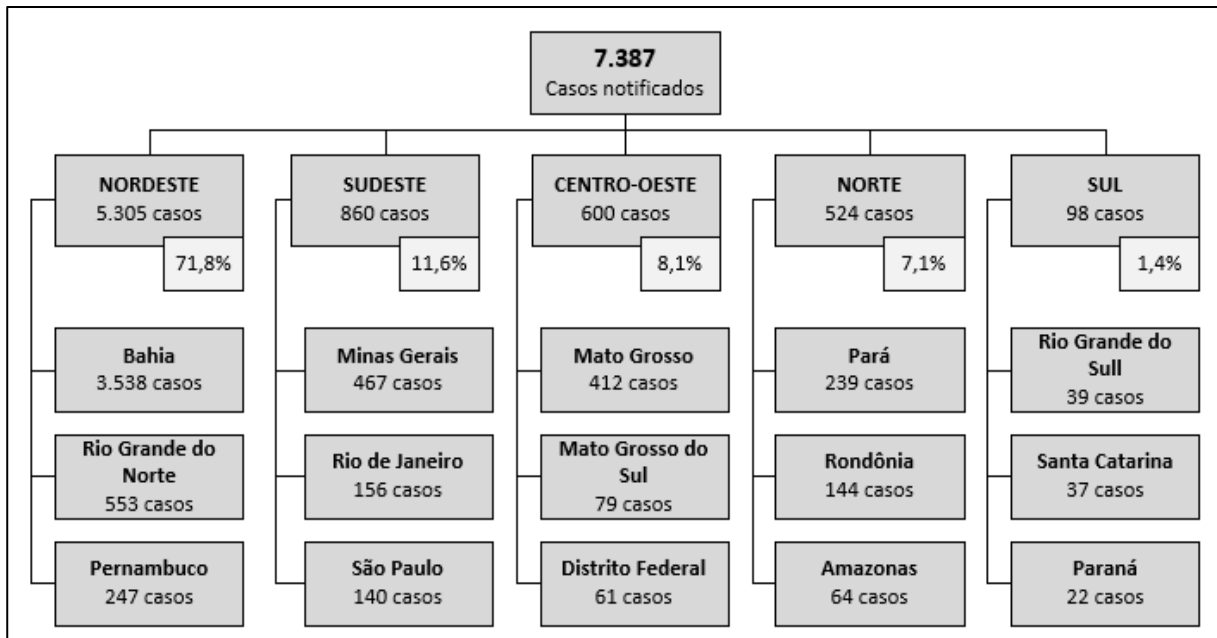
No período de dezembro de 2019 a dezembro de 2020 (semana 52) foram notificados 7.387 casos prováveis de infecção pelo ZIKV, demonstrando uma tendência na redução em comparação com 2019, que foram de 40.689 notificações <sup>(11, 12)</sup> (Figura 3).



**Figura 3** - Curva epidêmica dos casos prováveis de ZIKV, por semanas epidemiológicas de início de sintomas, Brasil, 2019 e 2020. Disponível em: Ministério da Saúde, boletim epidemiológico 52, vol. 52, dezembro 2020 <sup>(11)</sup>.

Os casos notificados por região entre novembro 2019 e dezembro de 2020, foram: nordeste com 5.305, sudeste com 860, centro-oeste com 600, norte com 524 e sul com 98 casos. (10, 11) (Esquema 1).

**Esquema 1** - Situação epidemiológica de casos prováveis de infecção pelo ZIKV notificados entre dezembro de 2019 e dezembro de 2020, por região e Estado com maior número de casos notificados.

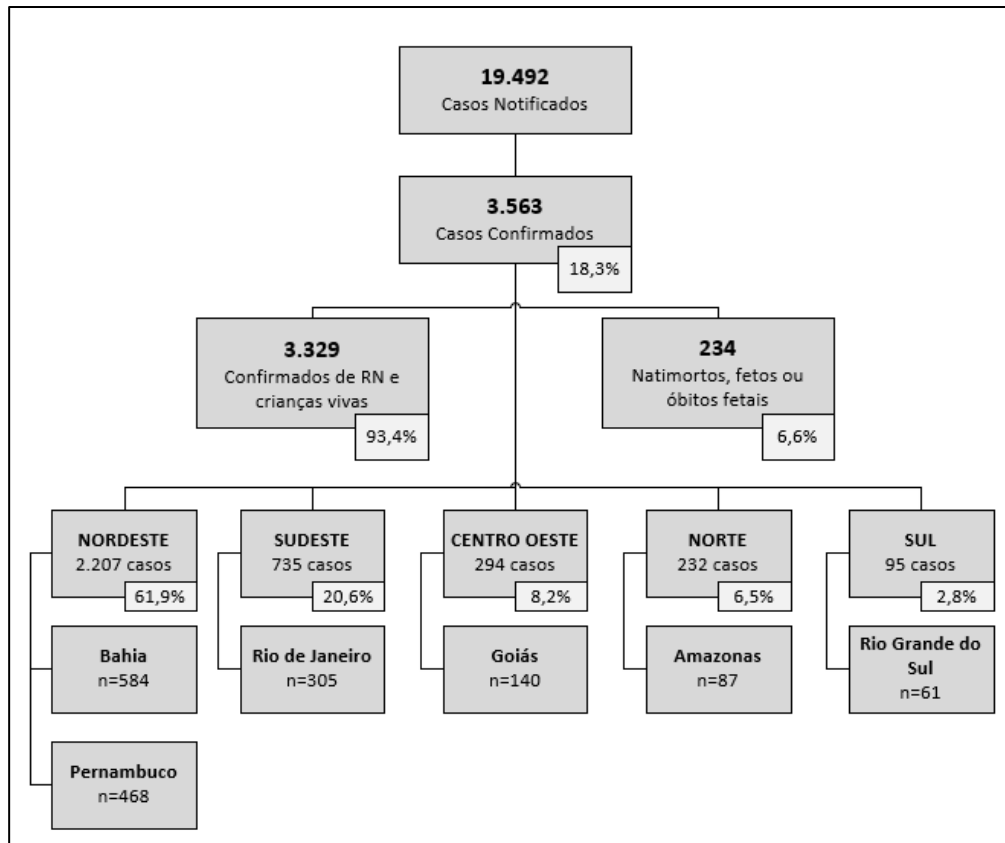


Fonte: Ministério da Saúde, boletim epidemiológico 52, vol.52, dezembro/2020 (11).

Nesse mesmo período foram notificados 609 casos prováveis de ZIKV em gestantes, sendo confirmados 214 casos. No entanto, mesmo com esse diagnóstico, não se pode afirmar que a gestante terá um recém-nascido com algum comprometimento neurológico (11).

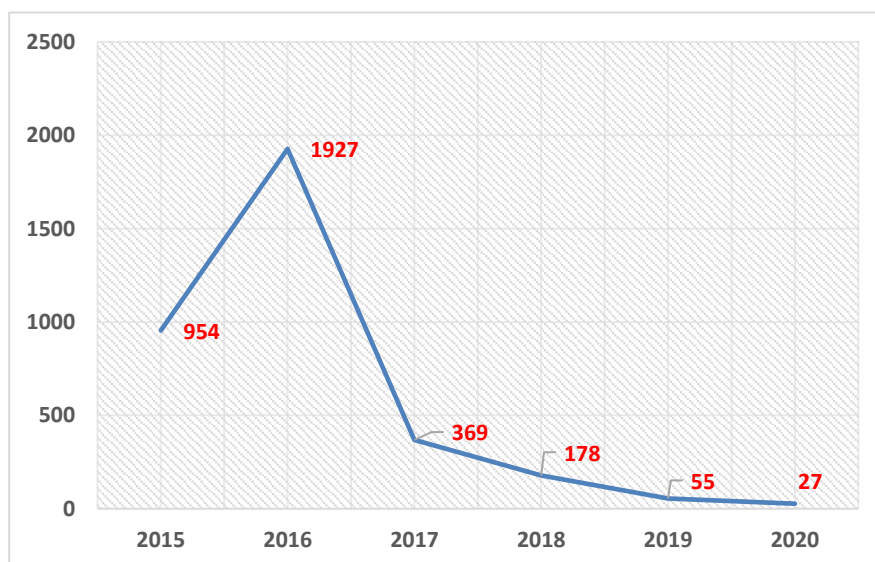
Entre novembro de 2015 a novembro de 2020, o MS foi notificado sobre 19.492 casos suspeitos de Síndrome Congênita Associada ao ZIKV (SCZ). Do total de casos notificados, 3.563 (18,3%) foram confirmados como prováveis para relação com SCZ, sendo que 3.329 (93,4%) eram recém-nascidos ou crianças vivas e 234 (6,6%) eram fetos ou óbitos fetais, neonatais e infantis. A distribuição dos casos entre os estados brasileiros foi: 2.207 do Nordeste, 735 do Sudeste, 294 do Centro-Oeste, 232 do Norte e 95 do Sul (12) (Esquema 2).

**Esquema 2** - Situação epidemiológica da Síndrome Congênita associada ao ZIKV de 2015 a 2020, por região e estado com maior número de casos confirmados.



Fonte: Ministério da Saúde, boletim epidemiológico 47, vol. 51, novembro 2020 <sup>(12)</sup>.

O número de casos confirmados de SCZ por ano de notificação foi 954 em 2015, 1.927 em 2016, 369 em 2017, 178 em 2018, 55 em 2019 e 27 em 2020<sup>(12)</sup> (Gráfico 2).

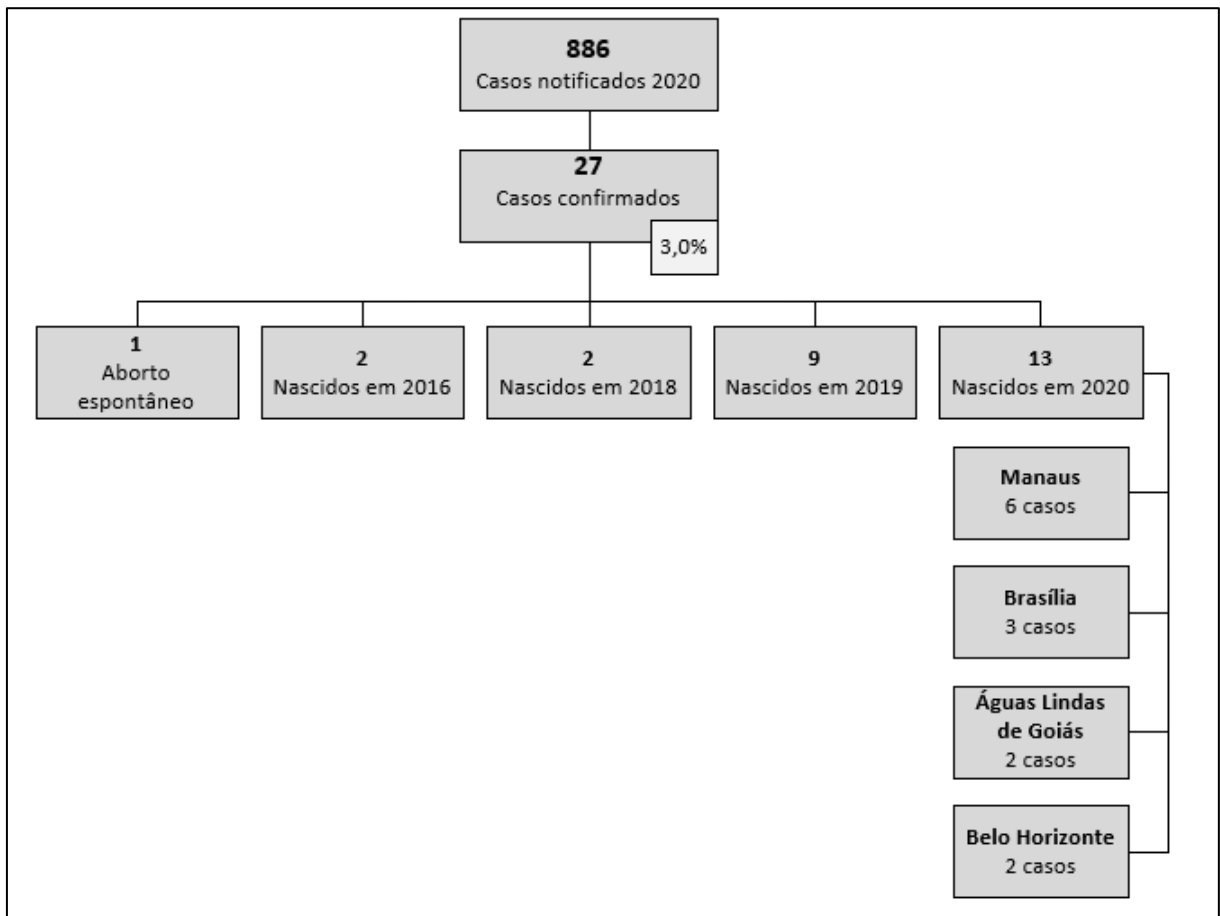


**Gráfico 2:** Número de casos confirmados de SCZ por ano de notificação.

Fonte: Ministério da saúde, boletim epidemiológico 47, vol. 51, novembro 2020 <sup>(12)</sup>.

Considerando o ano epidemiológico de 2020, até a semana 45 (novembro/2020), 886 novos casos foram notificados para suspeita de SCZ, dos quais 27 (3,0%) foram confirmados, sendo: 1 aborto espontâneo, 02 nascidos em 2016, 02 em 2018, 09 em 2019 e 13 em 2020. Destes 13 casos, os municípios com maior incidência foram Manaus (n=6), Brasília (n=3), Águas Lindas de Goiás (n=2) e Belo Horizonte (n=2) <sup>(12)</sup> (Esquema 3).

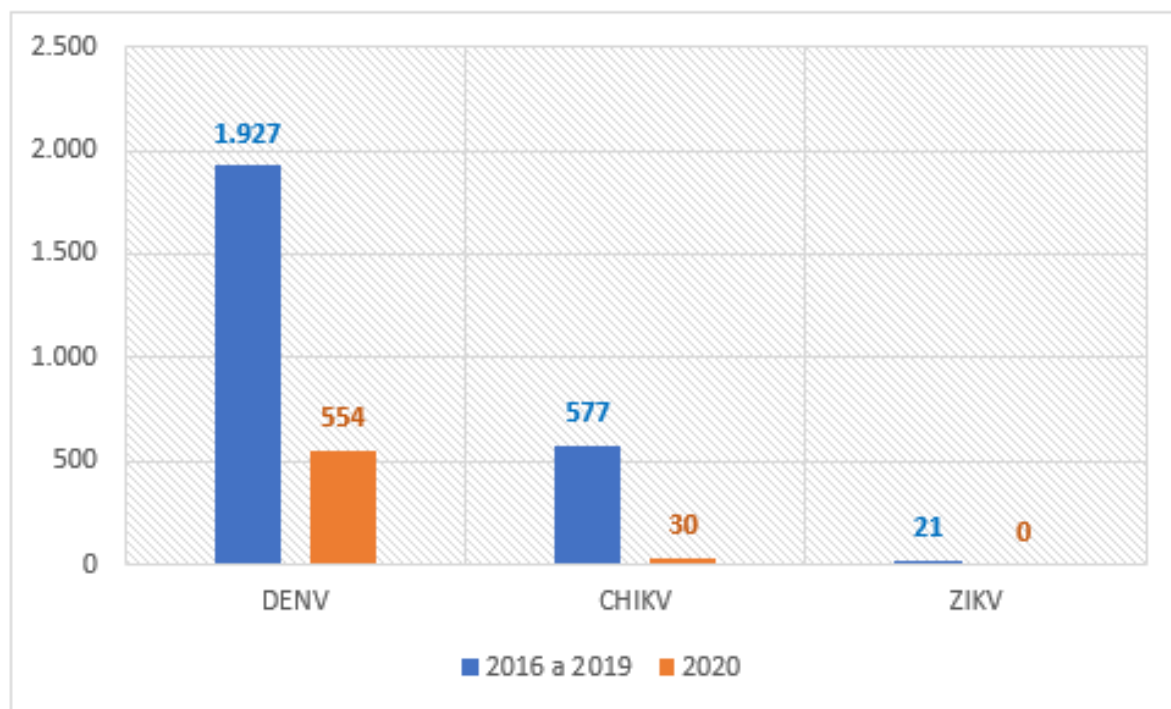
**Esquema 3** - Números de casos confirmados de SCZ em 2020, por município.



Fonte: Ministério da saúde, boletim epidemiológico 47, vol. 51, novembro 2020 <sup>(12)</sup>.

No Brasil, os óbitos ocorridos pelo ZIKV no período de 2016 a 2019 foram menos frequentes que os óbitos por DENV e CHIKV. Nesse período, foram confirmados pelo critério laboratorial, 21 óbitos por ZIKV, 1.927 por DENV e 577 por CHIKV <sup>(13, 14)</sup> (Gráfico 3).





**Gráfico 3** - Número de óbitos por DENV, CHIKV e ZIKV no período de 2016 a 2020, Brasil.

Fonte: Ministério da Saúde, boletim epidemiológico vº 52, dezembro 2021, e nrº 51, setembro 2020 <sup>(13, 14)</sup>.

Dos óbitos ocorridos pelo ZIKV, 11 (52,4%) ocorreram em 2016, excluindo os casos de SCZ, sendo a faixa etária de maior prevalência entre os 0 e 9 anos de idade (42,8%). Em 2020 não houve relatos de óbitos pelo ZIKV <sup>(13, 14)</sup> (Tabela 1).

**Tabela 1** - Distribuição dos óbitos pelo ZIKV, por faixa etária, Brasil 2016 a 2020.

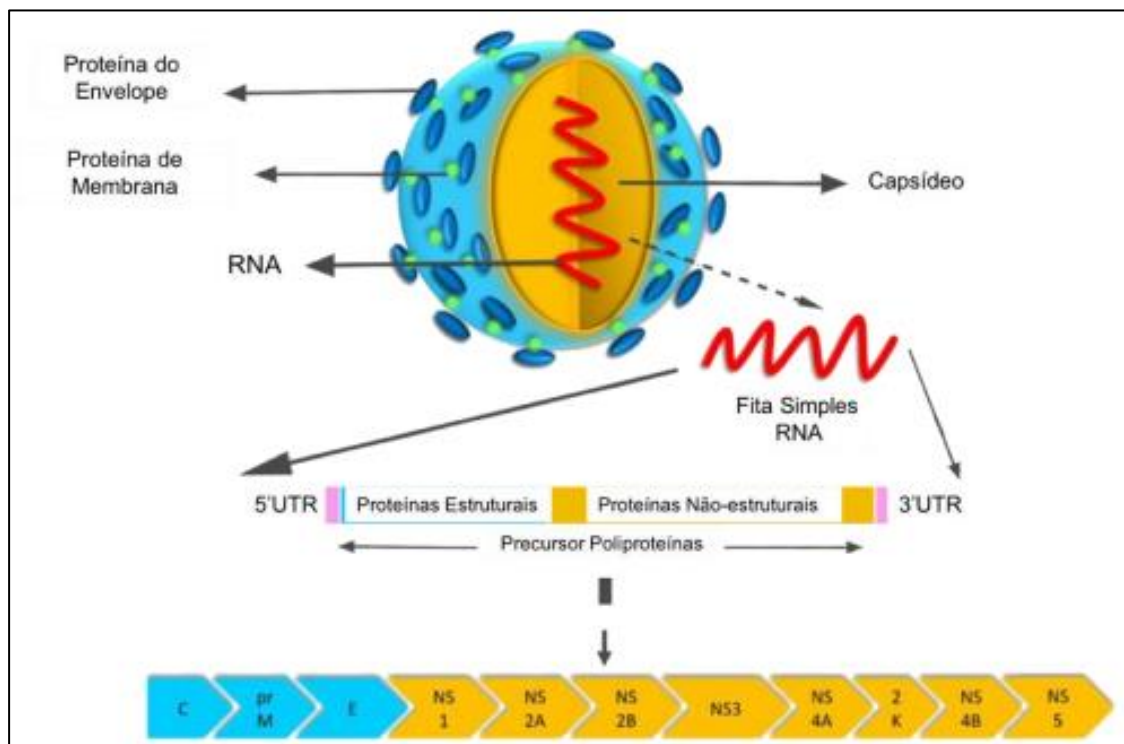
Faixa etária (anos)	óbitos					Total (%)
	2016	2017	2018	2019	2020	
0 a 9	4	0	3	2	0	9
10 a 19	1	0	1	1	0	3
20 a 39	2	1	1	0	0	4
40 a 59	3	0	0	0	0	3
60 ou mais	1	0	1	0	0	2
	<b>11</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>21</b>

Fonte: Modificado de Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico 51, vol. 33, agosto de 2020 e vol.36, setembro de 2020 <sup>(13, 14)</sup>.

## 2. ZIKA VÍRUS

### 2.1. Estrutura viral

O ZIKV é um vírus envelopado, relativamente pequeno com cerca de 40 nanômetro (nm) de diâmetro, de cadeia simples de Ácido Ribonucléico (RNA) de sentido positivo de aproximadamente 10,7 kilobases (Kb) que codifica três proteínas estruturais: membrana precursora (prM), envelope (E) e capsídeo (C) e sete proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5<sup>(15, 16)</sup>. A prM participa do enovelamento e montagem da proteína E; a proteína E é a maior proteína da superfície viral, participa dos processos de ligação ao receptor celular e fusão da membrana viral com a membrana da célula hospedeira, sendo importante para a entrada do vírus na célula. É o principal alvo para anticorpos neutralizantes. A proteína C participa do empacotamento viral e da formação do nucleocapsídeo<sup>(16, 17)</sup> (Figura 4).



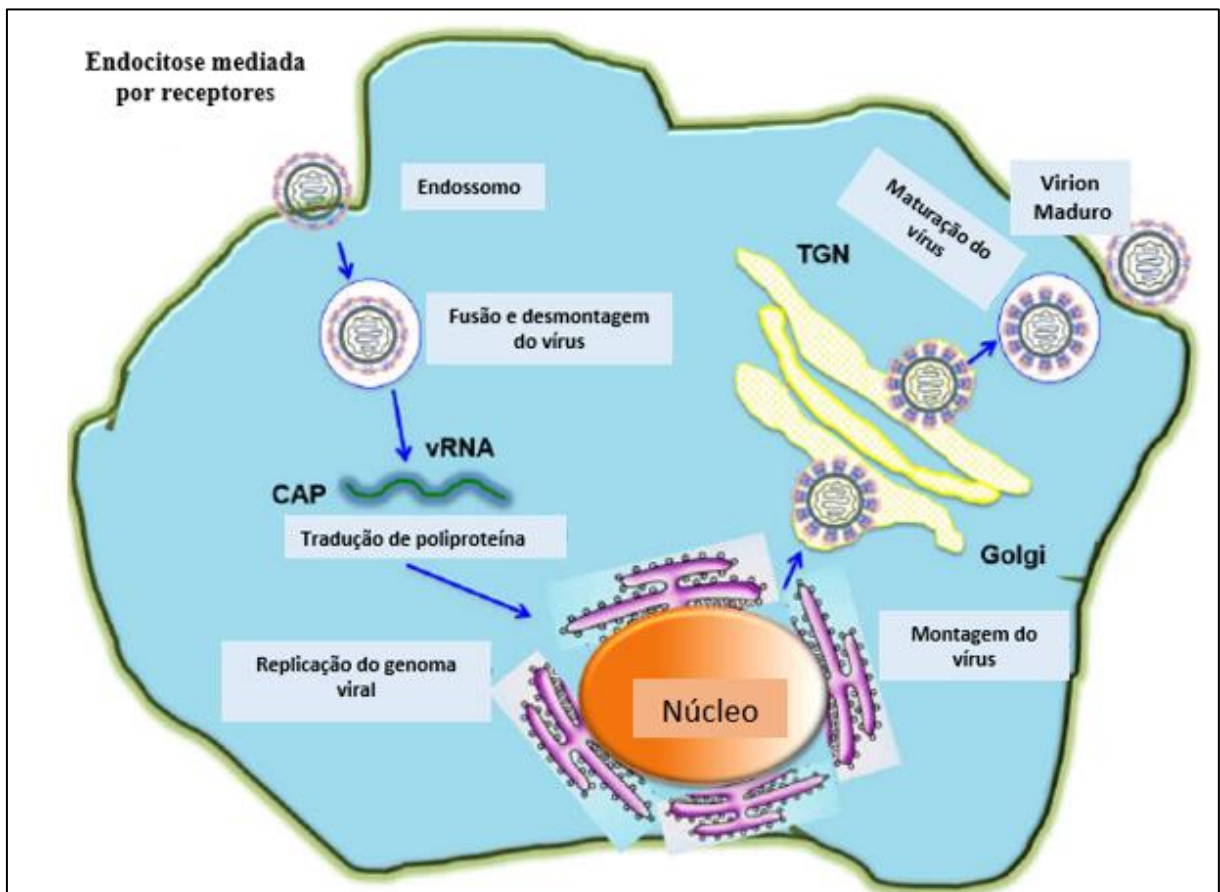
**Figura 4** - Estrutura da partícula do ZIKV. Modificado de Ashrafi V et al<sup>(18)</sup>.

As proteínas não estruturais do ZIKV estão envolvidas na replicação, montagem, e repressão da resposta imune inata do hospedeiro à infecção. A NS1, além de participar da evasão imune, está envolvida no processo de replicação viral, juntamente com a NS4A; as proteínas NS2A, NS2B, NS4A e NS4B são proteínas hidrofóbicas, envolvidas na montagem viral; as proteínas NS3 e NS5 possuem várias atividades enzimáticas importantes no processo

de replicação viral; a NS3 é uma grande proteína multifuncional, contendo diversas atividades necessárias para o processamento da poliproteína e para a replicação do RNA, e a proteína NS5 é a maior e mais conservada, necessária para a síntese de novos RNA, atuando junto a NS3 no processo de replicação viral <sup>(17, 19)</sup>.

## 2.2. Ciclo viral

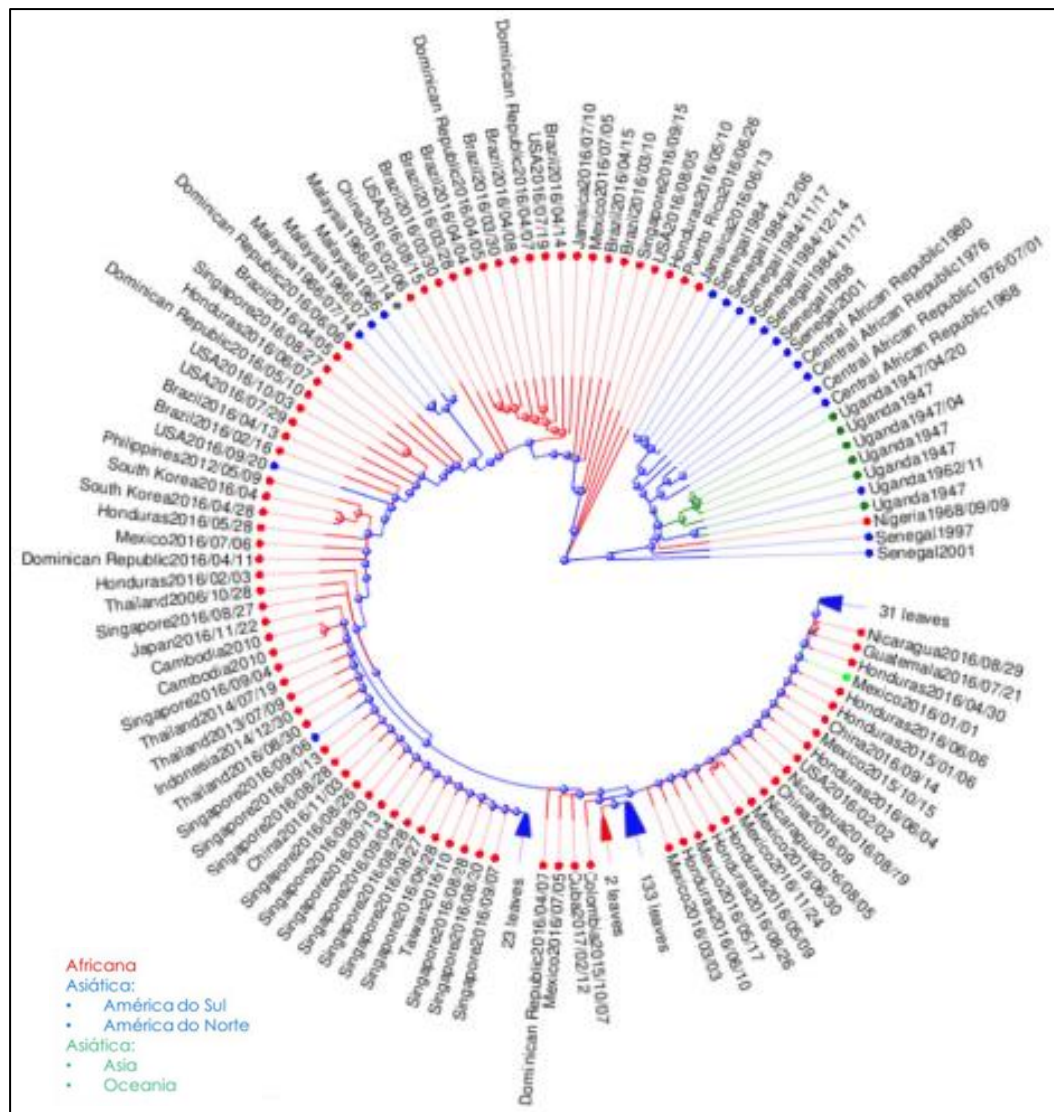
Em seu ciclo replicativo (Figura 5), o ZIKV se liga a moléculas e receptores na célula hospedeira através da proteína E, penetrando-a via endocitose. O baixo pH lisossomal provoca a fusão entre o envelope viral e a membrana da célula hospedeira, liberando o nucleocapsídeo para o citoplasma, onde será liberado RNA viral. Este, sendo de polaridade positiva, é então traduzido e as proteínas não estruturais replicam o genoma viral. A montagem das novas partículas virais ocorre na superfície do retículo endoplasmático. As partículas virais não infecciosas contendo as proteínas E, M, membrana lipídica e nucleocapsídeo, são transportadas através da rede trans-Golgi, onde a prM é clivada pela protease furina hospedeira, gerando partículas maduras infecciosas, que são liberadas por exocitose <sup>(20)</sup>.



**Figura 5** - Ciclo replicativo do ZIKV. Adaptado de Zhang N, et al <sup>(21)</sup>.

### 2.3. Linhagens virais

O ZIKV apresenta uma estrutura molecular muito similar aos outros *Flavivirus*, porém dados de microscopia crioeletrônica revelaram que o ZIKV é bem mais estável a diferentes temperaturas que o vírus da DENV<sup>(22)</sup>. Além disso, o DENV possui quatro sorotipos (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4) e o ZIKV possui apenas um sorotipo<sup>(15)</sup>. Mesmo com um único sorotipo, o ZIKV possui isolados que são divididos filogeneticamente em duas grandes linhagens: linhagem Africana e linhagem Asiática, que podem variar em apenas 4% na sequência de aminoácidos<sup>(23, 24)</sup> (Figura 6).



**Figura 6** - Análise filogenética do ZIKV com base no genoma completo das linhagens Africana e Asiática. Adaptado de Giovanetti M, et al<sup>(25)</sup>.

As análises filogenéticas do ZIKV têm o objetivo de investigar a diversidade genética e

as relações existentes com outros arbovírus, bem como a sua influência sobre sua circulação. Os polimorfismos genéticos podem influenciar a circulação do vírus, uma vez que a variação antigênica desempenha um papel importante na capacidade de escape da resposta imune do hospedeiro e podem contribuir para compreender melhor a história epidemiológica, as rotas de difusão e para o planejamento de estratégias de prevenção <sup>(26)</sup>.

Estudos filogenéticos mostraram que a cepa que emergiu no Brasil pertence à linhagem Asiática e é próxima daquela isolada a partir de amostras coletadas na Polinésia Francesa e que se disseminou pelas ilhas do Pacífico. Mesmo com alta similaridade e homologia, as duas linhagens têm apresentado diferença na patogênese, transmissão e respostas moleculares *in vitro* e *in vivo* <sup>(27-30)</sup>.

A linhagem Africana tem sido considerada como mais agressiva para fetos do que a linhagem Asiática, sugerindo que a infecção pelas cepas da linhagem Africana levaria a danos severos aos fetos, resultando na perda da gravidez. Em contrapartida, as cepas da linhagem Asiática têm sido mais associadas à acometimentos neurológicos e doenças congênitas em fetos <sup>(30-32)</sup>.

Uma evidência interessante está no fato das cepas da linhagem Africana conseguirem se reproduzir de forma mais eficiente no trato intestinal de insetos que as cepas da linhagem Asiática. Esse dado sugere que as cepas da linhagem Africana são melhor transmitidas através de insetos do que as cepas da linhagem Asiática (circulantes na América) <sup>(33, 34)</sup>. Sendo assim, foi identificado que as cepas da linhagem Asiática têm uma característica mais aprimorada para a ocorrência de transmissão sexual <sup>(28)</sup>. Isso é sugerido pela quantidade de casos clínicos relatados com transmissão sexual após viagens aos países Americanos que apresentaram surtos de ZIKV <sup>(35, 36)</sup>. Mesmo assim, muitos trabalhos já demonstraram que as duas linhagens são capazes de infectar e causar danos ao trato reprodutor masculino (TRM) <sup>(32, 37, 38)</sup> (Tabela 2).

**Tabela 2** - Tabela comparativa das linhagens Africana e Asiática do ZIKV.

<b>EFEITOS NO HOSPEDEIRO</b>	<b>LINHAGEM AFRICANA</b>	<b>LINHAGEM ASIÁTICA</b>
Perda da gravidez	×××	×
Acometimentos neurológicos	×	×××
Doenças congênitas feto	×	×××
Transmissão mais evidenciada	Vetorial (mosquito)	Sexual
Danos ao TRM	× (?)	× (?)

Fonte: Govero J, et al, Sheridan MA, et al, Tsetsarkin KA, et al <sup>(32, 37, 38)</sup>.

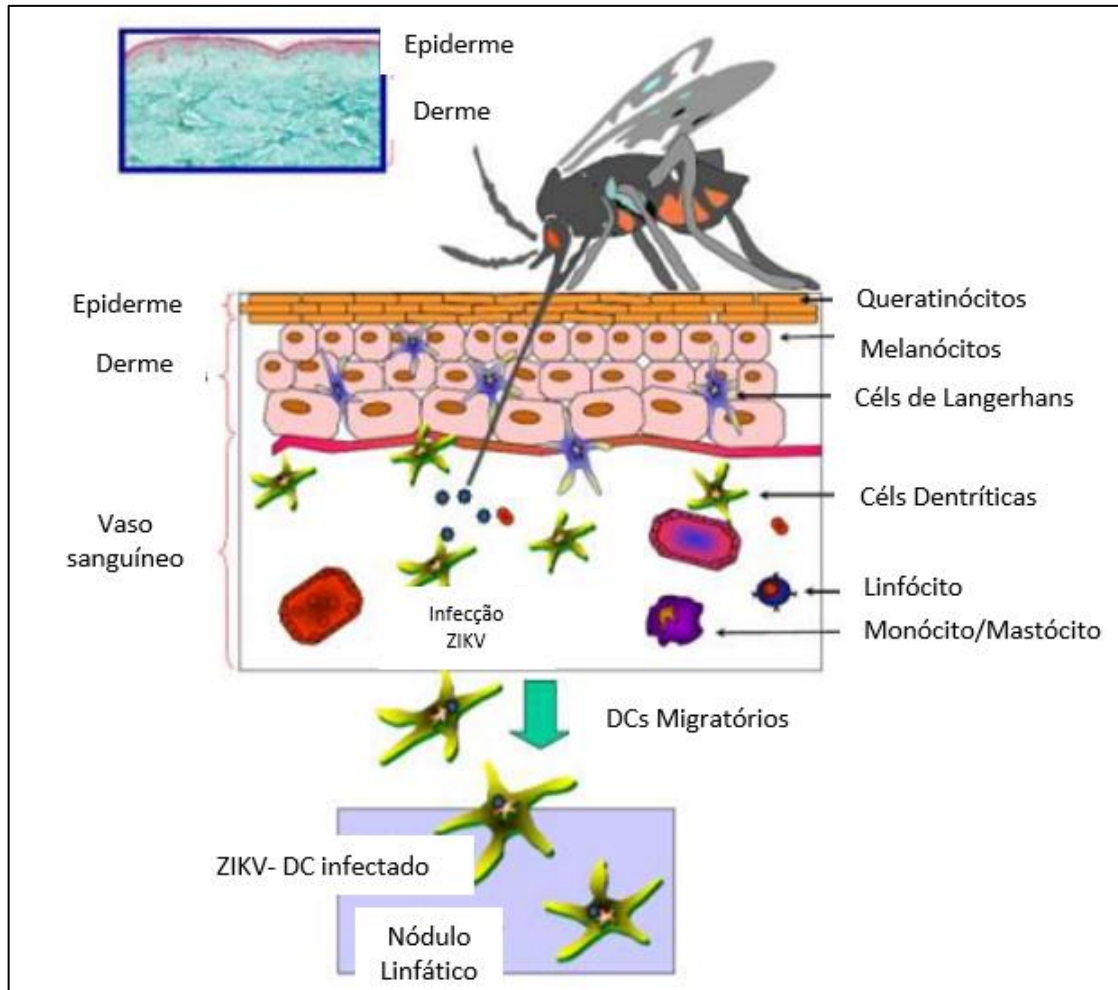
## 2.4. Nova linhagem no Brasil

Uma nova linhagem do ZIKV foi descoberta circulando recentemente no Brasil por pesquisadores do Centro de Integração de Dados e Conhecimentos para Saúde (CIDACS) da FIOCRUZ Bahia, utilizando uma ferramenta de monitoramento genético (SAGA – *Arboviral Genomic Analysis System*) que foi desenvolvida por pesquisadores vinculados ao CIDACS, Instituto Gonçalo Moniz (FIOCRUZ Bahia), Faculdade de Tecnologia e Ciências de Salvador (FTC), Universidade Salvador (UNIFACS) e a Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP). Esta ferramenta analisa sequências disponíveis em banco de dados públicos e permite identificar as linhagens de ZIKV presentes em bases de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Os dados são captados e analisados, demonstrando as sequências do Brasil, bem como sua frequência, podendo identificar as variações de subtipos e linhagens durante os anos. Em 2019 foi observado o aparecimento, mesmo que pequeno, de uma linhagem que até então não era descrita circulando no país. Foi identificada a linhagem Africana, até então inexistente no Brasil, sendo isolada em duas regiões diferentes: no Sul, vindo do Rio Grande do Sul, e no Sudeste, do Rio de Janeiro. A distância geográfica e a diferença de hospedeiros (uma foi encontrada no *Aedes albopictus*, e outro em uma espécie de macaco), sugere que essa linhagem já está circulando no país há algum tempo e pode ter potencial epidêmico, uma vez que a maior parte da população não tem anticorpos para essa nova linhagem do vírus, devendo ser monitorada para alertar a possibilidade de uma nova epidemia do ZIKV <sup>(39, 40)</sup>.

## 3. PATOGÊNESE DO ZIKV

### 3.1. Infecção

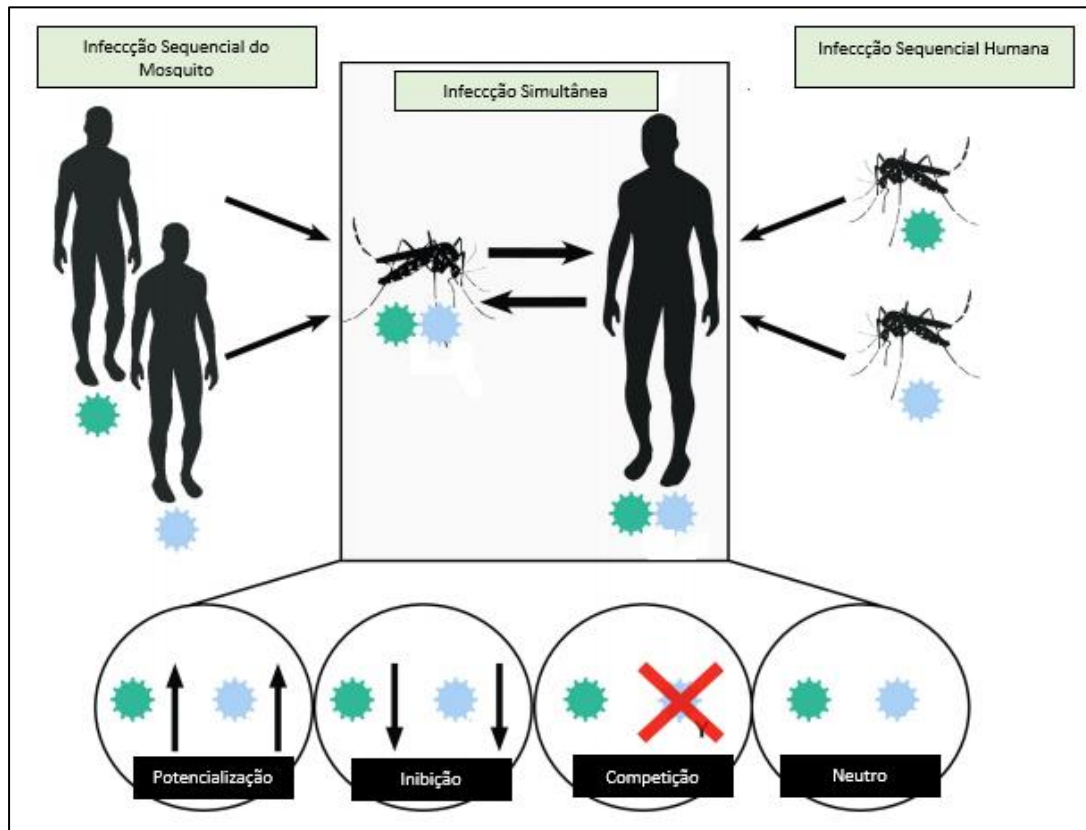
Considerando o modo de transmissão mais comum do vírus que é por meio do vetor, a picada do inseto infectado inocula o ZIKV na pele, o qual replica-se em fibroblastos e é capturado pelas células dendríticas (CDs). Tais células expressam receptores que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), sendo capazes de capturar, processar e apresentar antígenos para os linfócitos. CDs infectadas com o ZIKV passam para os linfonodos onde induzem a proliferação, diferenciação e produção de citocinas. Esse processo é crítico para que as CDs possam ativar de forma eficiente linfócitos T e B. A infecção de fibroblastos dérmicos e CDs levam à viremia por ZIKV <sup>(41, 42, 43)</sup>. (Figura 7).



**Figura 7** - O mosquito *Aedes* introduzindo o vírus ZIKV no hospedeiro. Adaptado de Al-Taemi K, et al <sup>(44)</sup>.

### 3.2. Coinfecção com outros arbovírus

Em ambientes urbanos, todos os três vírus (DENV, CHIKV e ZIKV) compartilham hospedeiros comuns (humanos) e mosquitos vetores (principalmente *A. aegypti*) e são, portanto, regidos por fatores biológicos, ecológicos e econômicos semelhantes, levando a sinergia epidemiológica. Um dos principais mistérios não resolvidos em relação às coinfeções é se a infecção por dois ou mais vírus pode aumentar a gravidade da doença em comparação com infecções únicas. São apontados quatro resultados potenciais da coinfeção: 1) aumento de ambos os vírus, 2) inibição de ambos os vírus, 3) competição entre os vírus e 4) nenhum efeito em qualquer vírus (Figura 8). Existem alguns relatos de doença grave após a coinfeção, mas com base apenas em relatos de casos individuais ou estudos de coorte em pequena escala não havendo experimentos controlados com animais ou estudos de coorte maiores que forneçam maiores evidências mais concretas <sup>(45)</sup>.



**Figura 8** - Coinfecções por arbovírus ocorrem como resultado de infecção simultânea ou sequencial. Disponível em: Vogel CBF, et al <sup>(45)</sup>.

Dados os possíveis resultados de coinfecções em doenças clínicas, também é necessário entender como humanos tornam-se coinfectedados com diferentes arbovírus. Existem dois mecanismos possíveis: 1) de transmissão simultânea de vários vírus durante uma única picada de mosquito ou 2) de várias picadas de mosquito sequenciais (Figura 8). Dadas as semelhanças clínicas entre as três arboviroses existe uma necessidade urgente do desenvolvimento de testes diagnósticos que detectem essas três infecções de forma simultânea, que forneçam o diagnóstico em pouco tempo e possam ser realizados nas unidades de pronto-atendimento, sem necessidade de laboratório especializado. Além disso, informações epidemiológicas sobre sazonalidade, susceptibilidade da população e intensidade de transmissão desses vírus em cada local são necessárias para orientar os médicos na sua suspeita clínica <sup>(46, 47)</sup>.

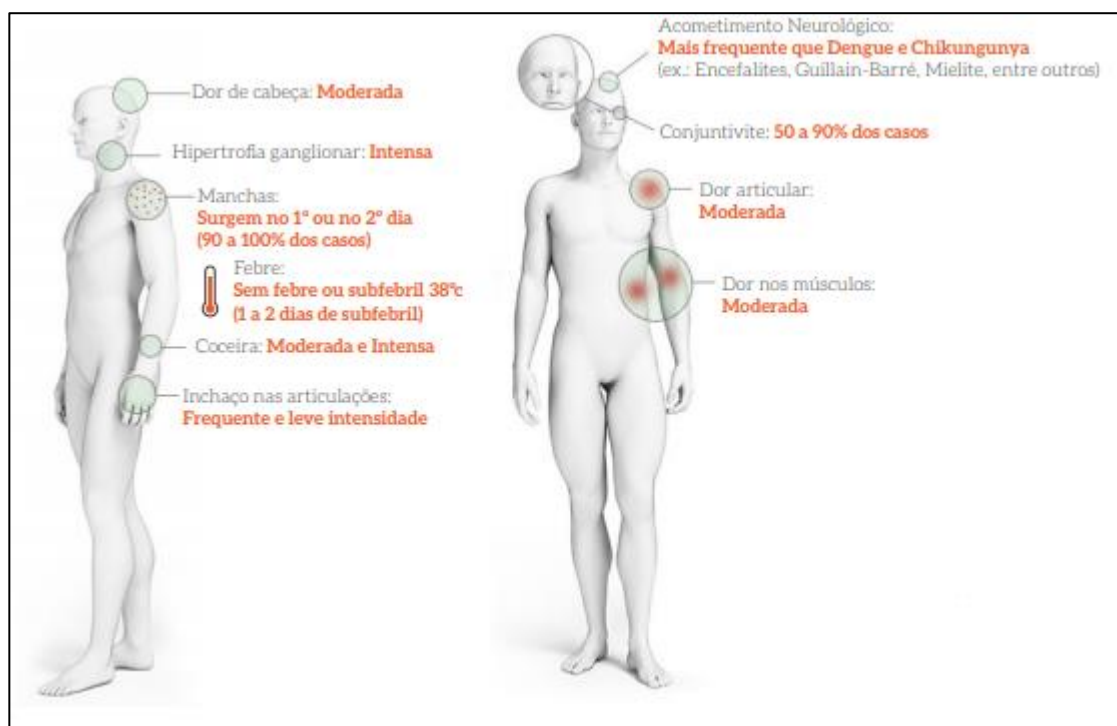
## 4. QUADROS CLÍNICOS

### 4.1. Geral

O ZIKV passa aproximadamente 10 dias em incubação extrínseca no mosquito, enquanto no homem, esse período de incubação varia de 3 a 6 dias e pouco tempo depois, podem surgir sintomas da infecção <sup>(48)</sup>. Cerca de 80% dos casos relatados de ZIKV são



assintomáticos, mas quando os sintomas estão presentes assemelham-se aos de DENV e CHIKV. Os sinais e sintomas (Figura 9) são caracterizados por início agudo de febre, exantema maculopapular, mialgia, conjuntivite não purulenta, fadiga, artralgia, cefaleia e mal-estar. Outros sintomas menos comuns podem ocorrer dificultando o diagnóstico diferencial: edema, tosse seca, fotofobia e alterações gastrointestinais (vômitos). Formas graves e atípicas são raras, mas quando ocorrem podem evoluir para óbito <sup>(49)</sup>.

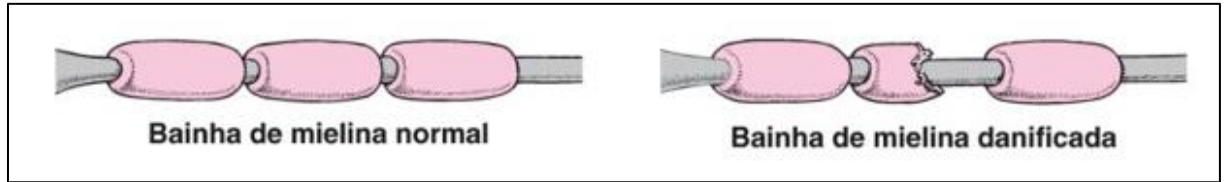


**Figura 9** - Sintomas da infecção por ZIKV. Disponível em Fenasaúde: [https://www.editoraroncarati.com.br/v2/phocadownload/guia\\_zica\\_dengue\\_chikungunya\\_fenasaude\\_final\\_11072016.pdf](https://www.editoraroncarati.com.br/v2/phocadownload/guia_zica_dengue_chikungunya_fenasaude_final_11072016.pdf) <sup>(50)</sup>.

Embora descrita como uma doença leve, autolimitada, sem complicações graves e com uma baixa taxa de hospitalização, o ZIKV tornou-se uma importante doença infecciosa, ligada a diversas malformações congênitas e síndromes neurológicas <sup>(51, 52, 53)</sup>.

#### 4.2. Síndrome de Guillain-Barré

A SGB é a maior causa de paralisia generalizada no mundo, com uma incidência de 1-4 por 100.000 habitantes, acometendo principalmente pessoas entre 20-40 anos de idade. Trata-se de uma doença autoimune que acomete a mielina da porção proximal dos nervos periféricos de forma aguda e subaguda <sup>(54)</sup>. (Figura 10).



**Figura 10** - Ilustração representativa da bainha de mielina normal e danificada na SGB. Disponível em WHO: <http://www.who.int/emergencias/zika-virus/situation-report/10-march-2016/en/> <sup>(55)</sup>.

A SGB é uma poliradiculoneuropatia (neuropatia inflamatória) mediada pelo sistema imunológico do paciente, que pode ocorrer após infecção viral ou bacteriana. Normalmente se apresenta como paralisia muscular ascendente, progressiva, subaguda, com picos a cada quatro semanas e é acompanhado por ausência de reflexos. Sintomas comuns são: fraqueza generalizada nos membros inferiores, braços, tronco, cabeça e pescoço, podendo levar a tetraplegia completa em casos mais graves <sup>(56)</sup> (Figura 11).

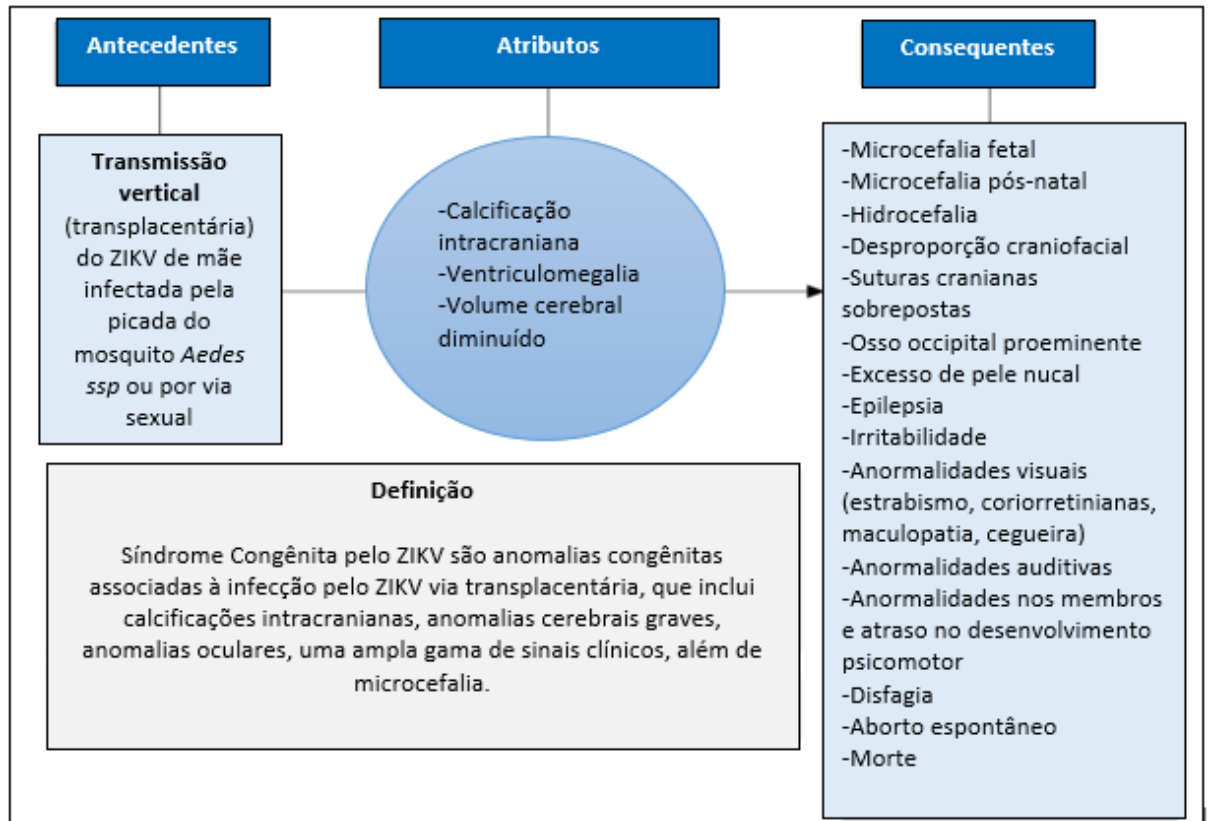


**Figura 11** - Sintomas típicos da SGB. Disponível em: Chaval 24 hs - <http://www.chaval24hrs.com.br/2016/02/entenda-o-que-e-sindrome-de-guillain.html> <sup>(57)</sup>.

Estudos relatam casos de pacientes sem históricos anteriores de SGB, que ao desenvolverem infecção pelo ZIKV apresentaram esta complicação, com tetraparesia (diminuição dos movimentos) dos membros superiores e inferiores e em alguns casos evoluíram para paralisia da musculatura respiratória, necessitando de ventilação mecânica na unidade de terapia intensiva <sup>(56, 58, 59)</sup>.

### 4.3. Síndromes congênicas pelo ZIKV

São anomalias congênicas associadas à infecção pelo ZIKV via transplacentária que inclui calcificações intracranianas, anomalias cerebrais graves, anomalias oculares e uma ampla gama de sinais clínicos, além da microcefalia <sup>(60, 61)</sup> (Figura 15).

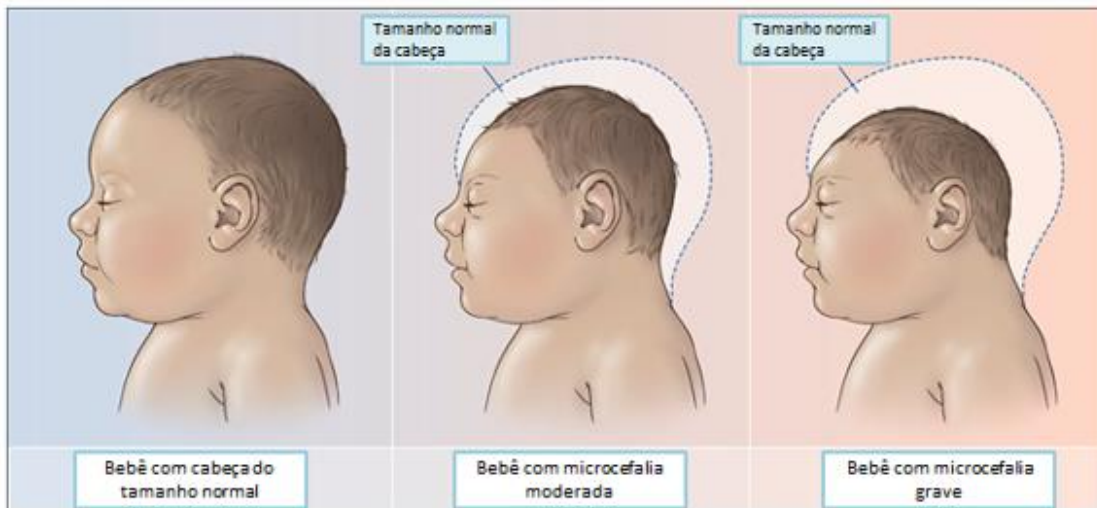


**Figura 12** - Estrutura conceitual de Síndrome Congênita pelo ZIKV. Modificado de Teixeira TA, et al <sup>(61)</sup>.

#### 4.3.1. Microcefalia

A Microcefalia é uma malformação congênita, em que o cérebro não se desenvolve de maneira adequada, fazendo com que a mensuração do perímetro cefálico do recém-nascido seja dois desvios padrões abaixo do limite de normalidade para a idade gestacional (igual ou inferior a 32 cm), podendo causar deficiência intelectual, retardo no desenvolvimento, problemas motores, de visão e de audição <sup>(62)</sup> (Figura 13).

Durante o surto no Brasil entre 2015- 2016, foram relatadas as primeiras associações da infecção por ZIKV com malformação neural, defeitos congênicos, danos neurológicos e as primeiras investigações de transmissão vertical, de mãe para feto <sup>(63, 64)</sup>.

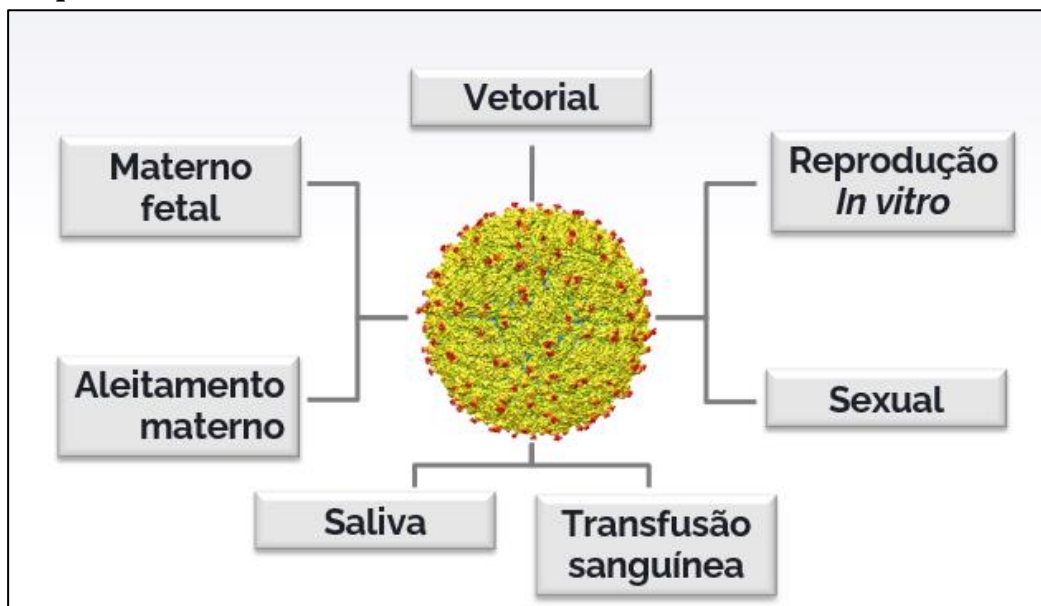


**Figura 13** - Criança com microcefalia moderada ou grave associada a infecção pelo ZIKV. Modificado de Petersen LR, et al <sup>(53)</sup>.

## 5. FORMAS DE TRANSMISSÃO

Apesar da principal forma de transmissão do ZIKV ser por meio da picada de mosquitos do gênero *Aedes*, a mesma pode ocorrer por várias outras vias, como sumarizado no Esquema 4.

**Esquema 4** - Vias de transmissão do ZIKV.

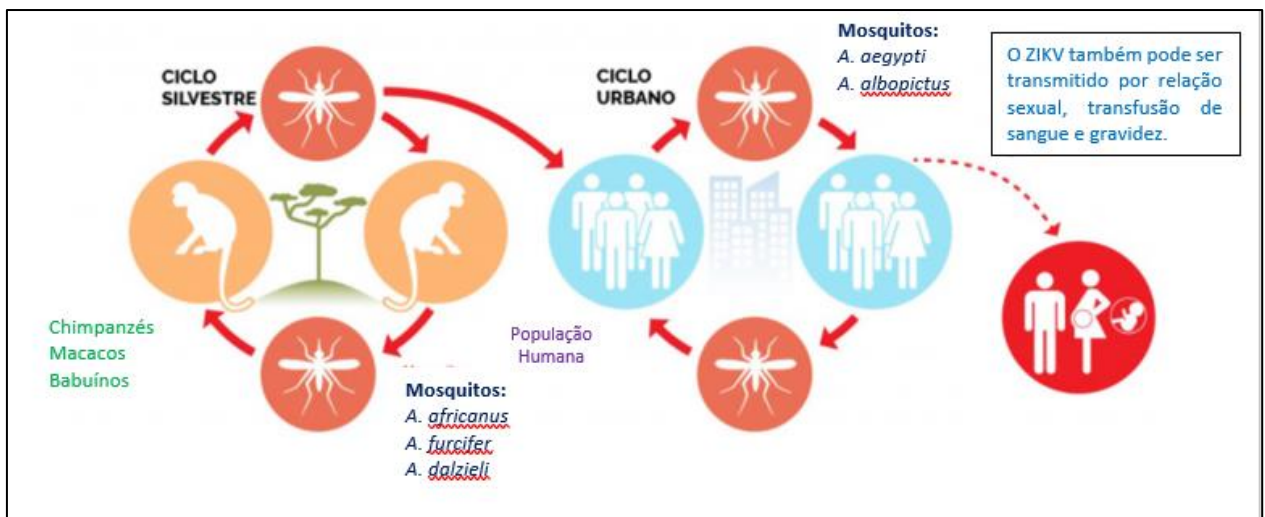


### 5.1. Vetorial

O ZIKV é um arbovírus que inclui vários outros vírus como o DENV, CHIKV, Febre Amarela (YFV), Nilo Ocidental (WNV) e Encefalite Japonesa (JEV). Esses vírus são

caracterizados por serem transmitidos por artrópodes <sup>(65)</sup>. O ZIKV é usualmente transmitido ao homem pela picada de mosquitos do gênero *Aedes*, dentre eles, *A. aegypti*, *A. albopictus*, *A. polynesiensis*, *A. vittatus*, *A. unilineatus*, *A. hensilli*, *A. africanus*, entre outros. A espécie *A. hensilli* foi a predominante na Ilha de Yap durante a epidemia de 2007. Nas Américas, o principal vetor é o *A. aegypti* <sup>(66, 67)</sup>.

O ciclo de transmissão primário do ZIKV envolve primatas (não humanos e humanos) e certas espécies de mosquitos *Aedes*. Os dados disponíveis indicam que existem dois ciclos do ZIKV, sendo um ciclo silvestre envolvendo primatas não humanos e mosquitos que vivem na floresta, e um ciclo urbano/suburbano envolvendo humanos e *A. aegypti* e, em menor grau, *A. albopictus*. Os ciclos silvestre e urbano do ZIKV são semelhantes aos descritos para a DENV, YFV e CHIKV <sup>(68, 69)</sup> (Figura 14).



**Figura 14-** Ciclo de transmissão do ZIKV. Fonte: Modificado de CDC, PLOS, Reuters <sup>(69)</sup>.

### 5.1.1. Infectividade do mosquito *A. aegypti*

O macho, como os de qualquer espécie, alimenta-se exclusivamente de frutas. A fêmea, no entanto, necessita de sangue para o amadurecimento dos ovos que são depositados separadamente nas paredes internas de objetos, próximos a superfícies de água limpa. Como são resistentes fora da água, podem ser transportados a grandes distâncias, em recipientes secos. Medem 0,4 mm e possuem uma casca escura e rígida (Figura 15). Sobrevivem por um ano inteiro até o próximo verão, quando o clima chuvoso e quente poderá levar à sua eclosão e à formação das larvas e, depois, do mosquito. Em média cada *A. aegypti* vive em torno de 30 dias e a fêmea chega a colocar por postura entre 150 a 200 ovos e até 1.500 ao longo da sua vida. Os ovos ao entrar contato com a água eclodem em menos de 30 minutos, e no período de 7 a 9 dias passam pelas fases de larva e pupa até chegar ao mosquito adulto. Se forem postos por

uma fêmea contaminada pelo ZIKV, ao completarem seu ciclo evolutivo, transmitirão a doença (70).

A infecção do mosquito vetor (fêmea) pelo ZIKV se inicia a partir da ingestão de partículas virais infecciosas (presentes no sangue humano) durante o repasto sanguíneo. Em seguida há o período de incubação que varia de 8 a 12 dias para que o vírus possa replicar-se no estômago do mosquito e chegar às glândulas salivares. O vírus será inoculado em um novo hospedeiro durante um novo repasto sanguíneo, pelas glândulas salivares do vetor, agora contaminadas, iniciando assim um novo ciclo (71, 72). Outra forma de infecção do mosquito vetor se dá pela transmissão transovariana ou vertical, passando da fêmea contaminada aos seus descendentes sem a necessidade de outro hospedeiro (73, 74).



**Figura 15** - Ovos de *Aedes aegypti*. Fonte: FIOCRUZ (75).

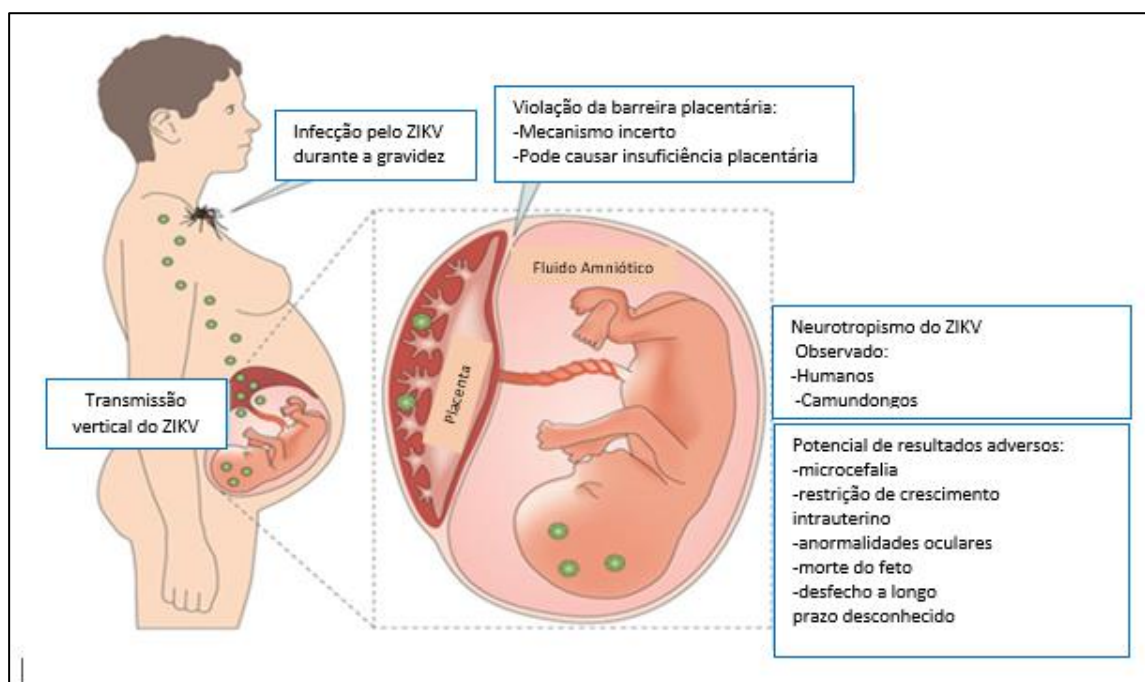
## 5.2. Materno-fetal

### 5.2.1. Incidência

A transmissão materno-fetal foi confirmada no Brasil em gestantes que deram à luz a recém-nascidos com malformações graves, uma vez que o RNA do ZIKV foi detectado no líquido amniótico, amostras de tecidos e sangue de recém-nascidos microcefálicos (53) (Figura 16).

O ZIKV pode ser transmitido de uma mulher grávida para o feto durante a gravidez (transmissão congênita) ou próximo ao nascimento (transmissão perinatal). A transmissão congênita pode ocorrer em todos os três trimestres da gravidez, independente da presença ou ausência de sintomas da mãe (76, 77). Aproximadamente 26% das mães infectadas transmitem o

ZIKV aos fetos <sup>(76)</sup>. Estudos relatam que fetos de mulheres infectadas pelo ZIKV durante os três meses iniciais de gestação apresentam maior risco de nascer com problemas congênitos, como a microcefalia, do que os bebês de mães que entraram em contato com o patógeno em fases posteriores da gravidez <sup>(78, 79)</sup>. Isto se justifica pelo fato da placenta madura, ao final da gravidez, ser mais resistente à infecção pelo vírus do que a placenta primitiva, presente até o terceiro mês de gestação <sup>(80)</sup>. Não está claro se o risco de infecção fetal através da mãe infectada é maior por meio da transmissão sexual ou pela vetorial <sup>(81)</sup>. O ZIKV foi também isolado na secreção vaginal humana, o que aumenta a possibilidade do ZIKV poder acessar o feto por infecção ascendente transvaginal, além da disseminação hematogênica transplacentária <sup>(82, 83)</sup>.

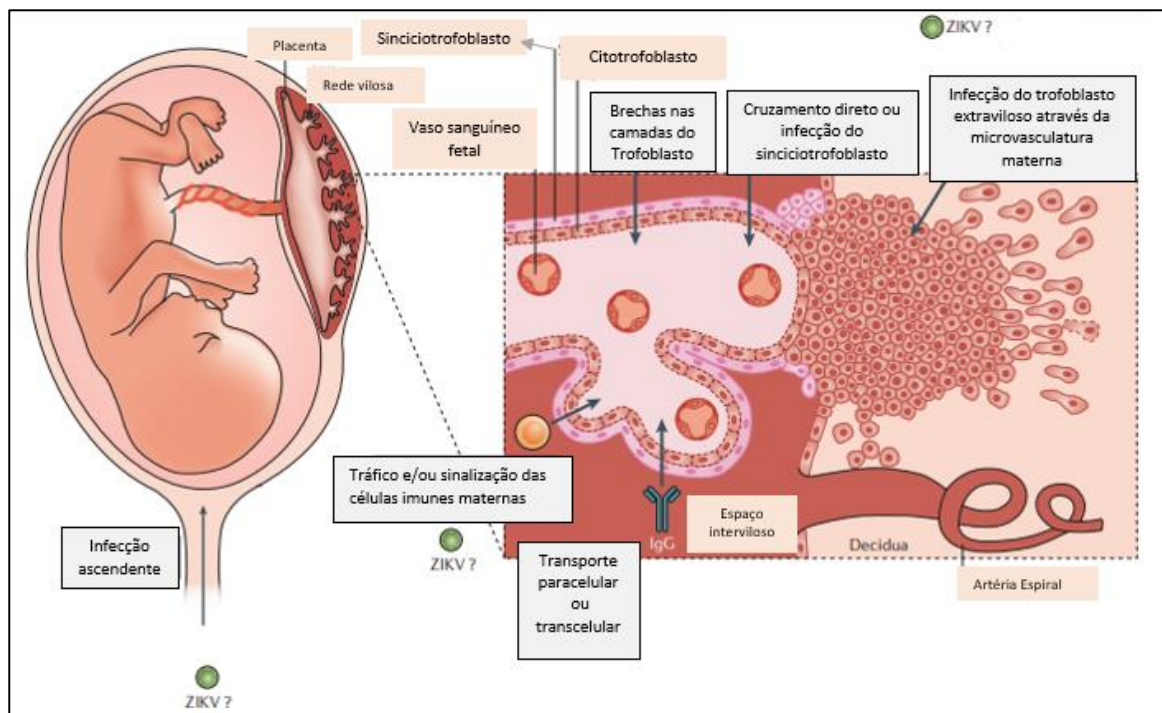


**Figura 16-** Transmissão vertical e doença congênita induzida pelo ZIKV. Modificado de Coyne C, Lazear M <sup>(83)</sup>.

A transmissão perinatal ocorre quando uma mulher é infectada com o ZIKV aproximadamente 2 semanas antes do parto, onde o vírus passa para o bebê neste momento. Quando um bebê adquire a infecção pelo ZIKV no período perinatal, ele pode desenvolver sintomas como erupção maculopapular, conjuntivite, artralgia e febre. As informações sobre a transmissão perinatal são limitadas. O espectro de características clínicas que podem ser observadas em bebês que adquirem o ZIKV durante o período perinatal é atualmente desconhecido <sup>(84)</sup>.

### 5.2.2. Mecanismo de ação

O ZIKV deve superar a barreira placentária para alcançar o feto humano. Ainda permanece desconhecido como o ZIKV faz isso, entretanto as rotas potenciais de transmissão incluem: quebra da camada de sinciotrofoblastos (SINs), podendo resultar em sinais imunológicos maternos, expondo as células mais suscetíveis no núcleo viloso; infecção direta da camada SIN contornando a camada por rotas não replicativas como a transcitose mediada por anticorpos; infecção por trofoblasto extraviloso (TEVs) ou outros tipos de células placentárias (Figura 17). Nos primeiros estágios da gravidez, a placenta humana é responsável por ancorar o blastocisto para o endométrio materno e para estabelecer o sistema circulatório que irá alimentar o sangue materno diretamente no espaço intervilloso (EIV). O EIV é uma cavidade cheia de fluido que banha as vilosidades superficiais da placenta humana, que são formados por SINs. Devido ao contato direto com sangue materno, SINs são cruciais para proteção contra patógenos, mesmo nos primeiros estágios da gravidez. Uma vez que o sistema circulatório uteroplacentário está totalmente estabelecido, o que ocorre perto do final do primeiro trimestre, a placenta é a única barreira que impede que microrganismos do sangue materno acessem o compartimento fetal. Anterior ao primeiro trimestre, o EIV não contém sangue materno e é preenchido com um fluido claro que é produzido por células maternas e/ou fetais, assim, justificando a diferença do mecanismo de transmissão vertical entre o primeiro trimestre e partir deste período <sup>(82, 83)</sup>.



**Figura 17** - Rotas sugerida pelo ZIKAV para superar a barreira placentária. Modificado de Coyne C, Lazear M <sup>(83)</sup>.



### 5.3. Aleitamento materno

Há evidências de transmissão vertical do ZIKV no periparto de mães com viremia. Foi evidenciada presença de fragmentos virais no leite materno, mas não foi observada replicação do vírus e transmissão da doença por essa via <sup>(83)</sup>. A OMS recomenda que as mães que adquiriram a infecção pelo ZIKV durante ou após o parto, devem receber apoio profissional de cuidadores para iniciarem e manterem a amamentação normalmente. Para bebês que nasceram com anomalias congênitas como a microcefalia, as mães também devem amamentar normalmente <sup>(85)</sup>. As evidências atuais sugerem que os benefícios da amamentação superam o risco e desta forma o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) continua incentivando as mães a amamentarem, mesmo que elas tenham sido infectadas, vivam ou viajem para uma área com risco de ZIKV <sup>(84)</sup>.

### 5.4. Saliva

Bonaldo et al <sup>(86)</sup>, demonstraram em estudo a presença do ZIKV viável (infeccioso) na saliva de pacientes brasileiros. No entanto, essa evidência não é ainda suficiente para afirmar que a presença do vírus na saliva pode infectar outras pessoas. Estudos complementares são necessários para avaliar qual o tempo de sobrevivência do ZIKV na saliva e ainda a sua capacidade de infectar as pessoas após passar pelo suco gástrico. A recomendação sugerida pelos autores é de cautela e de prevenção, com orientações conhecidas para outras doenças, como evitar compartilhar objetos de uso pessoal e lavar as mãos com frequência <sup>(86)</sup>.

Por outro lado, embora a saliva funcione como uma barreira protetora para a entrada do vírus, uma ruptura no revestimento epitelial da mucosa oral ou doença gengival pode facilitar a entrada do vírus no sangue <sup>(87, 88)</sup>. A suspeita de transmissão do ZIKV pela saliva ocorreu em um viajante australiano, após a mordida de um macaco em Bali; no entanto, ele também poderia tido sido picado por um mosquito durante sua estada <sup>(89)</sup>.

### 5.5. Transfusão de sangue

A transmissão por meio de transfusão sanguínea deve ser considerada, tendo em vista que o RNA do ZIKV já foi documentado nessa via, como no estudo da OMS, 2016 <sup>(90)</sup> cujo RNA do ZIKV foi detectado em 42 de 1505 dos doadores de sangue durante o surto de 2013-2014 na Polinésia Francesa, sendo que 11 desses 42 doadores eram sintomáticos <sup>(90)</sup>. Uma taxa semelhante foi encontrada em doadores de Porto Rico em 2016 <sup>(91)</sup>. Entre junho de 2016 e setembro de 2017, apenas 9 de 4.325.889 doadores nos Estados Unidos foram confirmados

como positivos para ZIKV, o que pode ter ocorrido devido a deficiências dos métodos usados na triagem <sup>(92)</sup>.

Em fevereiro de 2016, o *Food and Drug Administration* (FDA) <sup>(93)</sup> recomendou que a coleta de sangue doado cessasse em áreas nos Estados Unidos onde o ZIKV era ativo, a menos que testes de sangue pudessem ser implementados. Em agosto de 2016, expandiu suas orientações anteriores para incluir triagem laboratorial para o ZIKV em todas as doações de sangue a nível nacional <sup>(93)</sup>.

No Brasil, em agosto de 2016, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) emitiu uma nota técnica orientando critérios de triagem para doadores com foco em quem havia apresentado diagnóstico clínico ou laboratorial para ZIKV, sendo esta triagem baseada em dados de um questionário. De acordo com a nota técnica, as orientações foram: a) candidatos à doação de sangue que foram infectados pelo ZIKV, após diagnóstico clínico e/ou laboratorial, deverão ser considerados inaptos por um período de 30 dias após recuperação clínica completa (assintomáticos); b) candidatos à doação que tiveram contato sexual com pessoas (sexo masculino ou feminino) que apresentaram diagnóstico clínico e/ou laboratorial de febre pelo ZIKV nos últimos 90 dias, deverão ser considerados inaptos por um período de 30 dias após o último contato sexual <sup>(94)</sup>.

## **5.6. Sexual**

### **5.6.1. Evidências iniciais de transmissão sexual**

O primeiro relato de transmissão sexual do ZIKV, de homem para mulher, ocorreu na esposa de um pesquisador dos Estados Unidos, morador do Estado de Colorado, que contraiu o vírus em 2008, trabalhando em região endêmica do Senegal. Além dos sintomas característicos, ele desenvolveu prostatite e hematospemia, e a esposa que não havia viajado, apresentou a doença duas semanas após relações sexuais desprotegidas <sup>(76, 95)</sup>.

Em janeiro de 2016, um segundo caso de transmissão sexual, de homem para homem, foi relatado no Texas, cujo homem ao retornar da Venezuela passou o vírus para seu parceiro, sem histórico de viagem recente. Foram realizados testes sorológicos de Imunoglobulina M (IgM) em ambos os pacientes, sendo que o primeiro com 14 dias e o segundo (parceiro) com 4 dias após o início dos sintomas, tendo ambos resultados positivos <sup>(35, 96)</sup>.

Em julho de 2016, em Nova York, ocorreu o primeiro caso de possível transmissão do ZIKV de mulher para homem, a qual manteve relações sexuais desprotegidas com seu parceiro após retornar de viagem de uma área endêmica de ZIKV. No primeiro dia dos sintomas seu parceiro apresentou febre, fadiga, erupções cutâneas, mialgia, artralgia e dores nas costas. No

terceiro dia, realizou a coleta de sangue e urina para detecção do ZIKV pela *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR), sendo ambas positivas<sup>(97)</sup>.

Adicionalmente, um caso de transmissão sexual de um homem vasectomizado para sua esposa foi relatado, levantando a possibilidade da presença do ZIKV em outras partes do TRM, além dos testículos, como próstata, vesículas seminais e glândulas bulbouretrais<sup>(98)</sup>.

### **5.6.2. Tempo de permanência do ZIKV nos fluidos genitais**

Muitos pesquisadores estão empenhados em descobrir por quanto tempo o ZIKV permanece em fluidos genitais de pessoas infectadas, como sêmen e secreção vaginal, e por quanto tempo o vírus pode ser transmitido aos parceiros sexuais. Neste sentido, estudos recentes mostram que o ZIKV pode permanecer no sêmen por mais tempo do que em outros fluidos corporais, como vaginal, urina e sangue<sup>(99)</sup>. As taxas de detecção do RNA do ZIKV no sêmen de homens infectados sintomáticos têm sido consistentes na maioria dos estudos, variando de 50 a 60% no primeiro mês de início dos sintomas<sup>(100)</sup>, e diminuindo significativamente após 90 dias do início da doença, embora tenha sido documentada sua presença em até 370 dias após o início dos sintomas<sup>(100, 101)</sup>. Petridou et al<sup>(102)</sup>, confirmou a persistência incomum do RNA do ZIKV no sêmen 515 dias após o início dos sintomas, em um paciente imunossuprimido. Estes dados sugerem que homens infectados podem ser um potencial reservatório para futuras transmissões sexuais, mesmo por um longo período após o início da infecção<sup>(103, 104)</sup> e que a duração variável da excreção de ZIKV no sêmen se deve a diferentes características virais e do hospedeiro<sup>(98)</sup>.

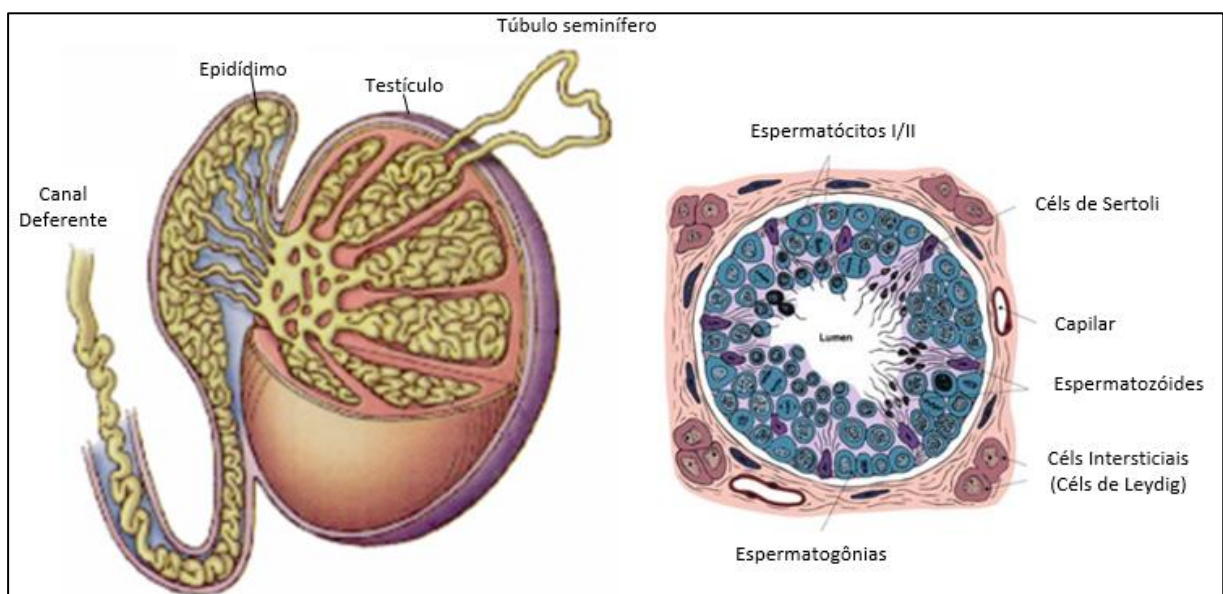
Estudos em amostras de secreção vaginal relataram a presença do RNA do ZIKV, sendo detectado com 13, 14 e 31 dias após o início dos sintomas<sup>(82)</sup>, apoiando desta forma a hipótese de um possível reservatório no trato reprodutor feminino (TRF)<sup>(100, 101, 105-107)</sup>.

Segundo o “*WHO guidelines for the prevention of sexual transmission of Zika virus*”, atualizado em 2020<sup>(108)</sup>, os parceiros sexuais masculinos devem receber informações sobre o possível risco de transmissão sexual do ZIKV durante 3 meses após conhecido ou presumido a infecção, devendo usar preservativos corretamente e consistentemente ou abster-se de fazer sexo durante esse período para prevenir a infecção pelo ZIKV pelo meio sexual. Já as mulheres devem evitar sexo que possa resultar em concepção por 2 meses após conhecido ou presumido a infecção, para garantir que uma possível infecção pelo ZIKV cessou antes de engravidar<sup>(108)</sup>.

## 6. ZIKV NO TRATO REPRODUTOR MASCULINO

### 6.1. Locus de infecção por ZIKV

Os testículos são glândulas reprodutivas que fazem parte das estruturas internas do TRM e estão envolvidos na espermatogênese e na esteroidogênese. Cada testículo é composto por um emaranhado de tubos, os ductos seminíferos. Estes ductos são formados pelas células de Sertoli e pelas células germinativas. As células de Sertoli têm diversas funções como: controle da maturação e da migração das células germinativas; síntese de proteínas e esteróides; controle da passagem das secreções entre compartimentos tubulares e intersticiais e formam a barreira hemato-testicular. As células de Leydig são encontradas no interstício testicular, adjacente aos túbulos seminíferos, promovendo a esteroidogênese por meio da secreção de hormônios sexuais masculinos, principalmente a testosterona, responsável pelo desenvolvimento dos órgãos genitais masculinos e caracteres sexuais secundários<sup>(109, 110)</sup>. Os testículos são considerados como privilegiados imunologicamente, ou seja, são capazes de tolerar a introdução de antígenos sem provocar uma resposta imune inflamatória<sup>(111)</sup>, sendo essenciais para garantir a proteção imunogênica de células germinativas contra a ativação do sistema imunológico durante a espermatogênese<sup>(112-114)</sup> (Figura 18).



**Figura 18** - Células de Sertoli e de Leydig: corte histológico testículo. Modificado de <http://www.reproducao.ufc.br/reprod1.pdf><sup>(115)</sup>.

Em modelo animal com camundongo, foi demonstrado que epidídimo, células epiteliais e leucócitos parecem ser as principais fontes de liberação do RNA do ZIKV<sup>(116)</sup>. Mais especificamente, as células de Sertoli expressam altos níveis de receptores TAM (receptores de

fosfatidilserina) de modo a manter a regulação imunológica nos túbulos seminíferos. Os *Flavivirus* são vírus encapsulados que contêm quantidades significativas de fosfatidilserina em seu envelope e, portanto, podem indiretamente interagir com os receptores TAM. O receptor TAM promove a entrada do ZIKV nas células de Sertoli, contribuindo negativamente para o estado antiviral destas células. Outros tipos de células podem também suportar a infecção por ZIKV como fibroblastos testiculares, células germinativas e espermatozoides<sup>(117, 118)</sup>.

As células de Leydig e os macrófagos testiculares fazem parte da primeira linha de defesa nos túbulos seminíferos<sup>(119)</sup>. Células de Leydig não são altamente susceptíveis à infecção por ZIKV em modelos de camundongos, sendo necessário mais estudos em humanos. No entanto, as células de Leydig são a principal fonte de testosterona nos testículos e durante a infecção pelo ZIKV esses níveis parecem ser significativamente mais baixos<sup>(120-122)</sup>.

Além dos riscos quanto à transmissão sexual, ZIKV levou à infertilidade em camundongos machos<sup>(37, 123)</sup>. Em humanos, foi observada uma baixa contagem de espermatozoides em pacientes infectados pelo ZIKV, sugerindo a influência da infecção na fertilidade masculina<sup>(124)</sup>. Orquite, prostatite, cistite e hematospermia já foram reportados em homens infectados com ZIKV<sup>(95, 125, 126)</sup>, bem como morte de células testiculares, promovendo redução do tamanho do testículo e possível evolução para orquite crônica<sup>(127)</sup>.

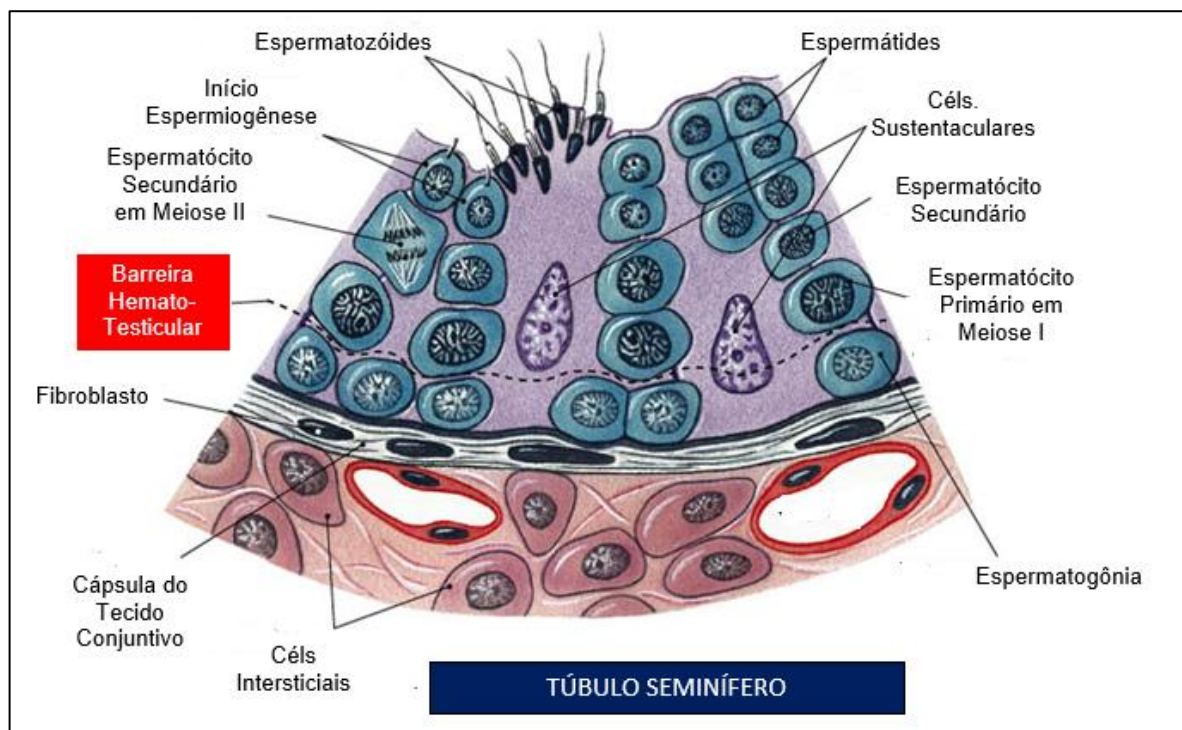
## 6.2. Barreira hemato-testicular e ZIKV

Há muito tempo se assume que a barreira hemato-testicular (BHT) constitui o principal mecanismo do *status* imunoprivilegiado do testículo, sendo o resultado de junções fortemente celulares de células de Sertoli adjacentes, além da interação de células epiteliais e mieloides<sup>(128)</sup> (Figura 19).

A presença da BHT cria compartimentos separados e protege contra infiltrado imunológico que pode levar a inflamação testicular<sup>(128)</sup>. O testículo apresenta um microambiente telorogênico, tornando o órgão imune privilegiado e protegendo os gametas maduros contra a morte e inflamação induzidas por células imunes. Em contrapartida, torna-se um local para a persistência de infecções devido a este ambiente. Microrganismos provenientes do sangue ou infecções urogenitais, ao entrarem no ambiente testicular, interrompem a homeostase do tecido, levando a ativação do sistema imunológico, desencadeando inflamação testicular e prejudicando a espermatogênese e a espermiogênese<sup>(111, 130)</sup>.

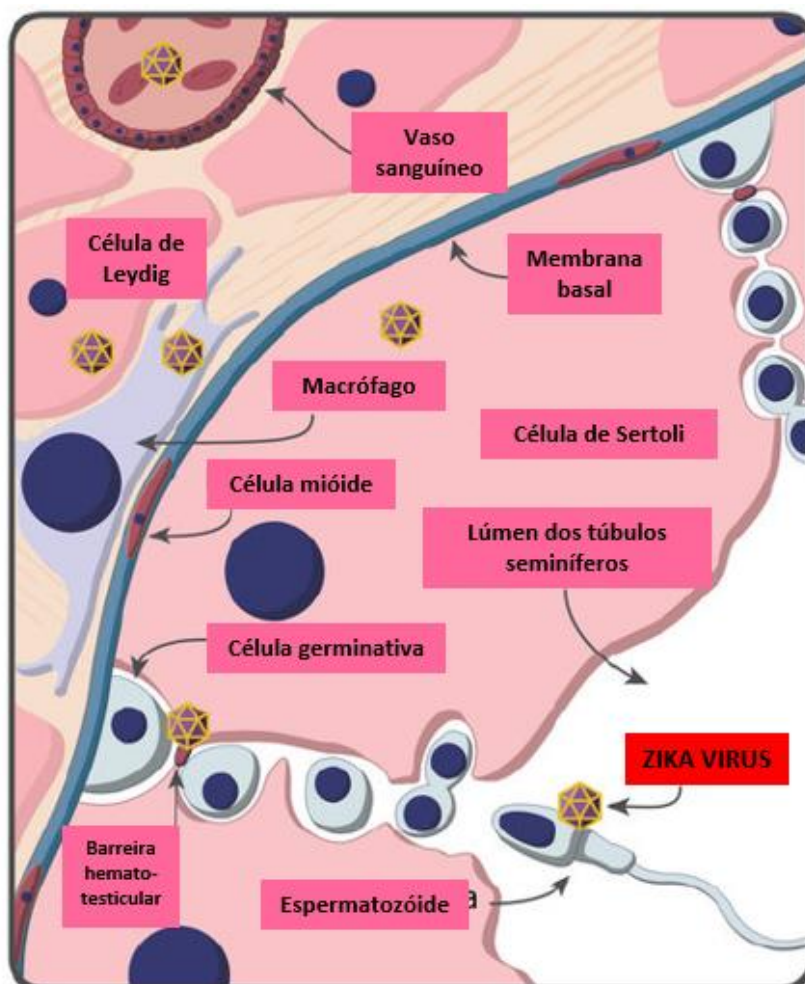
Algumas evidências indicam que o ZIKV chega ao testículo pela via hematogênica enquanto a infecção no epidídimo acontece via hematogênica/linfogênica<sup>(38)</sup>, promovendo danos testiculares, e resultando em uma redução da fertilidade em modelo de camundongos

<sup>(123)</sup>. Os efeitos da infecção por ZIKV no testículo também são identificados na fase crônica em modelos animais. Esta hipótese é corroborada pelo fato de ter sido observada inflamação crônica testicular (orquite) em estágio final em camundongos infectados com ZIKV com 35 e 70 dias após a infecção <sup>(131)</sup>.



**Figura 19:** Barreira hemato-testicular: corte histológico do túbulo seminífero. Modificado de <http://www.reproducao.ufc.br/reprodm1.pdf> <sup>(129)</sup>.

Em camundongos foi comprovado que o ZIKV pode infectar tipos distintos de células do TRM, preferencialmente espermatogônias, espermatócitos primários e células de Sertoli <sup>(37, 132)</sup>. A Figura 20 representa um corte de uma porção do túbulo seminífero mostrando as células que possivelmente suportam a replicação do vírus. Possivelmente o ZIKA chega ao testículo por vasos sanguíneos e inicia a infecção em células como macrófagos testiculares e células de Leydig. Após conseguir invadir a BHT, o vírus consegue infectar, se reproduzir e permanecer no interior das células de Sertoli e em células germinativas, além disso, espermatozoides maduros também podem ser infectados <sup>(123)</sup>.



**Figura 20** - Potenciais reservatórios de ZIKV no trato reprodutor masculino. Modificado de: Stassen et al <sup>(123)</sup>.

## 7. DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL DO ZIKV

### 7.1. Diagnóstico clínico

O diagnóstico clínico da infecção pelo ZIKV é feito pela anamnese do paciente, verificando se vive ou viajou para áreas endêmicas e inquirindo sobre contatos sexuais atuais, bem como possibilidade de exposição ao vetor e pela observação dos sinais e sintomas<sup>(133)</sup>. Devido aos sintomas da infecção pelo ZIKV serem semelhantes a outros arbovírus, como DENV e CHIKV (Tabela 3), bem como da presença de outras doenças que provocam processos febris agudos, o diagnóstico clínico diferencial (Tabela 4) torna-se amplo e complicado, sendo por isso necessários exames laboratoriais para auxiliar no diagnóstico diferencial <sup>(134)</sup>.

**Tabela 3** - Frequência dos principais sinais e sintomas ocasionados pela infecção pelos vírus da Dengue, Zika e Chikungunya.

Sinais/Sintomas	Dengue	Zika	Chikungunya
Febre (duração)	Acima de 38°C (4 a 7 dias)	Sem febre ou subfebril ≤ 38°C (1-2 dias subfebril)	Febre alta > 38°C (2-3 dias)
Manchas na pele (Frequência)	Surge a partir do quarto dia 30-50% dos casos	Surge no primeiro ou segundo dia 90-100% dos casos	Surge 2-5 dia 50% dos casos
Dor nos músculos (Frequência)	+++/>+++	++/>+++	+/>+++
Dor na articulação (frequência)	+/>+++	++/>+++	+++/>+++
Intensidade da dor articular	Leve	Leve/Moderada	Moderada/Intensa
Edema da articulação	Raro	Frequente e leve intensidade	Frequente e de moderada a intenso
Conjuntivite	Raro	50-90% dos casos	30%
Cefaleia (Frequência e intensidade)	+++	++	++
Prurido	Leve	Moderada/Intensa	Leve
Hipertrofia ganglionar (frequência)	Leve	Intensa	Moderada
Discrasia hemorrágica (frequência)	Moderada	ausente	Leve
Acometimento Neurológico	Raro	Mais frequente que Dengue e Chikungunya	Raro (predominante em Neonatos)

Fonte: Brito C <sup>(135)</sup>.

**Tabela 4** - Diagnóstico diferencial para ZIKV.

BACTÉRIAS	VÍRUS	OUTROS
<ul style="list-style-type: none"> <li>•Febre Escarlatina</li> <li>•Meningococemia</li> <li>•Febre Tifóide</li> <li>•Leptospirose</li> <li>• Rickettsias</li> <li>•Septicemias bacterianas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Dengue</li> <li>•Chikungunya</li> <li>•Influenza</li> <li>•Enterovírus</li> <li>•HIV</li> <li>•Sarampo</li> <li>•Rubéola</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Febre do Nilo Ocidental</li> <li>•Epstein Baar Vírus</li> <li>•Parvovírus</li> <li>•Roséola Vírus</li> <li>•Adenovírus</li> <li>•Outras Alphaviruses</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>•Malária</li> <li>• Doenças Reumatológicas</li> </ul>

Fonte: Charles C <sup>(136)</sup>.

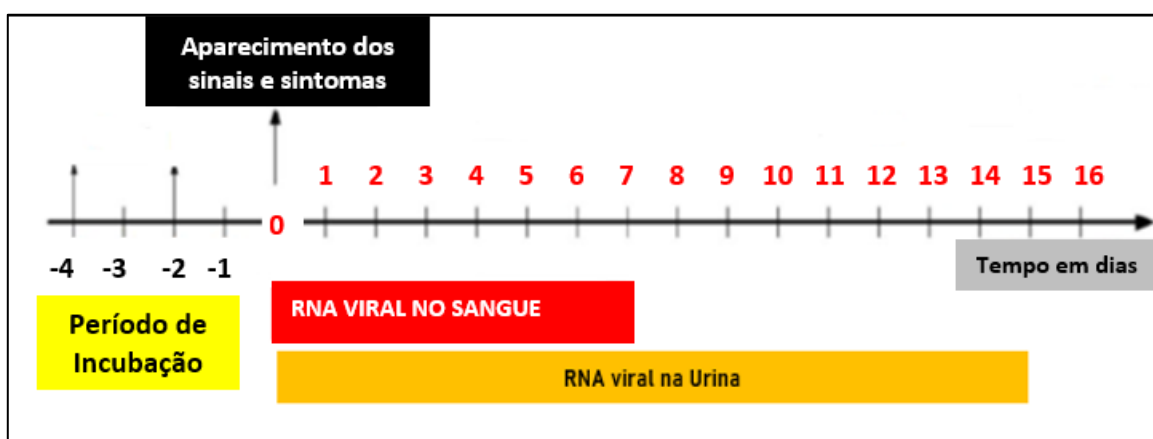


## 7.2. Diagnóstico laboratorial

Em uma infecção pelo ZIKV podem ocorrer alterações inespecíficas em exames laboratoriais, como: hipoalbuminemia, aumento das transaminases, leucopenia, trombocitopenia, aumento da desidrogenase láctica e de marcadores de atividade inflamatória. O diagnóstico laboratorial das infecções pelo ZIKV pode ser realizado por método direto que visa identificar o vírus ou por métodos indiretos, os quais consistem na detecção de anticorpos específicos do tipo IgM e Imunoglobulina G (IgG) decorrentes da infecção <sup>(76)</sup>.

### 7.2.1. Método direto

Teste molecular é um teste direto, também conhecido como PCR (*Polimerase-Chain-Reaction*). Baseia-se na detecção e as vezes quantificação do RNA do ZIKV a partir de espécimes clínicos. O período virêmico é curto, sendo ideal que a detecção direta do RNA do ZIKV vírus ocorra até o 7º dia após o início dos sintomas. A janela de detecção poderá ser diferente conforme o material biológico a ser analisado, como no sangue de 5 a 7 dias após o início dos sintomas e urina em até 15 dias <sup>(137, 138)</sup> (Figura 21).

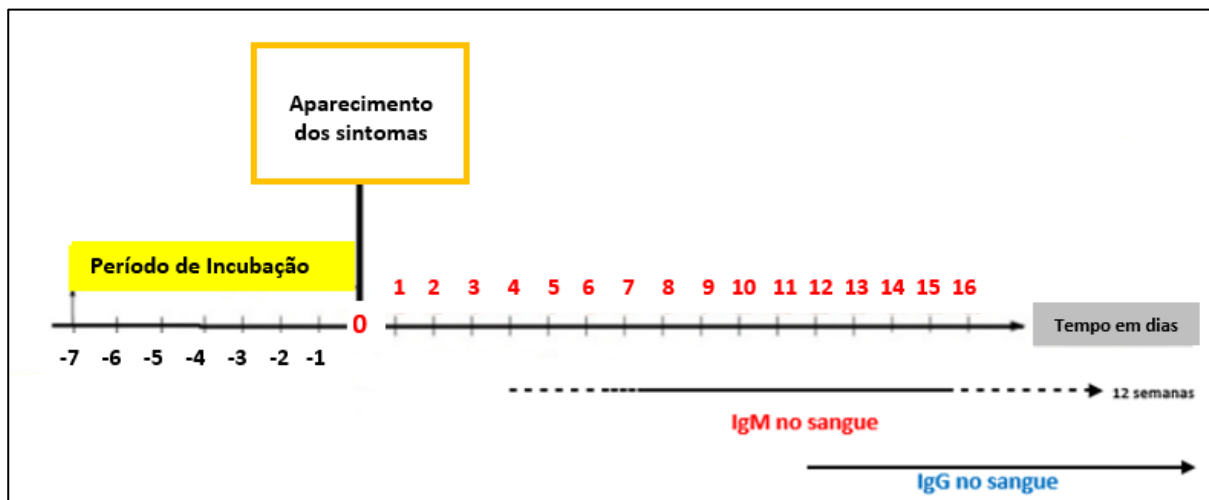


**Figura 21** - Diagnóstico do ZIKV de acordo com o tempo de evolução dos sintomas: método molecular. Modificado de FREITAS, K<sup>(139)</sup>.

Vários estudos sugerem que o RNA do ZIKV pode ser detectado por períodos mais longos no sangue total do que no plasma, expandindo assim a detecção do genoma viral em até 120 dias após o início dos sintomas <sup>(140-144)</sup>. Um teste molecular negativo não exclui isoladamente a infecção, devido ao curto período da viremia, sendo necessário realizar a pesquisa de anticorpos no caso de suspeita clínica <sup>(49, 145)</sup>.

### 7.2.2. Métodos indiretos

O diagnóstico por método indireto consiste em testes sorológicos para pesquisa de anticorpos, como o MAC-ELISA (CDC) para detecção de anticorpos específicos contra o ZIKV, a imunofluorescência indireta (IFI), o teste de neutralização e redução de placa (PRNT - *Plaque reduction neutralization test*) para detecção de anticorpos neutralizantes, e testes para a detecção de IgM ou IgG (ELISA e teste imunocromatográfico)<sup>(49, 145)</sup>. Nestes procedimentos, os anticorpos podem ser detectáveis após 4 dias de infecção até 12 semanas (Figura 22). Porém, é importante ressaltar que as metodologias indiretas podem apresentar resultados falso-positivos devido às reações cruzadas com outros vírus da mesma família, como o vírus da DENV e da YFV. Por isso, é importante que na interpretação dos resultados seja levado em consideração a sensibilidade e especificidade do teste utilizado, seguindo os parâmetros relatados pelos fabricantes <sup>(145)</sup>.



**Figura 22** - Diagnóstico do ZIKV de acordo com o tempo de evolução dos sintomas: método sorológico. Modificado de Modificado de FREITAS, K<sup>(139)</sup>.

Os anticorpos IgM direcionados contra o ZIKV normalmente se desenvolvem durante a primeira semana da doença, no entanto, existem dados publicados relatando uma duração maior, como o estudo de Paz-Bailey et al <sup>(137)</sup>, onde 97% dos pacientes com infecção sintomática pelo ZIKV apresentaram anticorpos IgM detectáveis > 60 dias após o início dos sintomas. No estudo de Griffin et al <sup>(146)</sup>, 73% das pessoas com infecção confirmada pelo ZIKV apresentaram anticorpos IgM detectáveis em 12–19 meses após a fase aguda. Sendo assim, a detecção de anticorpos IgM não é recomendada para mulheres grávidas assintomáticas, pois poderá refletir uma infecção passada e não o seu estado atual <sup>(147, 148)</sup>.

A curta duração da viremia com baixas cargas virais no sangue, reações cruzadas com outros *Flavivirus* em testes sorológicos e dificuldades em acessar testes diagnósticos

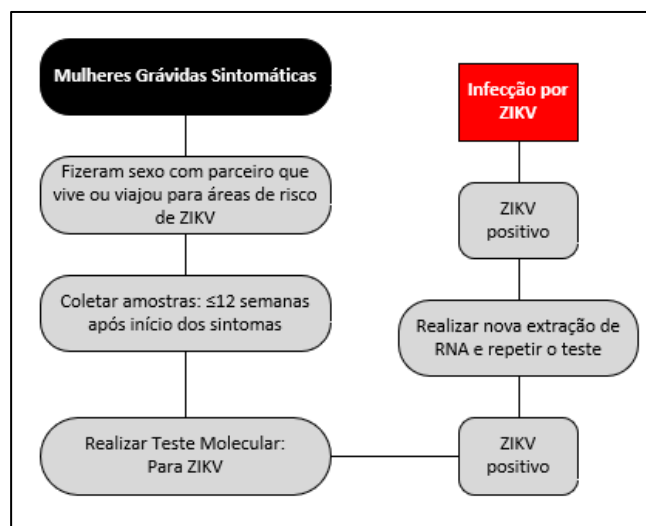
específicos e precisos atrasaram ou dificultaram a confirmação laboratorial de casos clínicos típicos de SCZ<sup>(146)</sup>. O PRNT é considerado o teste mais sensível e específico para a detecção e quantificação dos anticorpos neutralizantes, sendo o método de referência para a avaliação da resposta imune protetora após a vacinação. Os anticorpos neutralizantes se desenvolvem logo após os anticorpos IgM e consistem principalmente em anticorpos IgG, que geralmente conferem imunidade de longa duração<sup>(149, 150)</sup>. O PRNT positivo para ZIKV e negativo para DENV em sangue materno é o critério de confirmação para SCZ. Na testagem da criança, o CDC recomenda que seja executado após os 18 meses de idade, quando os anticorpos maternos não estiverem mais presentes em sua circulação. Se o RNA e o IgM do ZIKV forem negativos, é improvável que a criança tenha SCZ<sup>(151-153)</sup>.

### 7.2.3. Recomendações internacionais

Dada a situação epidemiológica atual dos arbovírus, onde os casos relatados de ZIKV nas Américas diminuíram 30-70 vezes, sendo superados em número pelos casos de DENV (proporção 200:1), o CDC<sup>(147)</sup> atualizou em novembro de 2019 suas orientações de testes diagnósticos para ZIKV e DENV:

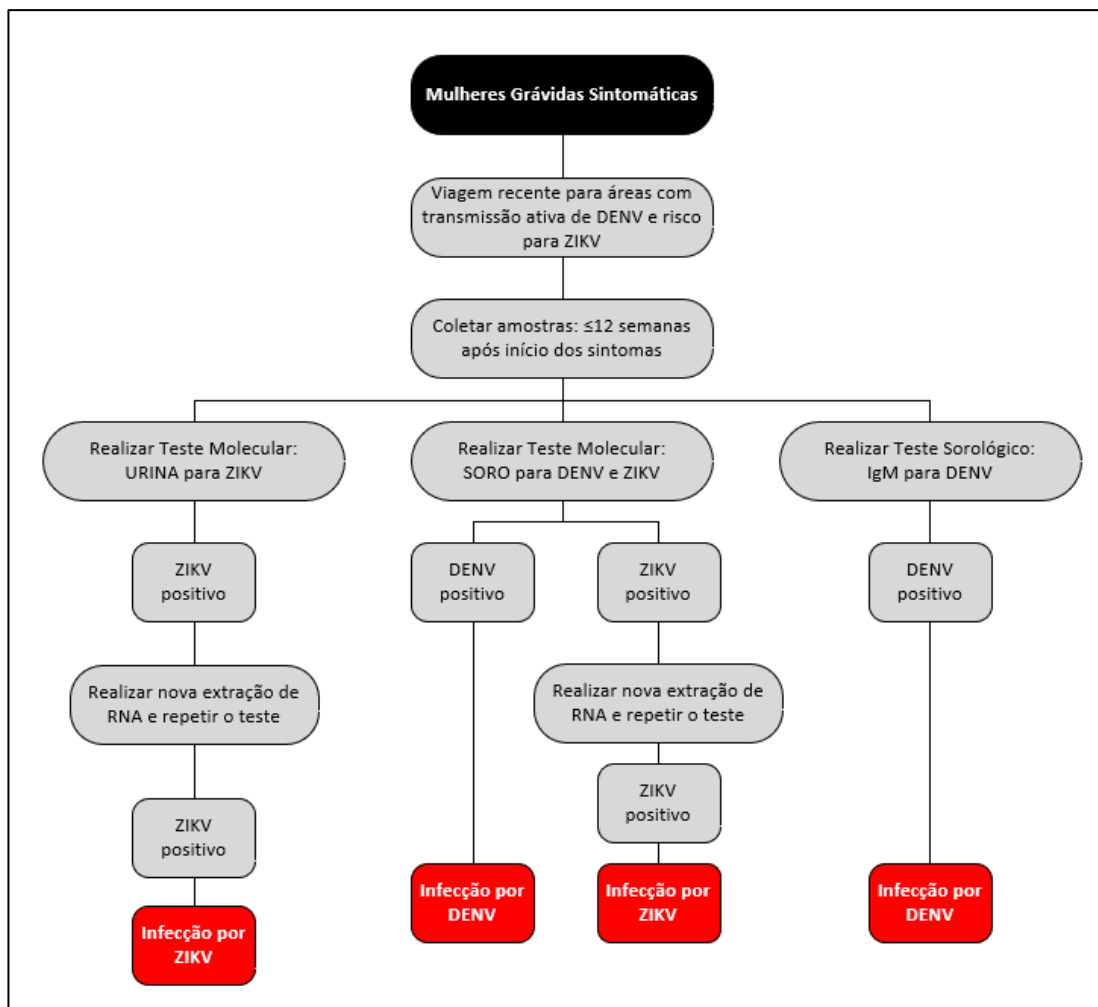
- a) Protocolo recomendado para mulheres grávidas sintomáticas que fizeram sexo com alguém que vive ou viajou recentemente para áreas com risco de ZIKV (Esquema 5):
- As amostras devem ser coletadas em até 12 semanas após o início dos sintomas;
  - Realizar o teste molecular para ZIKV e se for positivo, deverá ser repetido no RNA recém-extraído da mesma amostra para descartar resultado falso-positivo.

**Esquema 5** - Recomendações para testes de ZIKV para mulheres grávidas sintomáticas que fizeram sexo com parceiro que vive ou viajou para áreas de risco para ZIKV.



- b) Protocolo recomendado para mulheres grávidas sintomáticas que viajaram para área com transmissão ativa de DENV ou risco para ZIKV (Esquema 6):
- As amostras devem ser coletadas em até 12 semanas após o início dos sintomas;
  - Realizar simultaneamente: teste molecular para DENV e ZIKV em uma amostra de soro e teste molecular para ZIKV em uma amostra de urina, e teste de IgM para DENV.
  - Se o teste molecular do ZIKV for positivo em uma única amostra, deverá ser repetido no RNA recém-extraído da mesma amostra para descartar resultado falso-positivo;
  - Se o teste molecular da DENV for positivo, isso fornece evidências adequadas de uma infecção por DENV e nenhum outro teste é indicado;
  - Se o teste de anticorpos IgM para DENV for positivo, é uma evidência adequada de infecção por DENV e nenhum teste adicional é indicado.

**Esquema 6** - Recomendações para testes de DENV e ZIKV para mulheres grávidas sintomáticas com viagem recente para áreas de transmissão ativa da DENV e risco para ZIKV.

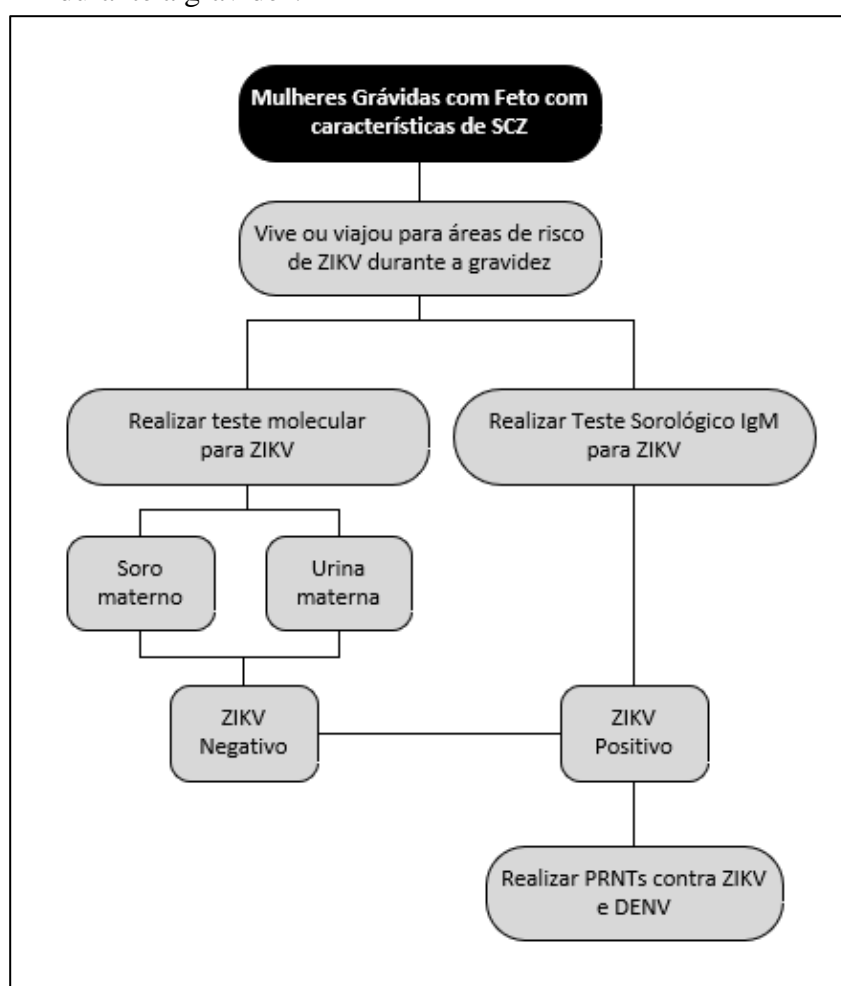


Fonte: CDC. Disponível em: <https://www.cdc.gov/zika/hc-providers/testing-guidance.html> <sup>(147)</sup>.

c) Protocolo recomendado para mulheres grávidas que têm um feto com achados de ultrassom pré-natal consistentes com SCZ que vivem ou viajaram para áreas com risco de ZIKA durante a gravidez (Esquema 7):

- Realizar o teste molecular e IgM do ZIKV no soro materno;
- Realizar o teste molecular ZIKV na urina materna;
- Se os testes moleculares para ZIKV forem negativos e o IgM for positivo, PRNTs de confirmação devem ser realizados contra ZIKV e DENV.

**Esquema 7** - Recomendações de testes de ZIKV para mulheres grávidas têm um feto com achados de ultrassom pré-natal consistentes com SCZ que vivem ou viajaram para áreas com risco de ZIKA durante a gravidez.

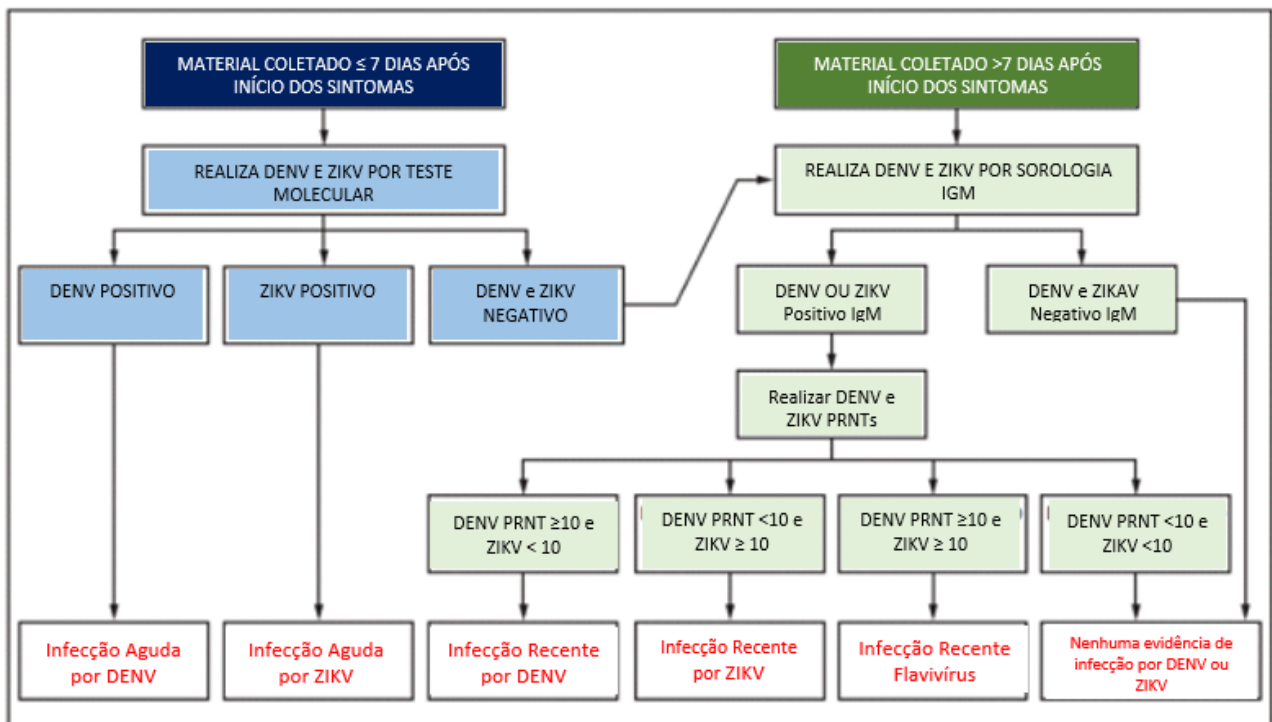


Fonte: CDC. Disponível em: <https://www.cdc.gov/zika/hc-providers/testing-guidance.html> <sup>(147)</sup>.

d) Recomendações para testes de DENV e ZIKV para pessoas não grávidas (sintomáticas) com uma doença clinicamente compatível e risco de infecção por ambos os vírus, (Esquema 8):

- Devem ser realizados com soro coletado  $\leq 7$  dias após o início dos sintomas, podendo também ser realizados no plasma, sangue total, líquido cefalorraquidiano ou urina;
- Realizar simultaneamente: teste molecular para DENV e ZIKV;
- Se o teste molecular da DENV for positivo, isso fornece evidências adequadas de uma infecção por DENV e nenhum outro teste é indicado;
- Se o teste molecular do ZIKV for positivo, isso fornece evidências adequadas de uma infecção por ZIKV e nenhum outro teste é indicado;
- Se os testes moleculares para DENV e ZIKV forem negativos, realizar sorologia IgM para ambos;
- Se a amostra for coletada após 7 dias do início dos sintomas, realizar sorologia IgM para DENV e ZIKV;
- Se IgM positivo para DENV e/ou ZIKV, realizar PRNT para ambos;
- Nas Tabelas 5 e 6 estão descritas a interpretação dos resultados.

**Esquema 8** - Recomendações para testes de DENV e ZIKV para pessoas não grávidas com uma doença clinicamente compatível e risco de infecção por ambos os vírus.



Fonte: Sharp et al. Disponível: [https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/68/rr/rr6801a1.htm?s\\_cid=rr6801a1\\_w](https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/68/rr/rr6801a1.htm?s_cid=rr6801a1_w) <sup>(154)</sup>.

**Tabela 5** - Interpretação dos resultados dos testes moleculares para o diagnóstico da DENV e ZIKV para pacientes com doença clinicamente compatível e risco de infecção por ambos os vírus.

<b>DENV e ZIKV teste molecular</b>	<b>Interpretação</b>
DENV + ZIKV -	Infecção aguda por DENV
ZIKV + DENV -	Infecção aguda por ZIKV
DENV + ZIKV +	Infecção aguda por DENV e co-infecção por ZIKV
DENV - ZIKV -	Nenhuma evidência de infecção por DENV ou ZIKV

Fonte: Sharp et al. Disponível: [https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/68/rr/rr6801a1.htm?s\\_cid=rr6801a1\\_w](https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/68/rr/rr6801a1.htm?s_cid=rr6801a1_w) <sup>(154)</sup>

**Tabela 6** - Interpretação dos resultados dos testes de sorologia IgM e PRNT para o diagnóstico da DENV e ZIKV para pacientes com doença clinicamente compatível e risco de infecção por ambos os vírus.

<b>DENV e ZIKV Anticorpos IgM</b>	<b>DENV PRNT</b>	<b>ZIKV PRNT</b>	<b>Pacientes sintomáticos (não grávidas)</b>
DENV e/ou ZIKV +	≥10	<10	Infecção recente por DENV
DENV e/ou ZIKV +	<10	≥10	Infecção recente por ZIKV
DENV e/ou ZIKV +	≥10	≥10	Infecção recente por <i>Flavivírus</i>
Qualquer resultado	<10	<10	Nenhuma evidência de infecção por DENV ou ZIKV (*)
DENV + ZIKV -	não realizado		Provável infecção por DENV
ZIKV + DENV -	não realizado		Provável infecção por ZIKV
DENV + ZIKV +	não realizado		Provável infecção por <i>Flavivírus</i>
DENV + ZIKV não realizado	não realizado		Provável infecção por <i>Flavivírus</i>
ZIKV + DENV não realizado	não realizado		Provável infecção por <i>Flavivírus</i>
DENV - ZIKV -	não realizado		Nenhuma evidência de infecção por DENV ou ZIKV (*)
DENV - ZIKV não realizado	não realizado		Nenhuma evidência de infecção por DENV
ZIKV - DENV não realizado	não realizado		Nenhuma evidência de infecção por ZIKV

Fonte: Sharp et al. Disponível: [https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/68/rr/rr6801a1.htm?s\\_cid=rr6801a1\\_w](https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/68/rr/rr6801a1.htm?s_cid=rr6801a1_w) <sup>(154)</sup>

(\*) Na ausência de teste molecular, o teste de IgM ou anticorpos neutralizantes negativos em amostras coletadas  $\leq 7$  dias após o início da doença pode refletir a coleta antes do desenvolvimento de uma resposta de anticorpo detectável e não descarta a infecção.

## 8.0. ZIKA VÍRUS – TRATAMENTO E VACINA

### 8.1. Tratamento

Até o momento não há medicamento para o ZIKV, onde os sintomas são geralmente tratados com repouso, hidratação e medicamentos para reduzir a febre e dor<sup>(155)</sup>. No entanto, estudos estão sendo realizados com alguns fármacos com o intuito de reduzir a viremia no hospedeiro, de modo a serem usados racionalmente para profilaxia pós-exposição, prevenindo ou mitigando a gravidade de SCZ. De uma forma geral são três as indicações clínicas plausíveis para a utilização de um medicamento profilático/terapêutico contra ZIKV: 1) oferecer profilaxia ou profilaxia pós-exposição precoce; 2) para acelerar a eliminação viral, e 3) para reduzir gravidade da doença<sup>(156-158)</sup>. Dentre os medicamentos em estudo, segue as principais iniciativas (Tabela 7).

O antiviral sofosbuvir vem sendo testado experimentalmente em primatas não humanos *Macaca mullata*, popularmente conhecida como macaco *Rhesus*. Particularmente, são investigados os efeitos da administração do fármaco antes e após a infecção pelo ZIKV em macacas grávidas. Por meio de análises clínicas, laboratoriais e de ultrassom, o estudo deve esclarecer se o sofosbuvir é capaz de reduzir as taxas de viremia nos animais, assim como prevenir a microcefalia e outros danos neurológicos aos fetos<sup>(159)</sup>.

Pesquisadores do Departamento de Virologia e Terapia Experimental da Fiocruz de Pernambuco descobriram uma substância capaz de bloquear a produção do ZIKV em células epiteliais e neurais, a 6-metilmercaptapurina ribosídica (6MMPr), que tem ação sobre o tipo de ZIKV que circula no Brasil. Em ensaios *in vitro* com células epiteliais e neurais, os cientistas testaram o 6MMPr em diferentes tempos e dosagens. O resultado foi a diminuição da carga viral em mais de 99%, em ambas as linhas celulares<sup>(160)</sup>.

Em alguns estudos a cloroquina preveniu a infecção pelo ZIKV em células progenitoras neurais humanas (hnCPs) e inibiu sua autofagia<sup>(161, 162)</sup>. Já no estudo de Tong et al<sup>(163)</sup>, a droga merimepodib, que é uma enzima envolvida na síntese de novos nucleotídeos de guanina e que tem atividade antiviral *in vitro* e vírus de RNA, inibiu a replicação do ZIKV em células Vero, especialmente quando usada em combinação com outros antivirais, como a ribavirina. Ainda, Xu et al<sup>(164)</sup>, relataram que a niclosamida tem a capacidade de inibir a replicação do ZIKV.



**Tabela 7** - Lista de medicamentos com potencial para ação anti-ZIKV.

Grupo de Drogas	Nome da Droga	Descrição
Análogo de nucleosídeos	Sofosbuvir	1)Inibe a replicação do ZIKV em ensaios celulares 2)Eficaz em modelos animais
	Ribavirina	Mostrou ação antiviral em cultura de células.
Agentes peptidomiméticos	CN-716	1)Inibe a protease do ZIKV <i>in vitro</i> , mas inibe apenas fracamente a replicação viral. 2)Por questões de segurança, não deve ser uma opção terapêutica para gestantes,mas pode ser aplicado a outros indivíduos infectados.
Análogo de adenosina	NIT008	1)Mostrou atividade anti-ZIKV potente. 2)Pode servir como um inibidor de referência para pesquisa e triagem de drogas futuras.
Dependente de ciclina inibidor de quinase	PHA-690509	Mostrou inibição da replicação do ZIKV de todas as linhagens.
Antimalária	Cloroquina	1)Reduz a produção de vírus, o número de células infectadas e a morte celular promovida pela infecção por ZIKV sem qualquer efeito citotóxico. 2)Candidato promissor para ensaios clínicos de ZIKV. 3)Pode ser administrado com segurança em mulheres grávidas, uma vez que é clinicamente aprovado.
Anti-helmíntico	Bitinol	Propaga-se ativando caspases do hospedeiro e induzindo a morte celular programada.
	Nicosamida	Bloquea a ação do ZIKV em células humanas.
Galato de epigallocatequina		1)Composto natural encontrado em alimentos, principalmente chá verde. 2)Inibe a entrada do ZIKV na célula hospedeira.
Tiopurinas	6MMPr	1)Em mais de 99% dos testes a produção do vírus diminuiu com a 6MMPr, usando diferentes dosagens e tempos de reação. 2)É menos tóxica para as células neurais, sendo um bom indicativo para futuros tratamentos de infecções no sistema nervoso.
Enzima	Merimepodib	É uma enzima envolvida na síntese de novos nucleotídeos de guanina e que tem atividade antiviral <i>in vitro</i> e vírus de RNA, na inibição da replicação do RNA do ZIKV e na redução da produção de ZIKV em células Vero.

Fonte: Modificada de Wilder-Smith et al<sup>(158)</sup>.

## 8.2 Vacina

Após a OMS declarar em de fevereiro de 2016 o estado de ESPII foi destacada a necessidade urgente de pesquisa e desenvolvimento de soluções preventivas e terapêuticas para a doença pelo ZIKV. No período que se seguiu a este apelo à ação, a comunidade científica global respondeu com a introdução de 45 vacinas candidatas, algumas das quais passaram para testes clínicos em humanos após demonstrarem resultados promissores em modelos animais de

modo a prevenir a transmissão materno-fetal e gerar imunidade no receptor da vacina, tendo então como produto alvo a imunização de mulheres em idade reprodutiva. Além da necessidade de realizar testes clínicos adicionais, alguns obstáculos permanecem, como por exemplo, o número limitado de casos que ocorrem globalmente prejudicando a capacidade dos estudos de avaliar os efeitos protetores das vacinas em testes humanos de fase clínica 3 <sup>(165)</sup>.

Segundo o Instituto Butantã <sup>(166)</sup>, existem 3 etapas para a disponibilização de uma vacina ao público: a primeira etapa corresponde à pesquisa básica e onde novas propostas de vacinas são identificadas; segunda etapa, onde ocorrem os testes pré-clínicos (*in vitro* e/ou *in vivo*) que têm por objetivo demonstrar a segurança e o potencial imunogênico da vacina; terceira etapa, onde acontecem os ensaios clínicos, que é a mais longa e a mais cara do processo, sendo classificados em estudos de Fase I, Fase II, Fase III e Fase IV, como segue:

- Fase I: é o primeiro estudo a ser realizado em seres humanos e tem por objetivo principal demonstrar a segurança da vacina;
- Fase II: tem por objetivo estabelecer a sua imunogenicidade;
- Fase III: é a última fase de estudo antes da obtenção do registro sanitário e tem por objetivo demonstrar a sua eficácia. Somente após a finalização do estudo de fase III e obtenção do registro sanitário é que a nova vacina poderá ser disponibilizada para a população;
- Fase IV: vacina disponibilizada para a população.

Apesar da comunidade científica estar dispensando grandes esforços no desenvolvimento de uma vacina para ZIKV, ainda não há nenhuma aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA). Grande parte das pesquisas em andamento para o desenvolvimento de uma vacina para ZIKV são focadas nas proteínas E M, que são os principais alvos das vacinas com a capacidade de induzir os anticorpos neutralizantes que medeiam proteção e imunidade de longa duração <sup>(167)</sup>.

Vários ensaios de vacinas ainda estão em andamento em modelos animais para estabelecer proteção imunogênica contra o ZIKV, mas nenhuma vacina específica ainda foi considerada eficaz (Tabela 8). Atualmente, várias vacinas candidatas estão em andamento <sup>(168)</sup>, conforme descritas na Tabela 9.

**Tabela 8** - Plataformas de vacinas para infecção do ZIKV.

Tipo de Vacina p/ ZIKV	Vantagens	Limitações
<p><b>Vacina de ácido nucléico:</b></p> <p><b>*Plasmídeo de DNA</b> (Vacina sintética de DNA que codifica o ZIKV proteínas da pré-membrana (prM) e do envelope (E))</p> <p><b>*mRNA</b></p>	<p>1) facilidade de produção, uma vez que os genes codificados podem ser facilmente substituídos;</p> <p>2) potencial para ser produzida em escala mediante um surto;</p> <p>3) exibem características de vacinas de subunidades e vetores atenuados vivos, com vantagens conceituais de segurança.</p> <p>4) em estudos com primatas humanos, não foram verificados efeitos adversos e depois da terceira dose da vacina foram detectados anticorpos de ligação em todos os participantes, bem como anticorpos neutralizantes foram verificados em 62% dos mesmos.</p>	<p>1) Uma limitação das vacinas de plasmídeo de DNA é a entrega de tecnologia necessária para a produção ideal de proteínas;</p> <p>2) Uma preocupação potencial com vacinas de DNA é que pode haver uma pequena possibilidade de integração cromossômica por não recombinação homóloga, que pode levar a transformação celular por mutagênese de inserção. Já as vacinas à base de moléculas de mRNA atuam no citoplasma e, portanto, não representam um risco de integração somática.</p>
<p><b>Vacinas de vírus inteiro purificadas e inativadas (PIV)</b></p>	<p>O processo de inativação elimina a replicação do vírus enquanto mantém a antigenicidade da estrutura das proteínas e, portanto, PIV são considerados seguros durante gravidez.</p>	<p>1) Embora as vacinas ZIKV PIV sejam mais baratas do que as vacinas de ácido nucleico, é plausível que possam exigir doses múltiplas em um cronograma primário, de modo a aumentar a imunogenicidade e reforços para manter a imunidade protetora.</p> <p>2) Como o ZIKV é um vírus neurotrópico, as etapas de neurovirulência e testes de toxicologia reprodutiva são críticas no desenvolvimento de atenuações de vacinas <i>in vivo</i> antes de serem administradas em humanos.</p>

<p><b>Candidatas a vacinas com vetor viral</b></p>	<p>1)As vacinas de vetores virais compartilham a mesma facilidade de produção e estabilidade que as vacinas de plasmídeo de DNA e pode, portanto, ser facilmente escalonável em situações epidêmicas.</p> <p>2)As vacinas de vetor viral induzem tanto respostas inatas quanto respostas imunes adaptativas em hospedeiros mamíferos.</p> <p>3)Os vetores adenovirais têm sido usados para entregar ZIKVprM-E e mostraram ter maior neutralidade, títulos de anticorpos e imunidade de células T do que PIV,DNA e vacinas de subunidade de proteína.</p>	<p>As limitações para vacinas de adenovírus incluem sua capacidade de induzir respostas inflamatórias tóxicas e o potencial para imunidade natural pré-existente, resultando em imunogenicidade atenuada.</p>
<p><b>Proteína de subunidade / partículas semelhantes a vírus (VLPs)</b></p>	<p>1)As vacinas de proteína de subunidade são atraentes como plataforma devido ao seu potencial para uso seguro em todas as populações,incluindo mulheres grávidas.</p> <p>2)As vacinas de proteína de subunidade são produzidas por transferência de um plasmídeo que codifica uma sequência de gene de interesse em bactérias, leveduras ou células de insetos, onde dentro dessas células é produzida a proteína da sequência do gene.</p> <p>3)A vantagem de VLPs é que os antígenos são apresentados em sua conformação nativa sem a necessidade de uma replicação do vírus.</p>	<p>Semelhante à abordagem PIV,uma desvantagem das vacinas de proteína de subunidade é que são geralmente menos imunogênicos do que vacinas vivas e, portanto, requerem doses múltiplas para alcançar imunidade protetora.</p>

**Vacinas vivas atenuadas incluindo vacinas recombinantes vetoriais de *Flavivirus* heterólogos**

1) Vacinas vivas atenuadas são geralmente uma vacina de tecnologia favorita devido à sua capacidade de induzir a imunidade adaptativa, além de serem eficazes e relativamente com baixo custos de produção.

2) Vacinas vivas imitam as infecções naturais dos vírus e, portanto, induzem uma forte resposta imunológica.

3) As vacinas atenuadas podem desempenhar um papel significativo no atingimento de grandes massas, podendo ser incorporada em programas de vacinação infantil em países com transmissão ZIKV.

4) As vacinas vivas atenuadas competentes para replicação são disponíveis para *Flavivirus* recombinantes ou quiméricos.

5) A vacina recombinante DENV-ZIKV pode ser útil para populações que vivem em regiões endêmicas para ambos os vírus.

No entanto, vacinas vivas atenuadas podem induzir a uma viremia transitória de baixo grau. Como CZS pode ocorrer em mulheres grávidas assintomáticas infectadas com viremia de baixo grau, vacinas atenuadas precisam ser cuidadosamente avaliadas antes da administração em mulheres em idade reprodutiva e/ou grávida.

**Tabela 9** – Status de desenvolvimento de vacina contra o ZIKV.

<b>Desenvolvedor</b>	<b>Fase</b>	<b>Tipo de vacina</b>
<i>National Institute of Allergy and Infectious Diseases</i>	Ensaio clínico Fase II	Vacina de DNA
<i>Walter Reed Army Institute of Research</i>	Ensaio clínico Fase I	Vírus inteiro, purificado e inativado
<i>The US National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)</i>	Ensaio clínico Fase III (*)	Vacina viva atenuada contra ZIKV (uma vacina viral quimérica feita de vários genes de vírus diferentes, principalmente de sorotipos de dengue usando engenharia genética).
Centro de Pesquisa de Vacinas da NIAID em colaboração com <i>GlaxoSmithKline (GSK)</i> , <i>University of Pensilvânia</i> e <i>Moderna / Valera</i>	Ensaio simultâneo Fase I e Fase II	Vacina mRNA
SEEEK (empresa farmacêutica com sede em Londres), juntamente com <i>hVIVO</i> de Londres e <i>NIH Clinical Center</i> em <i>Bethesda, Maryland</i>	Fase pré-clínica	Vacina sintética (preparada com proteínas das glândulas salivares do mosquito)
<i>Oxford University</i>	Fase I da fase clínica	<i>Adenovírus</i> recombinante vivo
<i>Themis Bioscience</i>	Fase I da fase clínica	Sarampo vivo recombinante
<i>University of Adelaide</i>	Fase pré-clínica	Vacina baseada em Células T

(\*) está atualmente em fase de testes de Fase III no Brasil. Espera-se que esta vacina ser eficaz contra o ZIKV e os quatro sorotipos de DENV.

Fonte: Modificado de Smarajit Manna et al <sup>(168)</sup>.

## 9. JUSTIFICATIVA

O Zika vírus (ZIKV) é um flavivírus transmitido predominantemente por mosquito associado a anormalidades congênitas em recém-nascidos e síndrome de Guillain-Barré em adultos. O vírus também pode ser transmitido sexualmente e pode persistir no trato genital masculino. Estudos avaliando a cinética seminal do ZIKV de homens infectados, bem como em modelos animais e celulares de infecção, mostraram que, além do testículo e do epidídimo, a próstata e a vesícula seminal também podem estar envolvidas na infecção persistente pelo ZIKV. Além disso, alguns estudos relataram que homens infectados com ZIKV podem apresentar sintomas geniturinários, como hematospermia, prostatite, ejaculação dolorosa, secreção peniana e oligospermia. No entanto, pouco se sabe sobre o efeito do ZIKV na fertilidade masculina e muitas questões permanecem sem resposta. Como o surto de ZIKV de 2016 ocorreu há apenas alguns anos e os cientistas continuam a monitorar homens afetados pelo vírus, novos estudos são necessários para expandir nosso conhecimento limitado sobre a infecção pelo ZIKV no trato reprodutivo masculino e determinar os efeitos de longo prazo desse patógeno na fertilidade masculina. Desta forma, compreender a fisiopatologia e os mecanismos subjacentes às infecções por ZIKV em homens é crucial para o desenvolvimento de diretrizes, vacinas e terapias eficazes. Nesta tese abordamos os conhecimentos atuais sobre a infecção pelo ZIKV no trato reprodutor masculino e sua influência nos parâmetros do espermatozoide e na fertilidade, bem como seus efeitos na reprodução assistida. Para isto, focamos em estudos atuais sobre positividade e infectividade do ZIKV em humanos, animais e em cultura de células, e destacamos as evidências da infecção ZIKV em células específicas do trato reprodutor masculino.

## **10. OBJETIVOS**

### **10.1 Geral**

Estudar a história natural da infecção pelo Zika vírus (ZIKV) no trato reprodutor masculino e sua influência nos parâmetros do esperma e na fertilidade, bem como seus efeitos na reprodução assistida.

### **10.2 Específicos**

- a. Ampliar conhecimentos e auxiliar na compreensão da história natural da infecção por ZIKV no trato reprodutor masculino;
- b. Fornecer subsídios que contribuam para a elaboração de estratégias de Saúde Pública para prevenção e controle do ZIKV bem como de suas possíveis consequências especialmente para a população de risco para complicações e/ou agravamentos do quadro viral;
- c. Fornecer insumos e novos desafios que alimentarão futuros estudos sobre ZIKV, sistema reprodutor masculino e rotas de transmissão viral;
- d. Identificar publicações científicas nas bases de dados sobre a infecção pelo ZIKV no trato reprodutor masculino por meio de revisão sistemática da literatura;
- e. Focar nas publicações científicas encontradas na revisão sistemática da literatura que abordem a positividade e a infectividade do ZIKV em humanos, animais e em cultura de células, bem como naqueles que apontem para evidências de infecção por ZIKV em células específicas do trato reprodutor masculino;
- f. Gerar no mínimo um (1) artigo científico com qualidade para publicação em periódicos científicos classificados como Qualis Referência B1 ou superior.



## 11. REFERÊNCIAS

1. Dick GWA, Kitchen SF, Haddock AJ. Zika virus. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952;46:509-20.
2. Cao-Larmeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry ALT, Mallet HP, et al. Zika virus, French Polynesia, South Pacific. 2013. *Emerg Infect Dis.* 2014;20:1085-6.
3. Oehler E, et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome-case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill: Bulletin European Sur Les Maladies Transmissibles, European Communicable Disease Bulletin.* 2015;v.19, n. 9.
4. Organização Panamericana de Saúde. Zika-Atualização Epidemiológica. 2017. [Acesso em: 20 Set. 2020]. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/images/stories/SalaZika/atualizacao%20033.pdf?ua=1>
5. World Health Organization. Zika Epidemiology Update - July 2019. [Acesso em: 21 Set. 2020]. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/diseases/zika/zika-epidemiology-update-july-2019.pdf?ua=1>
6. Centers For Disease Control And Prevention: Travelers'Health. [Acesso em: 04 Jan. 2021]. Disponível em: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/page/zika-information>
7. Esquerda. Países com transmissão comprovada do Zika atualmente ou no passado [Internet]. Janeiro 2016. [Acesso em: 04 Jan. 2021]. Disponível em: <https://www.esquerda.net/en/artigo/zika-uma-infografia/41081>
8. Brasil. Ministério da Saúde. Vírus Zika no Brasil – A resposta do SUS. [Internet]. Brasília (DF): 2017. [Acesso em: 21 Set. 2020]. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/virus\\_zika\\_brasil\\_resposta\\_sus.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/virus_zika_brasil_resposta_sus.pdf)
9. Garcia, LP. Epidemia do vírus zika e microcefalia no brasil: emergência, evolução e enfrentamento. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada – IPEA: 2018.
10. Brasil. Ministério da Saúde. Sistema DataSUS. [Acesso em: 10 Jan. 2021]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/zikabr.def>
11. Brasil. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico 52. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes Aegypti* (Dengue, Chikungunya e Zika), semanas epidemiológicas 1 a 52, Vol 52. Dezembro 2020. [Acesso em 25 Jan. 2021]. Disponível em: [https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2020/dezembro/28/boletim\\_epidemiologico\\_svs\\_52.pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2020/dezembro/28/boletim_epidemiologico_svs_52.pdf)
12. Brasil. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico 47. Situação epidemiológica da síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika em

- 2020, até a SE 45. Vol 51. Novembro 2020. [Acesso em: 03 Jan. 2021. Disponível em: [https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2020/dezembro/11/boletim\\_epidemiologico\\_svs\\_47.pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2020/dezembro/11/boletim_epidemiologico_svs_47.pdf)
13. Brasil. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico 51. Óbito por arboviroses no Brasil, 2008 a 2019. Vol 51, n.33. Agosto 2020. [Acesso em: 17 Set. 2020]. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/August/21/Boletim-epidemiologico-SVS-33.pdf>
  14. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico 51. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes Aegypti* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 34, 2020. Vol 51, n.36. Setembro 2020. [Acesso em: 17 Set. 2020]. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/September/11/Boletim-epidemiologico-SVS-36.pdf>
  15. Hasan SS, et al. Structural biology of Zika virus and other flaviviruses S. Nature Structural and Molecular Biology. 2018;v. 25, p. 13–20.
  16. Lee CY, Lisa FP. Zika virus: from an obscurity to a priority. Microbes and Infection. 2018; v. 20, n. 11–12, p. 635–645.
  17. Garcia-Blanco MA, Vasudevan SG, Bradrick SS, Nicchitta C. Flavivirus RNA transactions from viral entry to genome replication. Antiviral Res. 2016;134:244-9.
  18. Ashraf U, YE J, Ruan X, Wan S, Zhu B, Cao S. Usutu Virus: An Emerging Flavivirus in Europe. Viruses. 2015;v. 7, n. 1, p. 219–238.
  19. Christian KM, Song H, Ming GL. Pathophysiology and mechanisms of Zika virus infection in the nervous system. Annu Rev Neurosci. 2019;42:249-69.
  20. Almeida RN, Braz-de-Melo HÁ, Santos IO, Corrêa R, Gary P, Kobinger GP, Magalhaes KG. The Cellular Impact of the ZIKA Virus on Male Reproductive Tract Immunology and Physiology. Cells. 2020;9, 1006.
  21. Zhang N, Li C, Jiang S, Du L. Recent Advances in the Development of Virus-Like Particle-Based Flavivirus Vaccines. Vaccines. 2020;8, 481.
  22. Kostyuchenko VA, et al. Structure of the thermally stable Zika virus. Nature. 2016;v. 533, n. 7603, p. 425–428.
  23. Haddow AD, et al. Genetic Characterization of Zika Virus Strains: Geographic Expansion of the Asian Lineage. 2012;v. 6, n. 2.

24. Beaver J T, Lelutiu N, Habib R, Skountzou I. Evolution of Two Major Zika Virus Lineages: Implications for Pathology, Immune Response, and Vaccine Development. *Frontiers in Immunology*. 2018;v. 9, p. 1640.
25. Giovanetti M, Faria NR, Nunes MR, de Vasconcelos JM, Lourenço J, Rodrigues SG, et al. Zika virus complete genome from Salvador, Bahia, Brazil. *Infect Genet Evol*. 2016;41:142-5.
26. Calvez E, et al. Differential transmission of Asian and African Zika virus lineages by *Aedes aegypti* from New Caledonia. *Emerging Microbes and Infections*. 2018;v. 7, n. 1.
27. Esser-Nobis K, et al. Comparative analysis of African and Asian lineage-derived Zika Virus strains reveals differences in activation of and sensitivity to antiviral innate immunity. *Journal of Virology*. 2019;v. 93, n. 13, p. 1–18.
28. Hu T, et al. The Asian Lineage of Zika Virus: Transmission and Evolution in Asia and the Americas. *Virologica Sinica*. 2019;v. 34, n. 1, p. 1–8.
29. Vielle NJ, et al. Silent infection of human dendritic cells by African and Asian strains of Zika virus. *Scientific Reports*. 2018;v. 8, n. 1, p. 1–12.
30. Shao Q, et al. The African Zika virus MR-766 is more virulent and causes more severe brain damage than current Asian lineage and dengue virus. *Development*. 2017;v. 144, n. 22, p. 4114–4124.
31. Simonin Y, et al. Differential virulence between Asian and African lineages of Zika virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2017;v. 11, n. 9, p. e0005821.
32. Sheridan MA, et al. African and Asian strains of Zika virus differ in their ability to infect and lyse primitive human placental trophoblast. *PLoS ONE*. 2018;p. 1–18.
33. Calvez E et al. Differential transmission of Asian and African Zika virus lineages by *Aedes aegypti* from New Caledonia. *Emerging Microbes and Infections*. 2018;v. 7, n. 1.
34. Hery L, et al. Transmission potential of African, Asian and American Zika virus strains by *Aedes aegypti* and *Culex quinque fasciatus* from Guadeloupe (French West Indies). *Emerging Microbes and Infections*. 2019;v. 8, n. 1, p. 699–706.
35. Deckard DT, Chung WM, Brooks JT, Smith JC, Woldai S, Hennessey Morgan, Kwit N, Mead P. Male-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus - Texas, January 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016;65:372 – 374.
36. Mansuy J M, et al. Zika virus: High infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen? *The Lancet Infectious Diseases*. 2016;v. 16, n. 4, p. 405.

37. Govero J, Richner JM, Caine EA, Salazar V, Diamond MS, Esakky P, Schea\_er SM, Drury A, Moley KH, Fernandez E, et al. Zika virus infection damages the testes in mice. *Nature*. 2016;540, 438–442.
38. Tsetsarkin KA, et al. Routes of Zika virus dissemination in the testis and epididymis of immunodeficient mice. *Nature Communications*. 2018;v. 9, n. 1, p. 1–13.
39. Kasprzykowska JI, Fukutania KF, Fabio H, Fukutani ER, Costa LC, Andrade BB, Queiroz ATL. A recursive sub-typing screening surveillance system detects the appearance of the ZIKV African lineage in Brazil: Is there a risk of a new epidemic? *International Journal of Infectious Diseases*. 2020;vol 96, p579-581.
40. Tourinho, Raiz. Estudo identifica circulação de nova linhagem da Zika no Brasil. Fundação Oswaldo Cruz. [atualizado em 24 Jun.2020]. [Acesso em: 12 Jan. 2021]. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/estudo-identifica-circulacao-de-nova-linhagem-da-zika-no-brasil>
41. Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, et al. Biology of Zika virus infection in human skin cells. *J Virol*. 2015;89:8880-96.
42. Tappe D, Pérez-Girón JV, Zammarchi L, Rissland J, Ferreira DF, Jaenisch T, et al. Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. *Med Microbiol Immunol*. 2016;205:269-73.
43. Noorbakhsh F, Abdolmohammadi K, Fatahi Y, Dalili H, Rasoolinejad M, Rezaei F, et al. Zika virus infection, basic and clinical aspects: A review article. *Iran J Public Health*. 2019; 48:20-31.
44. Al-Tameemi K, Kabakli R. Zika virus: a brief review. *Asian journal Of pharmaceutical and clinical research*. 2020;v. 13, Issue 7.
45. Vogels CBF, Ruckert C, Cavany SM, Perkins TA, Ebel GD, Grubaugh ND. Arbovirus coinfection and co-transmission: A neglected public health concern? *PLoS Biol*. 2019;17(1): e3000130.
46. Agência FioCruz de Notícias. [Internet]. Pesquisa avalia transmissão simultânea de arboviroses. [Acesso em: 11 Jan. 2021]. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/pesquisa-avalia-transmissao-simultanea-de-arboviroses>
47. Silva MMO, Tauro LB, Kikuti M, Anjos RO, Santos VC, Gonçalves TSF, Paploski IAD, Moreira PSS, Nascimento LCJ, Campos GS, Ko AI, Weaver SC, Reis MG, Kitron U, Ribeiro GS. Concomitant Transmission of Dengue, Chikungunya, and Zika Viruses in Brazil: Clinical and Epidemiological Findings From Surveillance for Acute Febrile Illness. *Clinical Infectious Diseases*. 2019;v. 69, Issue 12, Page 2238.

48. Kutsuna S, Kato Y, Takasaki T, Moi M, Kotaki A, Uemura H, et al. Two cases of Zika fever imported from French Polynesia to Japan, December 2013 to January 2014. *Euro Surveill.* 2014;19(4).
49. Ioos S, Mallet HP, Leparac Goffart I, Gauthier V, Cardoso T, Herida M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Med Mal Infect.* 2014;44(7):302-7.
50. FenaSaúde. Guia ZIKA, DENGUE e CHIKUNGUNYA. [Internet]. [Acesso em: 15 Jan. 2021]. Disponível em: [https://www.editoraroncarati.com.br/v2/phocadownload/guia\\_zica\\_dengue\\_chikungunya\\_fenasaude\\_final\\_11072016.pdf](https://www.editoraroncarati.com.br/v2/phocadownload/guia_zica_dengue_chikungunya_fenasaude_final_11072016.pdf)
51. Morrison TE, Diamond MS. Animal Models of Zika Virus Infection, Pathogenesis, and Immunity. 2017;v. 91, n. 8, p. 1–15.
52. Muñoz LS, et al. Neurological Implications of Zika Virus Infection in Adults. *The Journal of infectious diseases.* 2017;v. 216, p. 897–905.
53. Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, Honein MA. Zika vírus. *N Engl J Med.* 2016; 374(16): 1552-1563.
54. World Health Organization. Zika virus, microcephaly and Guillain-Barre syndrome. [Situation report 10 March 2016]. [Acesso em: 23 Set. 2020]. Disponível em: <http://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/10-march-2016/en/>
55. Manual MSD. Síndrome de Guillain Barré. [atualizado em Out. 2019]. [Acesso em: 10 Jan.2021]. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt/casa/dist%C3%BArbios-cerebrais,-da-medula-espinal-e-dos-nervos/doen%C3%A7as-dos-nervos-perif%C3%A9ricos/s%C3%ADndrome-de-guillain-barr%C3%A9-sgb>
56. Willison HJ, Jacobs BC, Doorn PA. Guillain-Barré syndrome. *Lancet.* 2016;388: 717–27.
57. Chaval 24 hs. [Internet]. [Acesso em: 20 Dez. 2020]. Disponível em: <http://www.chaval24hrs.com.br/2016/02/entenda-o-que-e-sindrome-de-guillain.html>
58. Cao-Lormeau V, Blake A, Mons M, Lastère S, Roche C, Vanhomwegen J, et al. Guillain-Barré syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet.* 2016;387(10027): 1531-1539.
59. Oehler E, Watrin L, Larre P, Leparac-Goffart I, Lastere S, Valour F, et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill.* 2014;19(9): 20720.
60. Araújo TVB, Ximenes RAA, Miranda-Filho DB, Souza WV, Montarroyos UR, Melo APL, Valongueiro S, Albuquerque MFPM, Braga C, Brandão Filho SP. Association between

- microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil: Final report of a case-control study. *Lancet Infect Dis*. 2018;18, 328–336.
61. Teixeira TA, et al. Análise do conceito síndrome congênita pelo Zika vírus. *Ciênc. saúde coletiva*. 2020;v.25 no.2 Rio de Janeiro.
  62. Duarte G, Moron AF, Timerman A, Fernandes CE, Mariani Neto C, Almeida Filho GL, et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women and Microcephaly. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2017;39: 235–248.
  63. Araujo AQC, Silva MTT, Araujo APQC. Zika virus-associated neurological disorders: a review. *Brain a Journal of Neurology*. 2018;v. 139, p. 2122–2130.
  64. Hussain A, et al. A Comprehensive Review of the Manifestations and Pathogenesis of Zika Virus in Neonates and Adults. *Cureus*. 2018;v. 10, n. 9.
  65. Ahlers LRH, Goodman AG. The Immune Responses of the Animal Hosts of West Nile Virus: A Comparison of Insects, Birds, and Mammals. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2018;v. 8, p. 1–9.
  66. Marcondes CB, Ximenes MF. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes* (*Stegomyia*) mosquitoes. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;49(1): 4-10.
  67. Ledermann JP. *Aedes hensilli* as a potential vector of Chikungunya and Zika Viruses. *PLoS Neglected Tropical Disease*. 2014;v. 8, n. 10, e3188.
  68. Weaver SC, Costa F, Garcia-Blanco MA, et al. Zika virus: history, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral Res*. 2016;130:69-80.
  69. Centers for disease control and prevention. How the zika virus enters the human population. [Acesso em: 21 Set. 2020]. Disponível em: [https://www.researchgate.net/figure/How-the-zika-virus-enters-the-human-population-Source-CDC-PLOS-Reuters\\_fig2\\_318958809](https://www.researchgate.net/figure/How-the-zika-virus-enters-the-human-population-Source-CDC-PLOS-Reuters_fig2_318958809)
  70. Secretaria de estado da saúde do Espírito Santo *Aedes aegypti*. [Acesso em: 12 Jan. 2021]. Disponível em: <https://mosquito.saude.es.gov.br/o-mosquito>
  71. Salazar MI, Richardson JH, Sánchez-Vargas I, Olson KE, Beaty BJ. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiology*. 2007;7:9.
  72. Chan M, Johansson MA. The incubation periods of dengue viruses. *PLoS ONE*. 2012;7(11): e50972.
  73. Anderson CR, Rico-Hesse R. *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;75(5):886-92.

74. Thangamani S, Huang J, Hart CE, Guzman H, Tesh. RB. Vertical Transmission of Zika Virus in *Aedes aegypti* Mosquitoes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2016;v. 95, Issue 5, p. 1169 – 1173.
75. Fundação Oswaldo Cruz. Dengue, vírus e vetor. [Acesso em: 20 Jan. 2021]. Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/opportunista.html>
76. Musso D, Gubler DJ. Zika virus. *Clin Microbiol Rev*. 2016;29:487– 524.
77. Pomar L, Vouga M, Lambert V, et al. Maternal-fetal transmission and adverse perinatal outcomes in pregnant women infected with Zika virus: prospective cohort study in French Guiana. *BMJ*. 2018;363:k4431.
78. Honein MA, Dawson AL, Petersen EE, et al. Birth defects among fetuses and infants of US women with evidence of possible Zika virus infection during pregnancy. *JAMA*. 2017; 317:59-68.
79. Pacheco O, Beltran M, Nelson CA, et al. Zika virus disease in Colombia-preliminary report. *N Engl J Med*. 2016.
80. Sheridan MA, et al. Vulnerability of primitive human placental trophoblast to Zika vírus. *PNAS*. 13 fev. 2016.
81. Oliveira DB, Almeida FJ, Durigon EL, et al. Prolonged shedding of Zika virus associated with congenital infection. *N Engl J Med*. 2016;375: 1202-1204.
82. Cruz T, Souza R, Pelloso R, Morelli F, Suehiro T, Damke E, et al. Case Report: Prolonged detection of Zika virus RNA in vaginal and endocervical samples from a Brazilian woman, 2018. *Am J Trop Med Hyg*. 2018.
83. Coyne C, Lazear M. Zika virus - reigniting the TORCH. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14: 707– 715.
84. Centers for disease control and prevention. Zika in Infants & Children. [Acesso em: 23 Set. 2020]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/pregnancy/zika/testing-follow-up/zika-in-infants-children.html>
85. Organização Mundial da Saúde. Amamentação no contexto do vírus Zika Orientações provisórias 25 de Fevereiro de 2016. [Acesso em: 23 Set. 2020]. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204473/WHO\\_ZIKV\\_MOC\\_16.5\\_por.pdf?sequence=5](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204473/WHO_ZIKV_MOC_16.5_por.pdf?sequence=5)
86. Bonaldo MC, Ribeiro IP, Lima NS, et al. Isolation of infective Zika virus from urine and saliva of patients in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10:e0004816.
87. Shugars DC. Endogenous mucosal antiviral factors of the cavity. *J Infect Dis*. 1999;179(suppl 3):S431-S435.

88. Sufiawati I, Tugizov SM. HIV-associated disruption of tight and adherens junctions of oral epithelial cells facilitates HSV-1 infection and spread. *PLoS One*. 2014;9:e88803.
89. Leung GH, Baird RW, Druce J, Anstey NM. Zika virus infection in Australia following a monkey bite in Indonesia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2015;46:460-464.
90. Organização mundial da saúde. Manter uma reserva adequada de sangue seguro durante os surtos do vírus Zika. Orientações provisórias Fevereiro de 2016. [Acesso em: 11 Jan. 2021]. Disponível em: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204436/WHO\\_ZIKV\\_HS\\_16.1\\_por.pdf;jsessionid=74F9F7D3E61953D4E2909D84A63D7C73?sequence=14](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204436/WHO_ZIKV_HS_16.1_por.pdf;jsessionid=74F9F7D3E61953D4E2909D84A63D7C73?sequence=14)
91. Bloch EM, Ness PM, Tobian AAR, Sugarman J. Revisiting blood safety practices given emerging data about Zika virus. *N Engl J Med*. 2018;378:1837-1841.
92. Saa P, Proctor M, Foster G, et al. Investigational testing for Zika virus among US blood donors. *N Engl J Med*. 2018;378:1778-1788.
93. US Food and Drug Administration. Revised recommendations for reducing the risk of Zika virus transmission by blood and blood components: guidance for industry. [Published July 8, 2018]. [Acesso em: 15 Jan. 2021]. Disponível em: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/revised-recommendations-reducing-risk-zika-virus-transmission-blood-andblood-components>
94. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Critérios técnicos para triagem clínica de candidatos à doação de sangue para os vírus Zika e Chikungunya. [Acesso em: 12 Jan. 2021]. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/agosto/25/Nota-Tecnica-Conjunta-002-2016-zika-e-chikungunya-CGSH-ANVISA.pdf>
95. Foy BD, Kobylinski KC, Chilson Foy JL, Blitvich BJ, Travassos da Rosa A, Haddow AD, et al. Probable non-vectorborne transmission of Zika virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis*. 2011;17:880–2.
96. McCarthy M. Zika virus was transmitted by sexual contact in Texas, health officials report. *BMJ*. 2016.
97. Davidson A, Slavinski S, Komoto K, Rakeman J, Weiss D. Suspected Female-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus - New York City, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016;65:716–717.
98. Mansuy JM, Suberbielle E, Chapuy-Regaud S, et al. Zika virus in semen and spermatozoa. *Lancet Infect Dis*. 2016;16:1106-1107.



99. Agumadu VC, Vírus Ramphul K. Zika Virus: A Review of Literature. *Cureus*. 2018;10(7): 3025.
100. Barzon L, Percivalle E, Pacenti M, et al. Virus and antibody dynamics in travelers with acute Zika virus infection. *Clin Infect Dis*. 2018;66:1173-1180.
101. Calvet GA, Kara EO, Giozza SP, Bôtto-Menezes CHA, Gaillard P, Oliveira RF, et al. Study on the persistence of Zika virus (ZIKV) in body fluids of patients with ZIKV infection in Brazil. *BMC Infect Dis*. 2018;18(1): 49.
102. Petridou C, et al. Prolonged Zika virus RNA detection in semen of immunosuppressed patient. *Emerging Infectious Diseases*. 2019;v. 25, n. 8, p. 1598–1600.
103. Atkinson, B. et al. Detection of Zika Virus in Semen. *Emerging Infectious Diseases*. 2016; v. 22, n. 5, p. 160107.
104. Foy BD, et al. Probable Non - Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerging Infectious Diseases*. 2011;v. 17, n. 5, p. 1–7.
105. D'Ortenzio E, Matheron S, Yazdanpanah Y, de Lamballerie X, Hubert B, Piorkowski G, et al. Evidence of sexual transmission of Zika virus. *N Engl J Med*. 2016;374(22): 2195-2198.
106. Arsuaga M, Bujalance SG, Díaz-Menéndez M, Vázquez A, Arribas JR. Probable sexual transmission of Zika virus from a vasectomised man. *Lancet Infect dis*. 2016;16(10): 1107.
107. Rosenberg ES, Doyle K, Munoz-Jordan J, Santiago GA, Klein L, Perez-Padilla J, et al. Persistence of Zika virus in body fluids—preliminary report. *N Engl J Med*. 2017;379(13): 1234-1243.
108. World Health Organization. WHO guidelines for the prevention of sexual transmission of Zika virus, 2020. [Acesso em: 22 Set. 2020]. <https://www.who.int/publications/i/item/prevention-of-sexual-transmission-of-zika-virus>
109. Gurung P, Jialal I. *Physiology, Male Reproductive System*; StatPearls Publishing [Internet]: Treasure Island, FL, USA, 2019.
110. Griswold MD. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin. Cell Dev Biol*. 1998;9, 411–416.
111. Zhao S, Zhu W, Xue S, Han D. Testicular defense systems: Immune privilege and innate immunity. *Cell Mol Immunol*. 2014,428–437.
112. Filippini A, Riccioli A, Padula F, Lauretti P, D'Alessio A, De Cesaris P, Gandini L, Lenzi A, Ziparo E. Control and impairment of immune privilege in the testis and in semen. *Hum. Reprod. Update*. 2001;7, 444–449.

113. Jiang XH, Bukhari I, Zheng W, Yin S, Wang Z, Cooke H.J, Shi QH. Blood-Testis barrier and spermatogenesis: Lessons from genetically-modified mice. *Asian J Androl.* 2014;16, 572–580.
114. Wang M, Fijak M, Hossain H, Nüsing RM, Lochnit G, Michaela F, Wudy AS, Zhang L, Gu H, Konrad L, et al. Characterization of the Micro-Environment of the Testis that Shapes the Phenotype and Function of Testicular Macrophages. *J Immunol.* 2017;198, 4327–4340.
115. Sistema reprodutivo Masculino [Internet]. Grupo de pesquisa em biologia da reprodução: Universidade Federal do Ceará. [Acesso em: 15 Dez. 2020]. Disponível em: <http://www.reproducao.ufc.br/reprodm1.pdf>
116. McDonald EM, Duggal NK, Ritter JM, Brault AC. Infection of epididymal epithelial cells and leukocytes drives seminal shedding of Zika virus in a mouse model. *PLoS Negl Trop. Dis.* 2018;12, 1–22.
117. Strange DP, Jiyarom B, Pourhabibi Zarandi N, Xie X, Baker C, Sadri-Ardekani H, Shi PY, Verma S. Axl Promotes Zika Virus Entry and Modulates the Antiviral State of Human Sertoli Cells *MBio.* 2019;10, 1–16.
118. Mlera L, Bloom ME. Differential zika virus infection of testicular cell lines. *Viruses.* 2019; 11, 42.
119. Bhushan S, Schuppe HC, Fijak M, Meinhardt A. Testicular infection: Microorganisms, clinical implications and host-pathogen interaction. *J Reprod Immunol.* 2009;83, 164–167.
120. Mülle JA, Harms H, Krüger F, Groß R, Joas S, Hayn M, Andrea ND, Lippold S, et al. Semen inhibits Zika virus infection of cells and tissues from the anogenital region. *Nature communications.* 2018;9:2207.
121. Magalhaes T, Foy BD, Marques ETA, Ebel GD, Weger-Lucarelli J. Mosquito-borne and sexual transmission of Zika virus: recent developments and future directions. *Virus Res.* 2017.
122. Styer LM, et al. Mosquitoes inoculate high doses of West Nile virus as they probe and feed on live hosts. *PLoS Pathog.* 2007;3, 1262–1270.
123. Stassen L, et al. Zika Virus in the Male Reproductive Tract. *Viruses.* 2018;v. 10, n. 4, p. 198.
124. Joguet G, Mansuy JM, Matusali G, Hamdi S, Walschaerts M, Pavili L, et al. Effect of acute Zika virus infection on sperm and virus clearance in body fluids: a prospective observational study. *Lancet Infect Dis.* 2017;17:1200–8.
125. Musso D, et al. Potential Sexual Transmission of Zika Virus. *Emerging Infectious Diseases.* 2015;v. 21, n. 2, p. 359–361.

126. Huits RM, et al. Zika virus in semen: a prospective cohort study of symptomatic travellers returning to Belgium. [publicado em 19 de Set. 2017]. Bulletin of the World Health Organization. [Acesso em 12 Jan. 2021]. Disponível em: <https://www.who.int/bulletin/volumes/95/12/17-181370/en/>
127. Matusali G, et al. Zika virus infects human testicular tissue and germ cells Find the latest version: Zika virus infects human testicular tissue and germ cells. The Journal of clinical investigation. 2018;v. 128, n. 10, p. 4697–4710.
128. Mital P, Hinton BT, Dufour JM. The Blood-Testis and Blood-Epididymis Barriers Are More than Just Their Tight Junctions. Biol Reprod. 2011;84, 851–858.
129. Corte Histológico do túbulo seminífero. [Internet]. Grupo de pesquisa em biologia da reprodução: Universidade Federal do Ceará. [Acesso em: 30 Jan. 2021]. Disponível em: <http://www.reproducao.ufc.br/reprodm1.pdf>
130. Robinson CL, Chong ACN, Ashbrook AW, Jeng G, Jin J, Chen H, Tang EI, Martin LA, Kim RS, Kenyon RM, et al. Male germ cells support long-term propagation of Zika virus. Nat Commun. 2018;9, 1–11.
131. Clancy CS, et al. Zika virus associated pathology and antigen presence in the testicle in the absence of sexual transmission during subacute to chronic infection in a mouse model. Scientific reports. 2019;v. 9, n. 1, p. 1–10.
132. Sheng ZY, et al. Sertoli Cells Are Susceptible to ZIKV Infection in Mouse Testis. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017;v. 7, n. 272.
133. Basarab M, Bowman C, Aarons EJ, Cropley I. Zika virus. BMJ. 2016;352:i1049.
134. Demir T, Kilic S. Zika virus: a new arboviral public health problem. Folia Microbiol. 2016;61(6):523-7.
135. Brito C. Frequência dos principais sinais e sintomas ocasionados pela infecção pelos vírus da dengue, chikungunya e vírus Zika. [Internet]. Hospital e Maternidade Santa Joana. [Acesso em: 20 Dez. 2020]. Disponível em: <http://www.santajoanababy.com.br/area-medica/microcefalia>
136. Charles C. Current and emerging diagnostics for Zika vírus. [Internet]. [Acesso em: 05 Jan. 2021]. Disponível em: <https://www.slideshare.net/UCSFGlobalHealthSciences/current-and-emerging-diagnostics-for-zika-virus-59327711>
137. Paz-Bailey G, Rosenberg ES, Doyle K, et al. Persistence of Zika virus in body fluids-final report. N Engl J Med. 2018;379:1234–43.
138. Hunsperger EA, Muñoz-Jordán J, Beltran M, et al. Performance of dengue diagnostic tests in a single-specimen diagnostic algorithm. J Infect Dis. 2016;214:836–44.

139. Freitas K. Saiba mais sobre o Zika vírus. [Internet]. [Acesso em: 20 Jan. 2021]. Disponível em: <https://www.drakeillafreitas.com.br/saiba-mais-sobre-o-zika-virus/>
140. Lustig Y, Mendelson E, Paran N, Melamed S, Schwartz E. Detection of Zika virus RNA in whole blood of imported Zika virus disease cases up to 2 months after symptom onset, Israel, December 2015 to April 2016. *Euro Surve*.2016.
141. Lustig Y, Mannasse B, Koren R, Katz-Likvornik S, Hindiyeh M, Mandelboim M, et al. Superiority of West Nile virus RNA detection in whole blood for diagnosis of acute infection. *J Clin Microbiol*. 2016;54:2294–7.
142. Huang GKL, Tio SY, Caly L, Nicholson S, Thevarajan I, Papadakis G, et al. Prolonged detection of Japanese encephalitis virus in urine and whole blood in a returned short-term traveler. *Open Forum Infect Dis*. 2017;4:ofx203.
143. El Sahly HM, Gorchakov R, Lai L, Natrajan MS, Patel SM, Atmar RL, et al. Clinical, virologic, and immunologic characteristics of Zika virus infection in a cohort of US patients: prolonged RNA detection in whole blood. *Open Forum Infect Dis*. 2018;6:ofy352.
144. Voermans JJC, Pas SD, Van der Linden A, GeurtsvanKessel C, Koopmans M, Van der Eijk A, Reusken CBEM. Whole-Blood Testing for Diagnosis of Acute Zika Virus Infections in Routine Diagnostic Setting. *Emerging Infectious Diseases*. 2019;v. 25, n. 7.
145. Sociedade Brasileira de Patologia Clínica. SBPC/ML faz esclarecimentos sobre o teste laboratorial do vírus Zika. [Intenert: Publicado em 24 Fev. 2016]. [Acesso em: 14 Jan.2021]. Disponível em: <https://www.labnetwork.com.br/noticias/sbpcml-faz-esclarecimentos-sobre-o-teste-laboratorial-do-virus-zika/>
146. Griffin I, Martin SW, Fischer M, et al. Zika virus IgM detection and neutralizing antibody profiles 12–19 months after illness onset. *Emerg Infect Dis*. 2019;25:299–303.
147. Centers For Disease Control And Prevention. New Zika and Dengue Testing Guidance [InternetUpdated November 2019]. [Acesso em: 23 Set. 2020]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/zika/hc-providers/testing-guidance.html>
148. Fitzgerald B, Boyle C, Honein MA. Birth defects potentially related to Zika virus infection during pregnancy in the United States. *JAMA*. 2018,319, 1195–1196.
149. Busch MP, Kleinman SH, Tobler LH, et al. Virus and antibody dynamics in acute West Nile virus infection. *J Infect Dis*. 2008;198:984–93.
150. Poland JD, Calisher CH, Monath TP, Downs WG, Murphy K. Persistence of neutralizing antibody 30-35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine. *Bull World Health Organ*.1981;59:895–900.

151. Centers For Disease Control And Prevention. Zika and Pregnancy: Evaluation & Testing for Zika Virus. [Acesso em: 29 Jul. 2020]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/pregnancy/zika/testing-follow-up/evaluation-testing.html>
152. Brasil. Ministério da Saúde. Como investigar os casos e óbitos notificados. Orientações Integradas de Vigilância e Atenção à Saúde no Âmbito da Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional: procedimentos para o monitoramento das alterações no crescimento e desenvolvimento a partir da gestação até a primeira infância, relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas dentro da capacidade operacional do SUS; Ministério da Saúde: Brasília, Brasil. 2017;pp. 28–49.
153. Chua A, Prat I, Nueblig CM, Wood D, Moussy F. Update on Zika Diagnostic Tests and WHO's Related Activities. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11, e0005269.
154. Sharp TM, Fischer M, Muñoz-Jordán JL, Paz-Bailey G, Staples JE, Gregory CJ, Stephen Waterman SH. Dengue and Zika virus diagnostic testing for patients with a clinically compatible illness and risk for infection with both viruses. [Internet: Centers For Disease Control And Prevention. Morbidity and Mortality Weekly Report June 14, 2019]. [Acesso em: 15 Jan. 2021]. Disponível em: [https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/68/rr/rr6801a1.htm?s\\_cid=rr6801a1\\_w](https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/68/rr/rr6801a1.htm?s_cid=rr6801a1_w)
155. Centers For Disease Control And Prevention. Zika virus e tratamento. [Acesso em: 18 Jan. 2021]. Disponível em: <https://portugues.cdc.gov/zika/symptoms/treatment.html>.
156. Heymann DL, Hodgson A, Sall AA, Freedman DO, Staples JE, Althabe F, Baruah K, Mahmud G, Kandun N, Vasconcelos PF, et al. Zika virus and microcephaly: why is this situation a PHEIC? Lancet. 2016;387(10020):719–21.
157. World Health Organization. WHO and Experts Prioritize Vaccines, Diagnostics and Innovative Vector Control Tools for Zika R&D. [Acesso em: 14 Jan. 2021]. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/09-03-2016-who-and-experts-prioritize-vaccines-diagnostics-and-innovative-vector-control-tools-for-zika-r-d>
158. Wilder-Smith A, Vannice K, Durbin A, et al. Zika vaccines and therapeutics: landscape analysis and challenges ahead. BMC Med. 2018;16:84.
159. Fundação Oswaldo Cruz. Estudo sobre tratamento contra Zika recebe Prêmio Oswaldo Cruz. {Publicado em 17 Maio 2018}. [Acesso em: 10 Jan. 2021]. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/estudo-sobre-tratamento-contr-zika-recebe-premio-oswaldo-cruz>

160. Carvalho OV, Félix DM, et al. The thiopurine nucleoside analogue 6-methylmercaptapurine riboside (6MMPr) effectively blocks Zika virus replication. *Int Journal of Antimicrobial Agents*. 2017;v.50, Issue 6, Pages 718-725.
161. Delvecchio R, Higa LM, Pezzuto P, Valadao AL, Garcez PP, Monteiro FL, et al. Chloroquine, an endocytosis blocking agent, inhibits Zika virus infection in different cell models. *Viruses*. 2016;8:322.
162. Cao B, Parnell LA, Diamond MS, Mysorekar IU. Inhibition of autophagy limits vertical transmission of Zika virus in pregnant mice. *J Exp Med*. 2017;214:2303-13.
163. Tong X, Smith J, Bukreyeva N, Koma T, Manning JT, Kalkeri R, et al. Merimepodib, an IMPDH inhibitor, suppresses replication of Zika virus and other emerging viral pathogens. *Antiviral Res*. 2017;149:34-40.
164. Xu M, Lee EM, Wen Z, Cheng Y, Huang WK, Qian X, et al. Identification of small-molecule inhibitors of Zika virus infection and induced neural cell death via a drug repurposing screen. *Nat Med*. 2016;22:1101-7.
165. World Health Organization. WHO. Progress toward discovery of Zika virus vaccines and therapeutics. [Publicado em 23 de Jul. 2018]. [Acesso em: 20 Jan. 2021]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/progress-toward-discovery-of-zika-virus-vaccines-and-therapeutics>
166. Governo do Estado de São Paulo. Instituto Butantã. Ensaios clínicos. [Internet]. [Acesso em: 20 Jan. 2021]. Disponível em: <https://butantan.gov.br/pesquisa/ensaios-clinicos?r=pesquisa/ensaios-clinicos>
167. Li Z, Brecher M, Deng YQ, Zhang J, Sakamuru S, Liu B, et al. Existing drugs as broad-spectrum and potent inhibitors for Zika virus by targeting NS2B-NS3 interaction. *Cell Res*. 2017;27:1046-64.
168. Manna S, Dey S, Biswas S, Nandy A, Basak SC. Current Perspective of Zika Virus and Vaccine Development. *Exploratory Research and Hypothesis in Medicine*. 2020;v.000.

## CAPÍTULO II

1. **ARTIGO:** Persistence and clinical relevance of Zika virus in the male genital tract

## Persistence and clinical relevance of Zika virus in the male genital tract

Fábio A. Kurscheidt<sup>1,3</sup>, Cristiane S. S. Mesquita<sup>1,3</sup>, Gabrielle M. Z. F. Damke<sup>1</sup>, Edilson Damke<sup>1</sup>, Analine R. B. de A. Carvalho<sup>1</sup>, Tamy T. Suehiro<sup>1</sup>, Jorge J. V. Teixeira<sup>2</sup>, Vânia R. S. da Silva<sup>1</sup>, Raquel P. Souza<sup>1</sup> and Marcia E. L. Consolaro<sup>1\*</sup>

**Abstract** | Zika virus (ZIKV) is a re-emerging mosquito-transmitted flavivirus associated with congenital abnormalities in newborns and with Guillain-Barré syndrome in adults. The virus can also be sexually transmitted and can persist in the male genital tract. Studies evaluating the kinetics of ZIKV in seminal shedding of men who have been infected, as well as in animal and cellular models of infection, have shown that, in addition to the testis and epididymis, the prostate and seminal vesicles could also be involved in persistent ZIKV infection. Additionally, some studies have reported that men infected with ZIKV can present with genitourinary symptoms such as haemospermia, prostatitis, painful ejaculation, penile discharge, and oligospermia; however, little is known about the effect of ZIKV on fertility. Understanding the mechanisms that underlie persistent ZIKV infections in men is crucial to developing guidelines, effective vaccines, and therapies.

Zika virus (ZIKV) is a re-emerging flavivirus belonging to the family *Flaviviridae*, which was responsible for a major outbreak in the Americas in 2016 (REF.<sup>1</sup>). ZIKV was first isolated in 1947 from a febrile, sentinel rhesus macaque in the Zika Forest of Uganda, followed by isolation in 1948 in the *Aedes africanus* mosquito of the same forest, suggesting mosquito-borne transmission of the virus<sup>2</sup>. Between 1952, the date of the first human description, and 2007, the first epidemic on a small island in Micronesia, fewer than ten cases had been reported. In 2013, a large outbreak started in French Polynesia, spread through the Pacific Ocean region and invaded most of the countries in the Americas<sup>3</sup>. Actually, autochthonous transmission of ZIKV infection has been reported in Asia, Africa, Micronesia, French Polynesia and other Pacific Islands, and Latin America, with increasing numbers of descriptions of travel-related cases worldwide<sup>3-7</sup>, totalling 48 countries or territories affected by this virus<sup>8</sup>. According to epidemiological data from the Pan American Health Organization (PAHO) and the WHO, 570,254 suspected cases of ZIKV were reported and 214,783 were confirmed in the Americas between January 2015 and July 2017. The USA has confirmed a total of 5,053 cases of ZIKV in travellers from other countries<sup>9</sup>.

Most ZIKV infections are asymptomatic and go unreported, but if systemic symptoms do appear, they are usually mild in nature (mild fever, rash, arthralgia, arthritis, myalgia, headache, conjunctival hyperaemia, and oedema) and self-resolve within 1 week<sup>10-12</sup>.

Mothers who are infected can transmit the virus through the placenta to developing fetuses, leading to congenital malformations including microcephaly, cerebral malformations, ophthalmological and hearing defects, and arthrogryposis<sup>12-15</sup> in newborns and to neurological syndromes — in particular, Guillain-Barré syndrome — in adults<sup>11</sup>.

The main mode of ZIKV disease transmission in urban and suburban environments is via the mosquito vector *Aedes aegypti*, but the virus has been isolated from several other species of the genus *Aedes*, such as *Aedes albopictus*, *Aedes luteocephalus*, *Aedes hensilli*, and *Aedes polynesiensis*<sup>1</sup>. ZIKV was first isolated from *A. africanus*, which has a crucial role in the ZIKV sylvatic transmission cycle and is the likely enzootic vector in Africa and Asia<sup>16</sup> (FIG. 1). *A. aegypti* and *A. albopictus* are more important vectors in the urban transmission cycle and circulate globally, presenting a considerable risk of ZIKV spread worldwide<sup>17-19</sup>. In 2015, Kraemer et al.<sup>17</sup> mapped the global distribution of *A. aegypti* and *A. albopictus* and found that the habitat-suitability range for these species is at its widest ever spread, occurring in all continents, including North America and Europe, and increasing the potential for ZIKV spread.

ZIKV can be detected in blood, urine, semen and other bodily fluids<sup>20</sup>; however, the frequency with which the virus can be quantified in these fluids and the length of time that it remains detectable are not well understood. Moreover, some evidence highlights another important route of transmission: through sexual contact

<sup>1</sup>Laboratory of Clinical Cytology and Semen Analysis, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá, PR, Brazil.

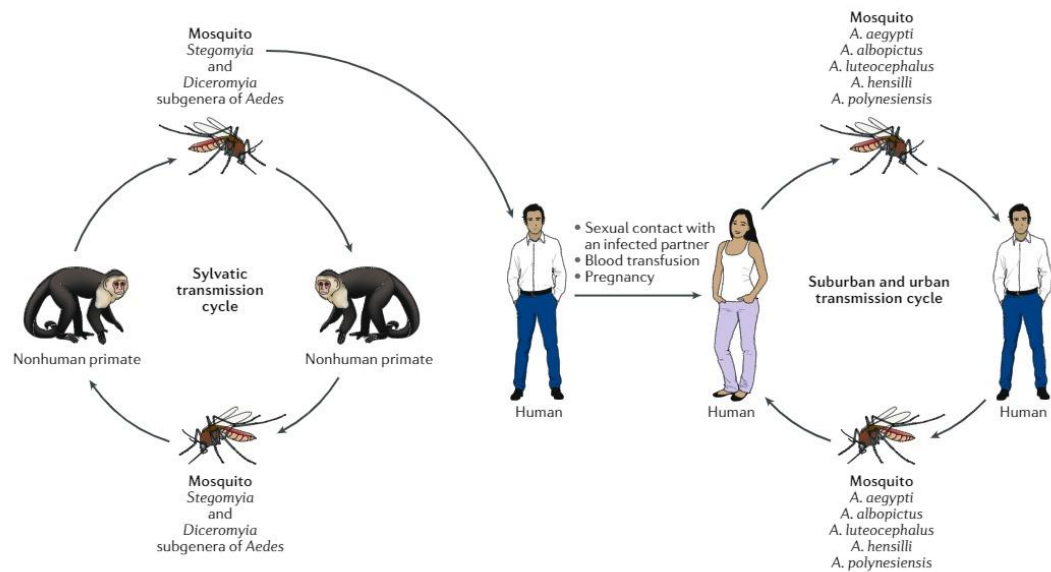
<sup>2</sup>Division of Epidemiology, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá, PR, Brazil.

<sup>3</sup>These authors contributed equally: Fábio A. Kurscheidt, Cristiane S. S. Mesquita.

\*e-mail: melconsolaro@gmail.com

<https://doi.org/10.1038/s41585-019-0149-7>





**Fig. 1 | Schematic transmission cycles of ZIKV.** In Africa, Zika virus (ZIKV) circulates in a sylvatic transmission cycle between nonhuman primates and certain forest-dwelling species of *Aedes* mosquitoes (*Stegomyia* and *Diceromyia* subgenera). Sporadic human infections can occur. In suburban and urban settings, ZIKV is mainly transmitted in a human–mosquito–human transmission cycle via the mosquito vector *Aedes aegypti*, but the virus has been isolated from several other species of the genus *Aedes* such as *Aedes albopictus*, *Aedes luteocephalus*, *Aedes hensilli*, and *Aedes polynesiensis*. ZIKV can be transmitted between humans via sexual contact with a partner who is infected, blood transfusion, and pregnancy.

semen and urine but not in the blood sample. According to the authors<sup>34</sup>, these results suggest that viral replication might have occurred in the genital tract, as replicative ZIKV particles were found, using cell culture, in the two semen samples but not in the urine sample. However, when this replication started and how long it lasted were unclear.

Thereafter, several studies have investigated the persistence of ZIKV RNA in semen<sup>21,24,29,31,33–55</sup>. The detection period and length of time that the virus can persist in the semen are highly variable between different studies, ranging from days to months after symptom onset. Some reports of ZIKV persistence in semen indicated RNA positivity for up to a month; for example, Atkinson et al.<sup>49</sup> and Mansuy et al.<sup>37</sup> identified ZIKV RNA at high copy numbers 2 weeks after onset of the symptoms. By contrast, other studies have reported long-lasting persistence of ZIKV RNA in semen for periods varying from 76 days to 370 days after symptom onset<sup>33,35,38–40,53,55</sup> (TABLE 1).

Most studies have shown that ZIKV persists for longer in semen than in other bodily fluids (such as urine, blood, and saliva) and with a higher viral load, possibly owing to a virus sanctuary or reservoir in the genital tract<sup>21,31,33,35–44,46–55</sup>. Only a few studies have reported contrasting data. Among them, the initial report from Musso and colleagues<sup>34</sup> showed that semen and urine both remained positive for ZIKV

for 14–21 days after symptom onset, with a viral load that was higher in semen ( $1.1 \times 10^7$  copies/ml) than in urine ( $3.8 \times 10^3$  copies/ml). According to the report from Mansuy and co-workers<sup>37</sup>, semen, blood, and urine all remained positive for ZIKV RNA for ~14 days after symptom onset, with a higher viral load in semen ( $8.6 \log_{10}$  copies/ml) than in blood ( $2.8 \log_{10}$  copies/ml) and urine ( $3.1 \log_{10}$  copies/ml). D'Ortenzio and co-workers<sup>24</sup> reported that semen and urine remained positive for ZIKV RNA for 24 days, but the viral load was higher in semen ( $3.5 \times 10^7$  copies/ml) than in urine ( $2.1 \times 10^4$  copies/ml). Finally, Froeschl and co-workers<sup>48</sup> reported that blood samples remained positive for ZIKV RNA until day 101 after semen negativation (positive until day 77), with a similar viral load between semen (34.34 CT) and blood (34.42 CT) on day 77.

Notably, ZIKV RNA detection does not always indicate the presence of infectious virus<sup>56</sup>. Isolation of infectious virus by cell culture is the gold standard for detecting replicative (infectious) virus. Approximately 65% of studies that have tried to isolate infectious ZIKV from semen using cell culture reported positive results (TABLE 1), suggesting that the virus can remain infectious in the male genital tract. Additionally, the isolation of infectious virus by cell culture has confirmed the presence of infectious virus up to 69 days after symptom onset<sup>23</sup>, whereas ZIKV RNA has been detected in human semen 304 days after symptom onset<sup>55</sup>.

## REVIEWS

Table 1 | Studies evaluating the kinetics of ZIKV in seminal shedding

Study	Latest detection of ZIKV in semen (days after symptom onset)	ZIKV seminal load <sup>a</sup>	ZIKV blood load <sup>a</sup>	ZIKV urine load <sup>a</sup>	ZIKV semen isolation	Refs
Musso et al.	~14–21	1.1 × 10 <sup>7</sup> copies/ml	Negative	3.8 × 10 <sup>3</sup> copies/ml	Positive	34
Mansuy et al.	~14	8.6 log <sub>10</sub> copies/ml	2.8 log <sub>10</sub> copies/ml	3.1 log <sub>10</sub> copies/ml	Positive	37
D'Ortenzio et al.	24	3.5 × 10 <sup>7</sup> copies/ml	Negative	2.1 × 10 <sup>4</sup> copies/ml	Positive	24
Frank et al.	45	6 × 10 <sup>4</sup> copies/ml	Negative	Negative	Negative	31
Atkinson et al.	62	33 CT	Negative	Negative	NA	41
Reusken et al.	47	~35 CT	Negative	Negative	Negative	36
Atkinson et al.	13	NI	NI	NA	Positive	49
Barzon et al.	181	~50 copies/ml	Negative	Negative	Negative	40
Mansuy et al.	93	4,800 copies/ml	Negative	Negative	NA	43
Nicastri et al.	188	30.2 CT	Negative	Negative	Negative	35
Torres et al.	~35	NI	NA	Negative	NA	51
Arsuaga et al.	96	30.1 CT	Negative	Negative	Positive	21
Souto et al.	93	29.99 CT	NA	Negative	Negative	46
Harrower et al.	76	35 CT	NA	NA	Negative	42
Mansuy et al.	141	~3.5 × 10 <sup>3</sup> log copies/ml	Negative	Negative	NA	39
Froeschl et al.	77	34.34 CT	34.42 CT at day 101	Negative	Positive	48
Gaskel et al.	92	37.2 CT	NA	NA	Negative	54
Joguet et al.	160	3.4 log copies/ml	Negative	Negative	Positive	52
Huits et al.	137	~35 CT	NI	NA	Positive	47
Garcia-Bujalance et al.	96	27.39 CT	NA	Negative	Positive	44
Barzon et al.	370	~23 CT	NI	NI	Positive	33
Biava et al.	147	38.5 CT	Negative	Negative	Positive	53
Sánchez-Montalvá et al.	23	NI	Negative	Negative	NA	50
Paz-Bailey et al.	125	NI	Negative	Negative	Positive	38
Mead et al.	281	NI	NI	Negative	Positive	55

CT, cycle thresholds; NA, not analysed; NI, not informed; ZIKV, Zika virus. <sup>a</sup>On the day of last detection in semen.

These data indicate that viral transmission via semen could occur for at least 69 days after disease onset, at least in some men who are infected.

A 2018 study reported that ZIKV RNA was commonly present in the semen of men with symptomatic ZIKV infection and persisted in some men for >9 months after symptom onset<sup>55</sup>. However, the authors observed that shedding of infectious ZIKV seemed to be much less common and was limited to the first few weeks after the onset of symptomatic infection. Additionally, in contrast to the frequent and prolonged shedding of ZIKV RNA in semen, the shedding of infectious ZIKV that could be cultured was rare, short-lived, and limited to the few samples with >7.0 log<sub>10</sub> copies/ml. Finally, none of the 75 cultured samples with RNA loads <7.0 log<sub>10</sub> copies/ml yielded infectious ZIKV, and no sample that was obtained >30 days after symptom onset yielded infectious ZIKV<sup>55</sup>.

Considering that ~20–73%<sup>31,33,47,50,52,55</sup> of men with symptomatic ZIKV infection test positive for the virus in semen, sexual transmission could certainly complicate efforts to prevent transmission of ZIKV. Furthermore, these data raise major concerns about the possibility

of ZIKV infection leading to fertility problems in adult males and in fetuses of mothers who are infected. However, no studies have been performed to evaluate whether in utero ZIKV infection could affect the fertility of the offspring.

#### Men with vasectomy and no symptoms

The detection of ZIKV RNA in the semen of three men who had each undergone vasectomy<sup>21,47,48</sup> is notable. The surgical vasectomy procedure cuts and seals the vas deferens, which carries spermatozoa from the testis and epididymis towards the prostate and seminal vesicles. As a result, the ejaculate does not contain sperm or other cells from the testis and epididymis. Thus, the persistence of ZIKV in the male genital tract (or at least the location of virus shedding) must be confined to the bulbourethral glands, prostate, and seminal vesicles.

Detection of viral RNA was possible in samples from two<sup>21,48</sup> of three<sup>21,47,48</sup> men who had undergone vasectomy and were infected with ZIKV, often weeks after the initial infection. Arsuaga et al.<sup>21</sup> reported the detection of ZIKV RNA in semen from a man with a vasectomy 96 days after symptom onset, which was successfully cultivated

from a sample harvested 69 days after the symptoms began. Similarly, Froeschl et al.<sup>48</sup> detected ZIKV RNA in the semen of a man with a vasectomy 77 days after symptom onset. ZIKV RNA was successfully cultivated from a sample 21 days after the symptoms began. These data suggest that ZIKV replicates not only in spermatogonia but also in tissues distal of the vas deferens, including the prostate, seminal vesicles, and bulbourethral glands. In support of this hypothesis, another team reported ZIKV RNA detection by RT-PCR in the semen of a patient presenting with nonobstructive azoospermia. This study reported a case of ZIKV male-to-female sexual transmission in a totally asymptomatic couple who sought treatment for pregnancy by in vitro fertilization with donor semen<sup>28</sup>.

The possibility that ZIKV might be present in the semen of asymptomatic men is an important consideration, as almost all reports of the presence of seminal ZIKV RNA were in people who had been studied because they presented with symptoms of ZIKV or because sexual transmission was suspected. However, ZIKV infection can be asymptomatic with the virus present in the semen<sup>27,28,44,55</sup>. In 2017, García-Bujalance et al.<sup>44</sup> published a report of five patients with ZIKV returning from endemic areas. Semen viral culture was positive for ZIKV in two patients at day 30 and day 69 of illness or since departure from the endemic country in patients with asymptomatic infection. Importantly, ZIKV RNA was present in the semen of an asymptomatic patient 68 days after his return from travel, highlighting the possibility of sexual transmission of ZIKV by asymptomatic patients who do not know that they are infected.

Considering that >50–80% of people infected with the virus are asymptomatic<sup>16</sup>, estimating the real prevalence of ZIKV in semen and the viral kinetics at different stages of infection is difficult, both in countries with and without autochthonous virus transmission. Nevertheless, the consequences of ZIKV infection in the genital tract of asymptomatic men need to be prospectively evaluated.

#### **Factors affecting persistence in semen**

Persistence of ZIKV in immune-privileged sites such as the male genital tract might differ among populations depending on their ethnic background, ongoing vector-borne transmission of the virus and previous exposure to other flaviviruses<sup>47</sup>. One possible explanation for this phenomenon could be the difference in naturally acquired immunity or in the vaccination status between men residing in endemic areas and travellers. People living in endemic areas are exposed to other circulating flaviviruses, such as dengue and chikungunya viruses, which might also affect their ability to clear ZIKV<sup>47</sup>.

A 2018 study of 184 men with ZIKV who had symptoms showed that older age, infrequent ejaculation and the presence of certain symptoms at the time of initial illness (such as the presence of conjunctivitis and absence of joint pain) were independently associated with prolonged viral RNA shedding<sup>55</sup>. According to the study authors, prolonged shedding in older men could be related to either structural changes in the reproductive tract or perhaps less effective immune clearance.

The observed associations with conjunctivitis and arthralgia could be indicative of infectious or immunological events also occurring in the testis or genitourinary mucosa, which in turn might affect the duration of shedding. Regarding the association between the duration of ZIKV RNA shedding and ejaculatory frequency, one possible explanation is that participant-specific differences in ejaculatory frequency influence the rate at which viral material is flushed from the genital tract<sup>55</sup>.

When these studies are considered as a whole, persistence of the virus and infectivity of ZIKV in semen appears variable, and seminal shedding kinetics were heterogeneous among patients. Although some studies detected prolonged persistence of viraemia in whole blood<sup>52</sup> or showed that the blood remained positive for ZIKV RNA after negativation in semen<sup>48</sup>, the great majority of data report that the virus remains detectable for a longer period of time in semen than in other biological fluids, such as blood and urine<sup>21,31,35–44,46–55</sup>. Additionally, the isolation of infectious virus using cell culture has confirmed the presence of infectious virus for as many as 69 days after symptom onset<sup>21</sup>. Taken together, these data not only indicate the tropism of the virus for the male genital tract but also raise the possibility of viral replication within this system, for example, within the testes. Furthermore, considering the three reported cases of persistent ZIKV RNA detection in the semen of men who had undergone a vasectomy, the virus might be able to infect and replicate not only within the testes and epididymis but also in the prostate, seminal vesicles, and bulbourethral glands<sup>21,47,48</sup>. Thus, the specific factors influencing viral persistence in semen should be identified in order to better understand ZIKV kinetics in humans.

Although several reports describe male-to-female sexual transmission of ZIKV<sup>21–34,42</sup>, few studies have shown female-to-male transmission<sup>22</sup>. Thus, the dynamics of ZIKV in cervical–vaginal samples and the potential of transmission between females and males are not known. Further studies focusing on the presence and infectivity of ZIKV in the vaginal and cervical mucosa are urgently needed to elucidate important questions such as whether genital-tract ZIKV infection is symptomatic in females and how long the virus can remain in the vaginal mucosa or secretions.

#### **Effects on the male genital tract**

The relationship between the presence and persistence of ZIKV in the male genital tract and the effects that this virus can cause in men remain uncertain. Although several reports describe sexual transmission of the virus, which organs or cells are affected and the potential for cellular damage caused by ZIKV are not well understood.

#### **ZIKV and genitourinary symptoms**

Although ZIKV infection is linked with Guillain-Barré syndrome and infection during pregnancy can lead to congenital abnormalities<sup>57,58</sup>, ~80% of ZIKV infections are asymptomatic or are associated with only mild symptoms, making detection of the virus difficult<sup>16,59,60</sup>. Furthermore, sexual transmission of ZIKV has been reported between asymptomatic patients<sup>27,28</sup>.

## REVIEWS

The most commonly reported systemic symptoms, if present, of acute ZIKV infection are maculopapular rash, fever, arthralgia, myalgia, and conjunctival hyperaemia<sup>16,55,60</sup>. Case reports have also described genitourinary symptoms such as haematospermia<sup>25,34,45–47,55</sup>, prostatitis<sup>25</sup>, painful ejaculation, and penile discharge<sup>38</sup> in men who are infected, but the relevance of these symptoms on fertility outcomes is unclear. With regard to ZIKV infection in women, no report has been published in the literature regarding genital symptoms of ZIKV infection.

Macroscopic or microscopic haematospermia is a frequent finding in men and is mainly related to infectious and inflammatory conditions<sup>41</sup>. Although haematospermia is not a specific sign of ZIKV, it might be an indicator that the patient has a seminal ZIKV infection. However, haematospermia has been reported in only 13 patients from six studies that included a total of 207 patients<sup>25,34,45–47,55</sup>. Thus, the occurrence is only ~6%, and more studies need to be performed to further evaluate the presence of this symptom.

The first report of potential sexual transmission of ZIKV was published in 2011 and described two people who had travelled to an endemic area, one of whom developed symptoms associated with ZIKV infection, reporting prostatitis (perineal pain and mild dysuria) on day 2 after symptom onset and haematospermia on day 5 that lasted for 4 days<sup>25</sup>. Despite serological tests and anamneses suggestive of ZIKV infection, RT-PCR did not detect arboviral RNA in any of the samples<sup>25</sup>. Haematospermia, confirmed by direct and macroscopic seminal examinations, was also described in the individual reported by Musso and colleagues<sup>34</sup>.

Huits and colleagues<sup>45</sup> evaluated four patients with systemic symptoms of ZIKV infection, but only one of these men reported painless haematospermia 8 days after a flu-like illness with fever and arthralgia. Urine and semen were collected, and ZIKV infection was confirmed by RT-PCR on the urine collected on day 16. The CT value of the semen on day 16 was lower than the CT value of the urine collected on the same day. ZIKV RNA levels in semen gradually declined to an undetectable level on day 56. Additionally, Souto and colleagues<sup>46</sup> reported a case of a man who presented with self-limiting haematospermia after returning from an endemic region, a month after a prior diagnosis of prostatitis. The first semen sample was obtained 30 days after symptoms began, and the presence of ZIKV was confirmed by RT-PCR.

In a study of ZIKV frequency and persistence in semen after acute symptomatic ZIKV infection, Huits et al.<sup>47</sup> evaluated 15 men, only 1 of whom presented with haematospermia; ZIKV RNA was detected in this semen sample. ZIKV was also detected in semen of 8 of 14 men who did not present with haematospermia. In a prospective study of men with symptomatic ZIKV infection, 5% (8 of 177) of patients reported bloody semen during or shortly after illness onset<sup>65</sup>. At least one semen sample was confirmed positive for ZIKV RNA in 33% (60 of 184) of men, but, within the study, presence of ZIKV RNA was not associated with symptomatology or presence of haematospermia.

Some studies have revealed the presence of microscopic haematospermia in semen. Musso et al.<sup>34</sup>

confirmed the presence of haematospermia by direct and macroscopic examinations of semen in a patient who reported blood in the ejaculate<sup>34</sup>. Microhaematospermia in the absence of macroscopic haematospermia was observed in three men with symptoms and ZIKV-RNA-positive semen. In these patients, tests for seminal occult blood (via detection of haemoglobin and myoglobin pseudoperoxidase activity in the semen) were positive, although direct microscopic and macroscopic examinations of the semen samples did not demonstrate haematospermia. In two patients, semen remained positive for ZIKV RNA at least 1 week after microhaematospermia ceased<sup>51</sup>. Furthermore, Froeschl et al.<sup>48</sup> observed isolated mild microhaematuria without other relevant pathological findings in a man who had undergone vasectomy and was ZIKV positive. By contrast, Gaskell and colleagues<sup>54</sup> reported that, although the patient exhibited ZIKV RNA in his semen, he did not present with any genitourinary symptoms nor was microhaematospermia detected in the sample.

In addition to prostatitis and haematospermia, one study of the frequency and duration of detectable ZIKV RNA in women and men also observed that painful ejaculation (6.7% of men) and penile discharge (2.7% of men) were among the related signs and symptoms<sup>38</sup>.

Despite an apparent association between haematospermia or other genitourinary symptoms and ZIKV infection, these symptoms are not very specific, making it difficult to confirm this association. A possible mechanism for such an effect could be via the virus causing an inflammatory process in the male genital tract<sup>45,47</sup>. Even so, many of the patients positive for ZIKV RNA in semen did not report any genitourinary symptoms<sup>32,33,36,40,53,54,62</sup>. Thus, further studies are required to clarify the link between the presence of viral RNA in semen and symptoms related to changes in the genital tract.

### ZIKV, semen and sperm parameters

Several studies have verified microscopic alterations to semen and spermatozoa in men infected with ZIKV<sup>45,47,52</sup>. Huits et al.<sup>45</sup> evaluated the presence and persistence of ZIKV in the semen of four patients after onset of symptoms compatible with the infection. In this study, the authors assessed sperm count, morphology, motility, and leukocyte and erythrocyte counts in fresh semen samples. Patient 1 presented with microscopic haematospermia in semen samples collected on days 31, 41, 59, and 68. Oligospermia with normal morphology was present on day 31, but sperm counts increased to normal in subsequent samples. ZIKV RNA was detected in semen throughout all 68 days, and ZIKV RNA gradually decreased to undetectable levels. The semen samples collected from patient 2 were not suitable for microscopic analysis, but this man was the only patient in the study to actually report haematospermia among the symptoms; ZIKV RNA was detected until day 50 after symptom onset. The serum of patient 3 tested positive for ZIKV IgM, but RT-PCR did not detect ZIKV RNA in a semen sample that demonstrated a normal sperm count. Finally, patient 4 had no ZIKV RNA detected in the one semen sample, which was obtained on day 10 after symptoms onset, but this sample did demonstrate

oligospermia. The authors hypothesize that the steady decline of ZIKV RNA levels observed in sequential semen samples indicates that the testes were seeded during the viraemic phase. Viral replication would then be contained in the immunoprivileged reservoir of the seminiferous epithelium. Interestingly, and in support of this hypothesis, the kinetics of ZIKV seminal shedding in the patients coincide with the duration of human spermatogenesis, which takes 69–80 days<sup>43</sup>.

In another study by the same team<sup>47</sup>, ZIKV RNA was detected in the semen of 9 of 15 men (60%), 1 of whom had undergone a successful vasectomy. All 11 study participants, for whom the first collected semen sample was microscopically analysed, had presence of leukocytes, and 10 showed haemospermia. Excluding the sample from the man with the vasectomy, six of the semen samples analysed showed oligospermia. Only one patient reported haemospermia among his symptoms, but his semen was not microscopically analysed. These abnormalities occurred irrespective of ZIKV detection in semen. Taken together, 8 of the 14 total semen samples analysed in these two studies demonstrated oligospermia<sup>45,47</sup>. These findings begin to reveal the possible viral tropism to the germinal epithelium of the male genital tract. This evidence also suggests that the virus can alter or even injure germ cells, which might lead to decreased fertility.

The group of Jouguet et al.<sup>52</sup> was the first to publish a study showing the quantitative and qualitative harmful effects on spermatozoa production in patients with ZIKV infection. They collected blood, urine and semen from 15 men at days 7, 11, 20, 30, 60, 90 and 120 after symptom onset. Semen characteristics, including total sperm count, sperm motility, vitality and morphology,

and concentrations of reproductive hormone including testosterone, inhibin, follicle-stimulating hormone, and luteinizing hormone were assessed. Of these 15, 11 men (73%) tested positive for ZIKV RNA in >1 seminal plasma sample or semen sample at day 7. In 4 of these 15 men (27%), ZIKV RNA was never detected in semen or its fractions; 90% of fractions that contained only spermatozoa were positive for ZIKV RNA, and all were from patients who also tested positive with a high ZIKV RNA load in their seminal plasma, which might indicate that the virus is linked to spermatozoa. The averages of the total sperm counts and the total motile sperm counts were both significantly decreased ( $P < 0.0083$ ) by ~50% at day 60 after symptom onset compared with day 7. The multiple anomalies index was also increased at day 30 and day 90 compared with day 7, suggesting an effect on spermatogenesis, but by day 120 the median total sperm count, sperm motility, vitality morphology, and multiple anomalies index did not differ from those of day 7, suggesting that the effects of ZIKV on spermatogenesis might be transient. When native semen (seminal plasma or semen cell pellets) tested positive for ZIKV RNA, the semen volume, total sperm count, and total motile sperm count were significantly reduced compared with those of ZIKV-RNA-negative semen ( $P < 0.05$ ).

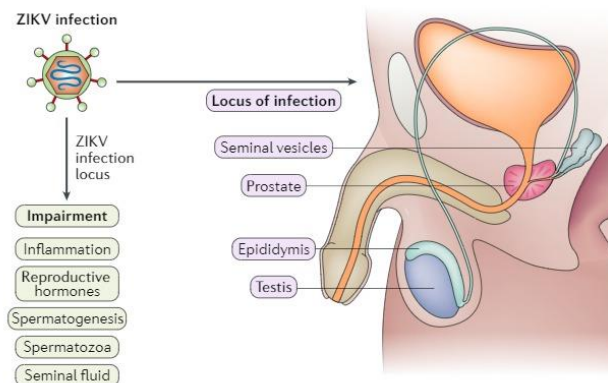
The presence of ZIKV in the male genital tract and seminal fluid is likely to be a sign of infection with pathological sequelae rather than clinically irrelevant contamination. The inflammatory process triggered by some viral infections, including ZIKV, can lead to deterioration of spermatogenesis and obstruction of the seminal tract, which could impair semen characteristics (FIG. 2).

The presence of erythrocytes, leukocytes and oligospermia suggests inflammation and might indicate tissue damage in the male genital tract<sup>45,47</sup>. These findings are not specific, but their manifestation in men infected with ZIKV could be directly associated with the infection process<sup>52</sup>; however, few studies have included microscopic investigation of the semen, and more studies investigating changes in seminal parameters are required to elucidate the changes that ZIKV infection could cause in the male genital tract. In this sense, it is also not possible to determine if the affected semen parameters are reversible<sup>44</sup>.

#### Targeting ZIKV in the male genital tract

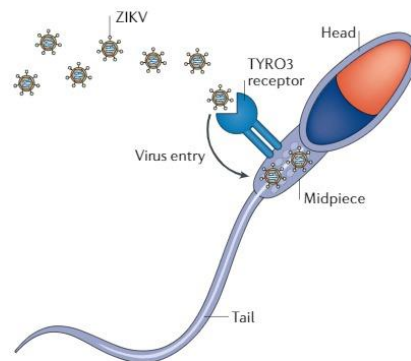
The consequences of ZIKV infection on the male genital tract are not well established, but effects on the spermatozoa that could cause subfertility in the long term are possible. Studies are underway to elucidate the dynamics of ZIKV infection in spermatozoa<sup>53</sup> and which types of semen cell are infected<sup>53,62,63</sup>, and to better understand possible changes in the male genital tract<sup>62</sup>.

In order to identify possible targets and cellular receptors for ZIKV in spermatozoa, Bagasra et al.<sup>63</sup> used semen samples purchased from sperm banks and infected these samples with ZIKV, demonstrating that ZIKV was present primarily at the midpiece of mature spermatozoa in ~30% of the sperm and that ZIKV binds to the midpiece of motile and viable spermatozoa but not to nonmotile or dead sperm. In addition, the comparison of different



**Fig. 2 | Potential location of ZIKV infection in the male genital tract and its relationship with subfertility.** The male genital tract comprises the testis, epididymis, vas deferens, prostate, seminal vesicles, bulbourethral glands, and the penile urethra. Two main functions of the male genital tract are the production, maturation, and protection of spermatozoa from immune aggression and infectious agents and the production of hormones. The presence of Zika virus (ZIKV) in the male genital tract and seminal fluid is likely to be a sign of infection with pathological sequelae rather than clinically irrelevant contamination. The inflammatory process triggered by some viral infections such as ZIKV can lead to deterioration of spermatogenesis and obstruction of the seminal tract, which could impair semen characteristics.

## REVIEWS



**Fig. 3 | Role of tyrosine-protein kinase receptors primarily expressed on the midpiece of human spermatozoa in ZIKV binding and entry into spermatozoa.** Members of the TAM family (TYRO3, AXL, and MER) of transmembrane proteins contain an extracellular, a transmembrane and a conserved intracellular tyrosine kinase domain and bind the ligands GAS6 and Protein S, which recognize phosphatidylserine moieties on dying cells or on enveloped viruses. ZIKV, Zika virus.

fractions of semen suggests that viable sperm seem to be the major source of ZIKV transmission. However, the authors determined that tyrosine-protein kinase receptors (such as TYRO3), which are primarily expressed on the midpiece of human spermatozoa, have a role in ZIKV binding and entry into spermatozoa<sup>63</sup>. These data suggest a potential sexual and/or horizontal route of ZIKV transmission, primarily via infected sperm, whereby ZIKV most likely enters the sperm via the TYRO3 receptor. The TAM receptors — TYRO3, AXL, and MER — comprise a unique family of receptor tyrosine kinases, in that, as a group, they have no essential role in embryonic development<sup>64</sup>. Members of the TAM family of transmembrane proteins contain an extracellular domain, a transmembrane domain and a conserved intracellular tyrosine kinase domain and bind the ligands GAS6 and Protein S, which recognize phosphatidylserine moieties on dying cells or on enveloped viruses<sup>64</sup>. They function as homeostatic regulators in adult tissues and organ systems that are subject to continuous challenge and renewal throughout life; their regulatory roles are prominent in the mature immune, reproductive, haematopoietic, vascular and nervous systems<sup>64</sup>. The TAMs and their ligands are essential for the efficient phagocytosis of apoptotic cells and membranes in these tissues, and in the immune system they act as pleiotropic inhibitors of the innate inflammatory response to pathogens<sup>64</sup> (FIG. 3).

This study by Bagasra et al.<sup>63</sup> is the only one to use an antibody against TYRO3 protein, expression of which has been previously shown on spermatozoa<sup>65</sup>. Their data suggest that the ZIKV binding site is isolated on the midpiece of sperm and seems to be associated with TYRO3 antibodies directed specifically at the internal protein of 100–250 amino acid residues<sup>66</sup>. Previous studies have shown that this portion of TYRO3 has an important role

in receptor function<sup>64,66</sup>. The selective penetrations of ZIKV via the TYRO3 receptor at the midpiece of mature sperm suggest that an unfertilized egg is protected from infection, as the midpiece does not enter the egg during the fertilization process<sup>65,66</sup>. However, this field needs further investigation, as parental mitochondria might enter the egg during fertilization in some cases<sup>65</sup>. Interestingly, some reports suggest heightened susceptibility to Ebola and/or Marburg as mediated by expression of TYRO3 (REFS<sup>67,68</sup>); thus, the TYRO3 receptor might also have an important role in enhancing susceptibility of other flaviviruses<sup>69</sup> in addition to ZIKV. TYRO3 receptors have also been shown to greatly enhance the infection by the dengue virus and the West Nile virus<sup>69</sup>.

In order to identify specific cells in semen that are infected by ZIKV, Biava et al.<sup>53</sup> evaluated ZIKV RNA in semen specimens longitudinally collected from two patients infected with ZIKV who had symptoms of ZIKV infection and had viral RNA detected in their plasma and/or urine. In particular, the diagnostic value of ZIKV RNA testing in different seminal compartments was analysed by comparing the ZIKV RNA content in unfractionated semen, the seminal cellular fraction, and seminal plasma. In parallel, the levels of negative-strand replicative ZIKV RNA (neg-RNA) were measured to establish whether the ZIKV genome was associated with active virus replication. In both patients, a higher ZIKV RNA concentration was observed in the cellular fraction than in the corresponding unfractionated samples. In patient 2, neg-RNA was also detected in the cellular fraction, suggesting ongoing viral replication. The authors suggest that these data demonstrate higher clinical sensitivity of the cellular fraction than does whole-semen testing for ZIKV infection, emphasizing the need to extend ZIKV RNA testing to the cellular fraction before ZIKV and the associated possible risk of sexual transmission can be ruled out.

#### ZIKV detection techniques

An understanding of the viral kinetics of ZIKV is essential to determine the optimal strategy for diagnosing ZIKV infection<sup>70</sup>. The infection process can be divided into acute and convalescent phases. Infection is considered acute (the viraemic phase) until 5 days after the onset of symptoms<sup>56</sup>. When this phase ceases, the convalescent phase begins; in this phase, anti-ZIKV IgM and IgG antibodies usually appear in the bloodstream<sup>56</sup>.

As well as its detection in blood (cells, serum and plasma), urine, and semen, ZIKV has been detected in other body fluids including cerebrospinal fluid, amniotic fluid, and saliva. Semen and urine samples remain positive for the virus for longer periods than blood or saliva samples do<sup>1,71</sup>. A large study that compared RT-PCR results in serum and saliva samples indicated that RT-PCR had higher sensitivity in saliva than in serum, although samples from some people were positive in serum but not saliva, and testing saliva did not extend the duration of detectability of viral RNA after the onset of symptoms<sup>1,70,71</sup>. Although ZIKV RNA is detected in saliva, no reports exist to suggest oral transmission of the infection. RT-PCR for the detection of viral nucleic acids in patients with symptoms in the acute

phase is the most sensitive and specific method and the gold-standard test for the diagnosis of ZIKV infection<sup>65</sup>. However, as viraemia is transient, the test is most likely to be positive within 1 week after the onset of the clinical illness, and the diagnosis might be missed if the patient is asymptomatic<sup>1,72</sup>. However, the persistence of ZIKV RNA in semen makes the detection of ZIKV infection possible in men for longer periods (up to 370 days)<sup>33</sup> than in women (up to 31 days)<sup>73</sup>.

Identification of virus-specific IgM and IgG by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) can be used to diagnose patients in the convalescent phase, although the precise time of the onset and the duration of IgM and IgG antibody responses to ZIKV have not yet been well defined<sup>1,56,70</sup>. IgM antibodies normally develop within ~3 days after the onset of symptoms and can persist for >3 months. IgG antibodies develop days after IgM do and can persist for months to years<sup>56,70</sup>. However, serological cross reactivity of other flavivirus antibodies or vaccines against flaviviruses can occur and presents a major challenge for interpretation of the results<sup>1,56</sup>. Thus, RT-PCR to detect viral RNA in the acute phase is especially useful in geographical areas where concurrent circulation of various different arboviruses is common<sup>72</sup>.

Other tests, such as neutralizing antibodies and viral culture, can also be performed, but they are used predominantly for research purposes<sup>56</sup>. Notably, the detection of viral RNA in bodily samples does not mean that the virus is still infectious, and detection of viable infectious ZIKV is only possible using cell culture techniques.

#### ZIKV infection in animal models

The differences in epidemiology and disease presentation during the ZIKV outbreaks from 2016 and those during previous outbreaks regarding the associated in utero and neonatal effects and Guillain-Barré syndrome in adults have prompted researchers to develop animal models of ZIKV infection and pathogenesis using contemporary virus strains. Despite the fairly short time interval since the outbreak, several animal models have been established to investigate mechanisms of dissemination, pathogenesis, and host immune response to ZIKV in adults, pregnant women, and developing fetuses<sup>74</sup>. Moreover, these models are already in use to evaluate novel therapeutics and vaccines for possible protection against and control of ZIKV infection<sup>74</sup>. The vast majority of studies on ZIKV and the male genital tract are performed on small animals such as mice, as they are more easily accessible than nonhuman primates (NHPs). Models based on NHPs are in use in studies to elucidate the viral dynamics of ZIKV with the intention of observing the distribution of the virus in tissues and the immune response triggered<sup>75–78</sup>, and various animal studies have evaluated the possible damage caused by ZIKV to the tissues of the male genital tract (TABLE 2).

#### Nonhuman primate models

Although mouse models are more easily accessible, NHPs are an attractive model for ZIKV research and drug discovery owing to their similarity to humans<sup>75,79</sup>. NHP models could provide invaluable information

regarding the mechanism of action, efficacy, and safety of drug and vaccine candidates and enable optimization of the product, dose, and route, as was previously performed for HIV vaccines<sup>79</sup>. Before the 2016 ZIKV epidemic, the outcome of ZIKV infection in the rhesus macaque model had not been well characterized; however, the virus was originally isolated from a febrile rhesus macaque, suggesting that viral replication, immune response, and aspects of pathogenesis can be modelled in this species<sup>77</sup>. Rhesus macaques were shown to be susceptible to a ZIKV of Asian lineage<sup>78</sup>, with pregnant animals being viraemic for a longer period than nonpregnant animals; thus, this model will also enable assessments of the effect of maternal ZIKV infection on the developing fetus.

The use of macaque species other than the rhesus macaque, specifically cynomolgus macaques, as a model for human infectious diseases has increased<sup>80</sup>, mostly owing to the reduced availability of rhesus macaques for research purposes after a ban on their export from India and most other South Asian countries. Cynomolgus macaques offer the advantages of smaller size and weight than rhesus macaques<sup>81</sup>, meaning that reduced amounts of drugs are needed for studies in which dosage is based on body weight. Additionally, the smaller animal size provides the additional benefit of easier animal husbandry practices (such as handling and space requirements), translating into considerable cost benefits<sup>76</sup>.

Using NHP models, Osuna et al.<sup>75</sup> performed a study using rhesus and cynomolgus macaques to evaluate the dynamics of ZIKV in blood, tissues, cerebrospinal fluid, and mucosal secretions of five Indian-origin rhesus macaques (two females and three males). The presence of ZIKV RNA was demonstrated at high levels in semen 7–21 days after infection, and viral RNA was detected in semen and urine up to 28 days after infection and 3 weeks after the resolution of viraemia. Seminal plasma ZIKV values ranged between  $3.4 \times 10^4$  RNA copies/ml and  $1.1 \times 10^6$  RNA copies/ml on days 7–21 after infection and between  $3.5 \times 10^4$  and  $5.1 \times 10^4$  RNA copies/ml on day 28 after infection. In addition, the researchers were able to verify regions in the male genital tract that harboured persistent viral foci; the testes, prostate, and seminal vesicles remained positive for ZIKV RNA even after elimination of viral RNA from the plasma. However, they did not specify the cells in which the virus was found. The investigators suggested that some anatomical sites, including the male genital tract, might harbour persistent reservoirs of ZIKV that could facilitate viral transmission to uninfected hosts over extended periods. A study by Koide and colleagues<sup>76</sup> in six cynomolgus macaques attempted to evaluate a potential alternative NHP model for non-rhesus macaque species as a model for human ZIKV infection. They showed high viral loads (between  $10^3$  copies/ml and  $10^4$  copies/ml) in testes samples 8 days after ZIKV inoculation, although, once again, they did not investigate the specific testicular cell types affected. By contrast, Hirsch et al.<sup>77</sup> failed to detect ZIKV RNA in the testes of rhesus macaques after 35 days after virus inoculation but were able to detect viral RNA in the prostate and seminal vesicles. Histological examination of tissues revealed

## REVIEWS

Table 2 | Animal models of ZIKV infection in the male genital tract

Study	Animal model	Male urogenital tropism	Positive biological fluids	Refs
Osuna et al.	Rhesus and cynomolgus macaques	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Testes</li> <li>• Prostate</li> <li>• Seminal vesicles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Blood</li> <li>• Urine</li> <li>• Saliva</li> <li>• Semen</li> <li>• Cerebrospinal fluid</li> </ul>	75
Koide et al.	Cynomolgus macaques	Testes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Blood</li> <li>• Urine</li> <li>• Saliva</li> </ul>	76
Hirsch et al.	Rhesus macaques	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prostate</li> <li>• Seminal vesicles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Blood</li> <li>• Urine</li> </ul>	77
Govero et al.	<i>Ifnar1<sup>-/-</sup></i> mice	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Spermatogonia</li> <li>• Primary spermatocytes</li> <li>• Sertoli cells</li> <li>• Epididymis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Blood</li> <li>• Epididymis</li> <li>• Sperm</li> </ul>	82
Ma et al.	<i>Ifnar1<sup>+/-</sup></i> mice	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peritubular cells</li> <li>• Spermatogonia</li> <li>• Epididymis</li> </ul>	NI	83
Winkler et al.	<i>Rag1<sup>-/-</sup></i> mice	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Spermatogonia</li> <li>• Primary spermatocytes</li> </ul>	Blood	84
Uraki et al.	<i>Ifnar1<sup>-/-</sup></i> mice	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Leydig cells</li> <li>• Epididymis</li> </ul>	Blood	85
Sheng et al.	AG6 mice	Sertoli cells	NI	86
Uraki et al.	<i>Ifnar1<sup>+/-</sup></i> mice	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Testes</li> <li>• Epididymis</li> </ul>	Sperm	87
Kawiecki et al.	IRF3/7 mice	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Epididymis</li> <li>• Seminiferous tubules</li> <li>• Germ cells</li> </ul>	Blood	88
Duggal et al.	AG129 mice	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Testes</li> <li>• Epididymis</li> <li>• Germ cells</li> </ul>	Sperm	89
Chan et al.	Immunosuppressed BALB/c mice with dexamethasone	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Testes</li> <li>• Seminiferous tubules</li> </ul>	Blood	90
Siddharthan et al.	STAT2-knockout hamsters	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kidney</li> <li>• Spermatogonia</li> <li>• Sertoli cells</li> </ul>	NI	91
Griffin et al.	<i>Ifnar1<sup>-/-</sup></i> mice	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Seminiferous tubules</li> <li>• Spermatogenic cells</li> <li>• Sertoli cells</li> </ul>	Sperm	94
Xu et al.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• BALB/c mice</li> <li>• <i>Ifnar1<sup>-/-</sup></i> mice</li> </ul>	NI	NI	95

NI, not informed; ZIKV, Zika virus.

the presence of atypical prostatitis characterized by interstitial neutrophilic, lymphoplasmacytic cellular infiltrates, and glandular microabscesses in one animal. Together, these three studies<sup>75–77</sup> showed that NHP models could be used to glean relevant information about viral dynamics and demonstrated the viral affinity for the male genital tract and the capacity to use this site as a reservoir, suggesting a possible reason for viral persistence in semen. However, none of the studies evaluated the specific cellular localization of ZIKV in the testes, prostate, or seminal vesicles.

#### Small-animal models

Rapid development of small-animal models of ZIKV infection has already led to important discoveries, especially those concerning the congenital transmission and outcomes of ZIKV infection<sup>82–91</sup>. Some studies using

small-animal models have demonstrated an important role for type I interferon responses in protection against ZIKV infection. The NS5 protein of ZIKV inhibits human STAT2, suppressing the type I interferon response to ZIKV and enabling proliferation of virus<sup>92</sup>. By contrast, NS5 does not inhibit murine STAT2, enabling a strong response of type I interferon and suppression of ZIKV infection in mice<sup>92</sup>. Indeed, wild-type mice seem to be able to control ZIKV infection, as their immune system kills off the infection before it becomes symptomatic, whereas mice deficient in IFN $\alpha$  and  $\beta$  receptor subunit 1 (IFNAR1) are susceptible to ZIKV infection, lose weight, and develop neurological disease<sup>93</sup>. Interestingly, wild-type C57BL/6 mice treated with anti-IFNAR antibodies develop viraemia but do not lose weight or develop neurological disease<sup>93</sup>, suggesting that when the interferon response is suppressed



but not deficient, other components of the immune system are able to control ZIKV infection<sup>92</sup>. On this basis, immunocompetent mice are resistant to ZIKV infection by peripheral inoculation and, therefore, most studies have used immunocompromised animals — usually C57BL/6 mice with a variety of knockouts and deficiencies, including *Rag1*<sup>-/-</sup> (type I interferon signalling blocked), *Ifnar1*<sup>-/-</sup> (null for type I IFN $\alpha$  and IFN $\beta$  receptor chains), IRF3/7 (interferon regulatory factors IRF3 and IRF7 blocked), AG6 (deficient in IFN $\alpha$  and IFN $\beta$  receptor and IFN $\gamma$  receptor (IFNGR)), or AG129 (IFN $\alpha$  and IFN $\beta$  receptor and IFN $\gamma$  receptors knocked out)<sup>82–89</sup> — to facilitate ZIKV infection and dissemination. Other researchers induced immunosuppression using dexamethasone in an immunocompetent model such as a BALB/c mouse<sup>90</sup>. Additionally, a study by Siddharthan et al.<sup>91</sup> used STAT2-knockout hamsters to investigate the replication and pathogenesis of ZIKV.

Govero et al.<sup>82</sup> verified the occurrence of damage in the testes of wild-type C57BL/6 mice treated with an anti-IFNAR1 monoclonal antibody to facilitate infection and dissemination of ZIKV. Two strains of ZIKV were used: Dakar-41519 from Africa (a mouse-adapted African ZIKV strain) and a contemporary Asian ZIKV strain (H/PF/2013) from French Polynesia (2013) that replicates less efficiently in mice. Using the African strain, the researchers observed the persistence of ZIKV in the testes and epididymis, causing tissue injury that was associated with the presence of inflammatory cellular infiltration, causing reduction in testosterone and inhibin B levels and, consequently, oligospermia. In addition, using *in situ* hybridization, they verified that ZIKV preferentially infected spermatogonia, primary spermatocytes, and Sertoli cells in the testis, resulting in cell death and destruction of the seminiferous tubules, indicating possible effects on fertility. Additionally, ZIKV RNA and infectious virus were also detected in mature sperm collected from the epididymis. To confirm the changes caused by ZIKV in the genital tract of male mice, the researchers verified that the pregnancy rate and the number of viable fetuses from breeding infected males and uninfected females were lower than the rates and numbers achieved when breeding uninfected females with uninfected males. Less damage was caused by a contemporary Asian ZIKV strain, which, according to the authors, might be due to this virus replicating less efficiently in mice. In this way, Govero et al.<sup>82</sup> demonstrated that ZIKV infection causes testicular and epididymal damage in mice that can result in a reduction in key sex hormones, destruction of germ and somatic cells in the testes, loss of mature sperm, and subfertility. The experiments using mouse-adapted Dakar ZIKV indicated that the Sertoli cells might be a target for ZIKV in testes, causing detachment from the basement membrane and dissolution of the blood–testes barrier.

Supporting these data, in a second study using wild-type C57BL/6 and *Ifnar1*<sup>-/-</sup> mice, Ma et al.<sup>83</sup> also demonstrated that ZIKV can induce severe inflammation in the testes and epididymis but not in the prostate or seminal vesicles, which correlates with expression of the ZIKV entry cofactor/attachment receptor AXL. AXL is highly

enriched in the testes and epididymis, but no expression has been shown in either the prostates or seminal vesicles of mice and humans. In addition, the researchers noted that ZIKV induces an innate immune response in Leydig cells, Sertoli cells, and epididymal epithelial cells, producing pro-inflammatory cytokines and chemokines. Levels of major pro-inflammatory cytokine mRNA, including tumour necrosis factor (TNF), IL-6, IFN $\beta$  and CXCL10, dramatically increase in ZIKV postinfection. In peritubular cells and spermatogonia, the production of cytokines was not fast and not abundant, suggesting that these cells might be vulnerable to ZIKV infection and act as a potential viral replication site and highlighting that infection could contribute to male infertility. By contrast, Winkler et al.<sup>84</sup> used a wild-type *Rag1*<sup>-/-</sup> C57BL/6 mouse model to show the importance of the adaptive immune response to ZIKV for controlling and preventing the infection in testes. These data showed that, although wild-type C57BL/6 mice mount cell-mediated and humoral-adaptive immune responses to ZIKV, these responses are not required to prevent disease. However, when the type I interferon response of mice was suppressed, then the adaptive immune responses became critical. This effect was shown by using antibodies to block type I interferon signalling in *Rag1*<sup>-/-</sup> mice; the mice showed dramatic weight loss and ZIKV infection in the brain and testes. This phenotype was not observed in immunoglobulin-treated *Rag1*<sup>-/-</sup> mice or wild-type mice treated with anti-type I interferon alone. Furthermore, the responses of CD8<sup>+</sup> T cells in pregnant mice exposed to ZIKV were diminished compared with those of nonpregnant mice. The authors suggested that diminished cell-mediated immunity during pregnancy could increase virus spread to the fetus. Finally, they showed that polygonal cells such as spermatogonia and primary spermatocytes could be infected by the virus and that these cells can function as reservoirs of ZIKV, as no cellular apoptosis was observed.

Using *Ifnar1*<sup>-/-</sup> male C57BL/6 mice, Uraki et al.<sup>85</sup> showed that the testes of ZIKV-infected mice were significantly smaller ( $P < 0.05$ ) than those of noninfected mice at 21 days postinfection, indicating progressive testicular atrophy. They hypothesized that the active infection of Leydig cells within the interstitial regions of the testes could cause decreased testosterone production, resulting in testicular atrophy. Additionally, another study from the same team investigated ZIKV testicular shedding dynamics and the effect of ZIKV sexual transmission from infected male and naive female *Ifnar1*<sup>-/-</sup> mice as well as fetal effects<sup>87</sup>. The team identified intact virions both on and within sperm, suggesting that seminal fluid, as well as the sperm itself, can serve as a vehicle of transmission. Furthermore, fetal weight was significantly reduced in pups from naive female mice cohoused with infected male mice compared with that of pups from the control female mice cohoused with naive male mice. These results strongly suggest that ZIKV can transmit from an infected male to a naive female and cause associated fetal birth abnormalities.

Sheng et al.<sup>86</sup> infected AG6 mice with ZIKV and observed marked signs of reproductive system effects, such as spermatorrhoea and testicular haemorrhage.

## REVIEWS

Histological assessment using haematoxylin and eosin staining demonstrated atrophic seminiferous tubules and disappearance of the tubule lumen, which were also accompanied by alterations in serum androgen levels. Serum androgen levels showed a trend towards an increase at 5 days postinfection and a significant decrease at 8 days postinfection ( $P < 0.05$ ). The main active form of testosterone, dihydrotestosterone, showed a similar pattern of change and increased more significantly ( $P < 0.01$  for 5 days postinfection and  $P < 0.05$  for 8 days postinfection). Moreover, using immunofluorescence, the authors showed the presence of ZIKV antigens distributed in both the seminiferous tubules and interstitial spaces, which increased in number with the progression of infection. In the seminiferous tubules, ZIKV-antigen-positive markers often colocalized with Sertoli cell markers, and colocalization was confirmed by transmission electron microscopy, indicating that Sertoli cells might be major targets for ZIKV in mice testes. Thus, in addition to elucidating a potential mechanism of sexual transmission of ZIKV, the study also highlights the importance of monitoring long-term effects of this virus on the male reproductive system.

Infection of male IRF3/7 mice led to severe necro-suppurative epididymitis associated with abundant viral antigen within the epididymal lining and presence of exfoliated epithelial cells in the epididymal lumen, which could account for reports of haematospermia<sup>88</sup>. Moreover, the affected portion of the epididymis was in stark contrast to other portions of the epididymis, which displayed normal architecture and no viral antigen. Viral antigen was also visualized in germ cells in the seminiferous tubules of the testicles. In addition, abundant ZIKV antigen staining in the seminal fluid inside the lumen of the vas deferens was observed, which was mostly concentrated in what were interpreted as exfoliated epithelial cells. Immunohistochemical positive labelling of the exfoliated epithelial cells from the epididymis for ZIKV could suggest alternate cellular mechanisms of sexual transmission in addition to via spermatozoa.

A study in male AG129 mice identified ZIKV antigens by immunohistochemistry in the testicular and epididymal epithelia and exfoliated germ cells<sup>89</sup>. Infectious virus was detected in semen between 7 days and 21 days postinoculation, and ZIKV RNA was detected in semen up to 58 days postinoculation, indicating that ZIKV RNA was still shedding into seminal fluids despite undetectable levels of infectious virus in the semen. When ZIKV leaves the testes and epididymis to become part of the seminal fluid, the virus can be neutralized by an adaptive immune response, which could explain the decreased infectivity of ZIKV in semen<sup>89</sup>. In total, 73% (8 of 11; 95% CI 43–91%) inoculated male AG129 mice transmitted ZIKV to at least one female AG129 mouse. The percentage of mated females that became infected was consistently near 50%, with evidence of fetal infection in resulting pregnancies. Two of the seven pregnant infected females, which were mated on day 7 postinoculation of the male, had evidence of fetal demise at days 10 and 12 after mating, respectively. Semen from vasectomized mice contained significantly lower levels of

infectious virus than semen from nonvasectomized mice ( $P < 0.001$ ), although sexual transmission still occurred, indicating that — despite the immune-privileged status of the testes and epididymis, which might contribute to viral persistence in the male genital tract — other genital organs can also contribute to the prolonged seminal shedding of ZIKV RNA<sup>89</sup>.

Chan et al.<sup>90</sup> developed a small-animal model for ZIKV infection using immunosuppression with dexamethasone of BALB/c mice. The mice infected with ZIKV developed disseminated infection with viraemia and multiorgan involvement including brain, urogenital tract, intestine, liver, spleen, pancreas, heart, lung, and salivary glands. They found evidence of an inflammatory process in the testes with markedly necrotic and haemorrhagic seminiferous tubules, indicating that ZIKV-induced orchitis might have long-term effects on fertility. Finally, a study in adult *Stat2*-knockout hamsters showed ZIKV-infected cells with morphologies suggestive of Sertoli cells and spermatogonia observed in the testes, which could have implications for sexual transmission and male sterility<sup>91</sup>.

In an innovative study, Griffin et al.<sup>94</sup> tried to develop a vaccine to protect *Irfar1*<sup>-/-</sup> mice from ZIKV-induced testicular damage. First, they showed that ZIKV can promote a decrease in testicle size and weight compared with those from mice not infected by the virus. Additionally, they observed damage to the seminiferous epithelium, including degeneration of the spermatogenic lineage. Furthermore, in the testis at 14 days postinoculation, large areas of the normal architecture of the seminiferous tubule were replaced by necrotic debris and inflammatory cells, and at 21 days postinoculation, these areas were replaced by fibrous tissue and inflammatory cells, suggesting that ZIKV resulted in scarring within the tissue. The epididymis showed abundant necrotic sloughed epithelial cells and degenerating spermatozoa in the lumen. Moreover, this study was the first to show impairment of sperm parameters in an animal model: high levels of ZIKV RNA were detected in sperm isolated from the caudal epididymis at day 7, which persisted until at least day 21. Presence of fragmented sperm with dissociation of the sperm head from the tail was observed in ZIKV-infected mice and a significant reduction in the mean total sperm count and in the percentage of sperm motility was noted in ZIKV-infected animals compared with controls ( $P = 0.0022$  and  $P = 0.0001$ , respectively), which worsened as the infection progressed. However, the authors showed that immunization with a synthetic DNA vaccine encoding a ZIKV pre-membrane and envelope consensus sequence conferred complete protection against ZIKV-associated damage to the testes and prevented ZIKV persistence in the testes, epididymis, and sperm. These data suggest that DNA vaccines and investigational therapeutics warrant further examination as a potential means to reduce ZIKV persistence in the male reproductive tract.

In a second vaccine study, Xu et al.<sup>95</sup> carried out a study in *Irfar1*<sup>-/-</sup> BALB/c mice to evaluate the effectiveness of the adenovirus AdC7-M/E vaccine against ZIKV. As expected, infected, nonvaccinated mice exhibited a severe decrease in testicular size and mean testis weight

when compared with those from uninfected animals and the AdC7-M/E-vaccinated group at 16 and 30 days postinoculation, which displayed no effects on size and weight of the testes. In addition, histopathological analysis showed that the infected, nonvaccinated mice had displayed damage to the normal morphological architecture of the testes and complete loss of the seminiferous tubules, which were replaced by fibrous tissue and inflammatory cells with severe testis damage at 16 days that further progressed through to 30 days postinoculation. However, vaccinated, uninfected animals exhibited normal phenotypes, demonstrating that AdC7-M/E provided mice with complete protection against damage to the testes induced by ZIKV. According to the authors<sup>95</sup>, AdC7-M/E exhibited exceptional performance as a ZIKV vaccine, including provision of protective efficacy by a single vaccination, rapid development of a robust and durable humoral response, robust T cell responses, and sterilizing immunity achieved by a single vaccination. These advantages of AdC7-M/E strongly support its potential application as a promising ZIKV vaccine in the clinic.

In general, these animal studies suggest that ZIKV has tropism towards the cells of the male genital tract and that active replication is occurring in several male genital-tract tissues — especially the testis and epididymis but also the prostate and seminal vesicles — weeks after clearance of the virus from the blood. Studies mainly in mouse and hamster have shown that ZIKV can cause testicular and epididymal damage in animals, which can progress to a reduction in male sex hormones and destruction of germ cells, resulting in effects on sperm maturation that can create serious problems related to fertility. These data might also explain the presence of genitourinary symptoms such as haematospermia, dysuria, and perineal pain in men infected with ZIKV described in some reports<sup>25,34,51</sup>. However, studies in small animals are performed using immunosuppressed models, which might generate more extreme results than in otherwise healthy humans. Thus, further studies are needed — particularly in NHPs — to elucidate the cellular tropism and the viral dynamics and damage in the male genital tract.

#### ZIKV infection and cell lines

The detection of viral RNA in semen does not mean that the virus is still infectious, and cell culture techniques to detect viable ZIKV are, therefore, fundamental to understanding the dynamics of ZIKV viability, persistence and transmission, as well as to investigating ZIKV cell tropism in cell types of the genital tract (TABLE 3).

#### Infectivity and viral dynamics

**ZIKV semen infection in cell cultures.** Most studies to date have been performed on Vero cells, an African green monkey kidney epithelial cell line that is deficient in IFN $\alpha$  and IFN $\beta$  and commonly used to titre viruses<sup>96</sup>. End point titrations in various cell lines, including that of Vero cells (from the European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC)), Vero E6 cells (Vero C1008; from the American Type Culture Collection (ATCC) CRL-1586) and BHK-J21 cells (baby hamster kidney cells; ATCC CCL-10) revealed that Vero cells are especially permissive to ZIKV<sup>97</sup>, meaning that these cells have been widely used

in cell culture studies of ZIKV. Some studies specifically use the Vero E6 cell line, which exhibits some degree of contact inhibition and forms a monolayer, and is useful for growing slowly replicating viruses, or the Vero B4 cell line, which is also an interferon-deficient primate cell line susceptible to a number of viruses and used in virus replication studies and plaque assays. The human kidney 2 (HK2) cell line has also been used in some studies to verify the tropism of ZIKV in human renal cells. HK2 is a proximal tubular cell line derived from normal kidney cells that were immortalized by transduction with human papilloma virus 16 (HPV-16) *E6* and/or *E7* genes<sup>98</sup>. Finally, some studies use the C6/36 cell line, which is an *A. albopictus* clone cell line and is, therefore, excellent for studying ZIKV replication.

A number of studies have demonstrated ZIKV replication in Vero cells after inoculation of semen samples. Musso et al.<sup>34</sup> cultured two different semen samples infected by ZIKV on Vero cells after quantification by RT-PCR and found replicative virus in these two semen samples analysed. A second study also replicated ZIKV in Vero cells and noted that the viral load increased by 4 log<sub>10</sub> on day 3 and day 8 after inoculation. According to the authors, this infectious viral load in semen suggests that ZIKV is a sexually transmitted pathogen<sup>36</sup>. Positive ZIKV culture has been achieved by inoculating monolayers of Vero cells with a semen sample obtained on day 7 after symptom onset<sup>99</sup> and using a culture of semen samples positive for ZIKV RNA, determined by RT-PCR, at day 69 (REF.<sup>21</sup>), demonstrating that ZIKV can be cultured from semen even as late as ~10 weeks after infection. Using Vero E6 cells, infectious virus was isolated from the semen of two patients with high ZIKV RNA load<sup>33</sup>, and a study that investigated the persistence and infectivity of ZIKV in semen inoculated positive samples onto Vero cell lines and confirmed ZIKV propagation in semen of two of a total of five patients studied<sup>44</sup>. Furthermore, ZIKV has been isolated on Vero B4 cells from an ejaculated sample collected on day 9 after disease onset<sup>48</sup> and on Vero B6 (REF.<sup>100</sup>) on day 6 after symptom onset. In this study, the isolate was then propagated again on Vero E6 and also on a human retinal pigment epithelial cell line (ARPE), but a substantial gain in viral load occurred only in the Vero E6 cells, suggesting that these cells constitute a better model for the study of ZIKV infectivity. Together, the above studies using viral cultures of semen samples show viral infectivity, which can lead to sexual transmission of ZIKV.

In another study, Vero E6 cells were exposed to the ZIKV MR-766 strain for 1 hour at 37 °C at a multiplicity of infection of 1. At the end of the adsorption period, cells were washed and incubated at 37 °C. At 0, 6, 24, 48, 72 and 96 hours postinfection, cells and supernatants were harvested and assayed for ZIKV total and replicative ZIKV RNA (neg-RNA) content<sup>53</sup>. The researchers observed that cell-associated ZIKV total RNA and neg-RNA started to increase after 6 hours after infection and peaked at 48 hours after infection, whereas ZIKV total RNA and neg-RNA were below the limit of quantification in supernatants at 0 and 6 hours postinfection, increased at 24 hours postinfection and peaked at 48 hours postinfection. The neg-RNA was mostly cell-associated until

## REVIEWS

Table 3 | Studies evaluating ZIKV in semen by cell culture techniques

Study	Period of culture	Culture type	ZIKV isolation	Refs
Barzon et al.	NI	Vero E6 cells	Positive	33
Arsuaga et al.	5–7 days	Vero cells	Positive	21
D'Ortenzio et al.	NI	NI	Positive	24
Frank et al.	NI	NI	Negative	31
Musso et al.	6 days	Vero cells	Positive	34
Nicastri et al.	7 days	Vero E6 cells	Negative	35
Froeschl et al.	7 days	• Vero B4 cells • C6/36	Positive	48
Atkinson et al.	3–7 days	• Vero cells • C6/36 cells	Positive	49
Mansuy et al.	3–8 days	Vero cells	Positive	37
Paz-Bailey et al.	NI	NI	Positive	38
Barzon et al.	NI	NI	Negative	40
Harrower et al.	NI	NI	Negative	42
García-Bujalance et al.	5–7 days	Vero cells	Positive	44
Huits et al.	NI	NI	Negative	45
Huits et al.	7 days	• Vero cells • C6/36 cells	Positive	47
Bagasra et al.	NI	• CRL-2226 • Vero cells	Positive	63
Biaeva et al.	0, 6, 24, 48, 72 and 96 hours	Vero E6 cells	Positive	53
Jang et al.	NI	Vero cells	Positive	99
Percivalle et al.	NI	Vero E6 cells	Positive	100
Chen et al.	24–48 hours	• C6/36 cells • HK2 cells	Positive	98
Matheron et al.	NI	NI	Positive	101
Spencer et al.	Up to 14 days	• 191 cells • LNCaP cells	Positive	102
Kumar et al.	At least 6 weeks	Sertoli cell and Leydig cell primary cultures	Positive	104

NI, not informed; ZIKV, Zika virus.

24 hours postinfection, and the cell:supernatant ratio reversed after 72 hours postinfection when the cytopathic effect was maximal. These results were used as a basis to determine the values of neg-RNA levels as a surrogate marker of ongoing ZIKV replication in semen samples.

Atkinson et al.<sup>49</sup> attempted to isolate the virus in both Vero and C6/36 cells and observed propagation of the original semen sample provided 13 days after onset of symptoms only in the C6/36 cells, although the infected supernatant from these cells was capable of infecting Vero cells and produced a cytopathic effect suggesting the presence of infectious virus in the semen. A further study<sup>47</sup> attempted to isolate the ZIKV from all initial semen samples from patients with ZIKV infection by inoculating the supernatant of liquefied and centrifuged semen with confluent C6/36 cells. When considerable virus-induced cytopathic effects were visible after one week, the supernatant was passaged onto Vero cells and grown for one week. Laboratory staff monitored virus-induced cytopathic effects and confirmed such effects by RT-PCR. ZIKV was isolated from one semen sample,

collected 11 days after symptom onset. The cytopathic effect appeared only in Vero cells after passage on the C6/36 culture. In some studies, the cell type studied was not reported; among them, D'Ortenzio et al.<sup>24</sup> and Matheron et al.<sup>101</sup> both isolated ZIKV from semen samples on day 18 and day 24 after the onset of symptoms, suggesting long-lasting persistence of infectious ZIKV in semen. Paz-Bailey et al.<sup>38</sup> successfully isolated ZIKV in 6 of 20 semen samples, which suggests the presence of infectious virus in these samples with a possibility of sexual transmission.

Chen et al.<sup>98</sup> replicated ZIKV in C6/36 cells and in HK2 cells and noticed that two different ZIKV strains could efficiently infect this lineage at 24 hours and 48 hours postinoculation, producing cytopathic effects at 48 hours. Interestingly, a study that attempted to determine ZIKV cellular targets used ZIKV-infected CRL-2226 neuroblastoma (which have previously been documented to show high permissiveness to ZIKV) as a virus-positive control and efficiently propagated a ZIKV strain in Vero cells<sup>63</sup>.

Additionally, in some studies, ZIKV isolation in cell culture was attempted with collected semen samples of patients who had been infected, but no ZIKV isolates were obtained<sup>35,40,42,45,46</sup>. Negative culture for ZIKV from semen samples might reflect the absence of infective viral particles but might also be due to problems such as the technique of culture or type of cells used or the presence of the virus inside the seminal cells. Finally, in some studies, despite a serological test and/or semen positive for ZIKV, a culture of virus from semen was not attempted<sup>31,36,54</sup>.

**Tropism for cell lines.** Few studies have evaluated the cellular tropism of ZIKV. An interesting study investigated ZIKV cell tropism in two types of immortalized human prostate epithelial cell (19I prostate stromal cells and LNCaP prostate epithelial adenocarcinoma cells) using 3D prostate organoids with three contemporary strains of the virus isolated from people in the Americas who had been infected<sup>102</sup>. The 19I cells are human prostate mesenchymal stem cells (MSCs), derived from a healthy prostate donor, that maintain a normal phenotype in culture for several months. They are nontransformed stem cells, which can differentiate into any mesenchymal cell lineage, have not been genetically engineered, are phenotypically and genetically identical to primary bone-marrow-derived MSCs, and behave the same as bone-marrow-derived MSCs in culture<sup>103</sup>. LNCaP cells are human prostate carcinoma cells derived from a left supraclavicular lymph node metastasis. They are adherent, single cells and form loosely attached clusters. The authors showed that ZIKV infects, replicates and produces infectious viruses in prostatic stromal MSCs (19I cells), prostate epithelial adenocarcinoma cells (LNCaP cells), and organoids constructed from a combination of these cells, suggesting that ZIKV replication can occur in the human prostate, which offers a potential explanation for the secretion of ZIKV in semen leading to sexual transmission. Using primary cell cultures, one study showed that ZIKV infection of Sertoli cells was dependent on the cell-surface receptor AXL, suggesting that this membrane protein is a ubiquitous entry factor for multiple human cell types. Interestingly, although Leydig cells express AXL, they do not support efficient ZIKV replication, suggesting that the restriction point is further downstream of receptor binding and that the candidate ZIKV cofactor and/or attachment receptor AXL is differentially expressed in the male genital tract<sup>104</sup>. In cell culture, Sertoli cells could be infected with ZIKV for at least 6 weeks and ZIKV infection of Sertoli cells resulted in dramatic changes to the transcriptional profile of these cells — RNA sequencing analysis of acutely infected Sertoli cells revealed dysregulation of >9,000 mRNA transcripts with *ISG* being the main group of genes that was upregulated during both acute and persistent ZIKV infection<sup>104</sup>. In addition, a dramatic increase in the production and secretion of fibroblast growth factor 2 (FGF2) — a cytokine that was found to enhance ZIKV replication and support viral persistence — was found to occur during ZIKV infection<sup>104</sup>. Moreover, as the amount of FGF2 secreted by Sertoli cells determines the balance between maintenance of spermatogonial

stem cells and their differentiation<sup>105</sup>, the dysregulation of FGF2 by ZIKV infection might have implications for male fertility. Finally, the authors showed that ZIKV replication in Sertoli cells can be significantly inhibited by a number of drugs, including an FGF-receptor antagonist, indicating potential therapeutic options to limit sexual transmission<sup>104</sup>.

The current outbreak of ZIKV infection provides an important opportunity to perform cell culture studies with semen samples or virus isolated from semen to improve understanding of the dynamics of ZIKV infectivity. Considering that the literature is scarce and conflicting, new studies related to infectivity and tropism for specific cells of the male genital tract are necessary in order to better establish the natural history of ZIKV and the mechanisms by which the virus can be transmitted and impair genital health.

#### Infection of specific cells: hypotheses

Several studies have reported the presence of infectious ZIKV in seminal fluid and in spermatozoa months after exposure to the virus<sup>34–50,53</sup>. Some studies have reported that men infected with ZIKV can present with genitourinary symptoms including haematospermia<sup>25,34,45,47,54</sup>, prostatitis<sup>25</sup>, painful ejaculation<sup>38</sup>, and penile discharge<sup>38</sup>, but the effect of ZIKV infection on the reproductive organs in humans remains a matter of debate.

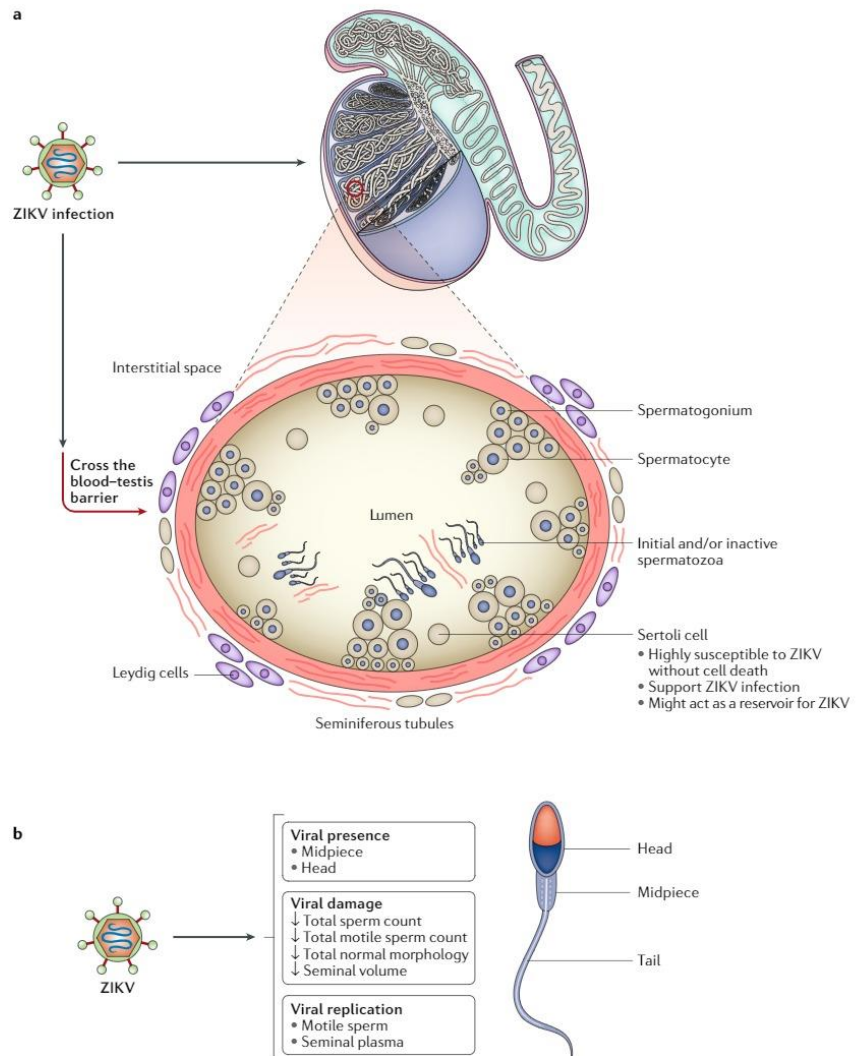
Most of the available information regarding ZIKV in the male genital tract was obtained from studies using animal models, such as mice<sup>82–90,93</sup>, monkeys<sup>75–77</sup>, and hamsters<sup>91</sup>, or primary cell cultures of human prostate cells<sup>102</sup>, Sertoli cells, or Leydig cells<sup>104</sup>. In animal models, studies in mice have described major effects, such as orchitis and epididymitis, following systemic infection of immune-compromised animals with ZIKV<sup>82,83</sup>. In NHPs, foci of ZIKV-infected cells were shown to be localized in the testes<sup>75,76</sup>, prostate<sup>75,77</sup>, and seminal vesicles<sup>75,77</sup>, but the effects were less deleterious. This discrepancy might be due, at least in part, to the use of immunodeficient, knockout mice, as wild-type mice seem able to control ZIKV infection as their immune system kills off the infection before it becomes symptomatic. In studies using primary cell cultures, human prostate MSCs and epithelial adenocarcinoma cells were infected by ZIKV, and the virus was able to replicate and produce infectious viruses<sup>102</sup>. Furthermore, primary human Sertoli cells, but not Leydig cells, are highly susceptible to ZIKV infection<sup>102</sup>. Specifically, Sertoli cells support high levels of virus replication and shedding for prolonged periods of time<sup>104</sup>, which is in agreement with evidence from the studies in animal models.

Taken together, the results of animal and human primary cell line studies are convergent, meaning that some conclusions can be drawn. First, the anatomy of the mammalian testis and the process of spermatogenesis must be considered in the context of the data on ZIKV in the male genital tract. The testis consists of seminiferous tubules surrounded by interstitial tissue, which includes Leydig cells, blood vessels, leukocytes, and fibroblasts (FIG. 4a). Spermatogenesis takes place in the seminiferous tubules, which are composed of Sertoli cells and maturing germ cells surrounded by

## REVIEWS

one (in rodents) or more (in large animals) layers of peritubular myoid cells<sup>106,107</sup>. The majority of the germ cells need immune protection, as they first arise after systemic tolerance is established and express novel cell-surface and intracellular antigens that can elicit an immunological response<sup>108</sup>. Sertoli cells protect these autoantigenic germ cells by forming the blood–testis barrier and expressing immunoregulatory factors, thereby creating an immune-privileged environment, which is a prerequisite for the survival of testicular

germ cells<sup>108</sup>. In vivo, mammalian Sertoli cells cease to divide after puberty, which is a characteristic that likely serves to maintain the structural integrity of the blood–testis barrier<sup>109</sup>. In vitro, primary human Sertoli cells are shown to divide very slowly, approximately once every 4 days<sup>110</sup>, and only up to passage eight or nine. As Sertoli cells maintain the blood–testis barrier, direct infection of these cells might facilitate entry of ZIKV into the lumen of seminiferous tubules enabling infection of developing spermatogonia. As data suggest that



**Fig. 4 | Possibility of ZIKV interacting directly with spermatogenic cells and spermatozoa. a** | During spermatogenesis, Zika virus (ZIKV) can attach and internalize in cells of the seminiferous tubules. **b** | In human mature dead sperm stained with eosin–nigrosin (red), ZIKV can attach and internalize in the sperm head and midpiece.

Sertoli cells might act as reservoirs for long-term replication of ZIKV in the testes, this process would enable the virus to continually infect germ cells and developing spermatocytes even after peripheral clearance<sup>104</sup>. In agreement with these *in vitro* data, Joguet et al.<sup>52</sup> studied sperm characteristics of men who were infected over time following ZIKV infection and showed early sperm alterations that could result from viral infection of the epididymis with direct or indirect effects on spermatozoa, which manifest as decreased (~50% lower) sperm count and total motile sperm count during epididymal transit (mean duration of 12 days) or testis infection, or both, affecting late spermiogenesis (duration of 23 days). Interestingly, a separate study by Huits et al.<sup>47</sup> showed that the duration of ZIKV shedding in semen coincided with the time required for spermatogonial renewal, differentiation and proliferation in humans (reported to be 74 days; 95% CI 69–80)<sup>111</sup>. These data provide key insights into understanding how ZIKV persists in the male genital tract, further highlighting the potential for ZIKV to have deleterious effects on male fertility (FIG. 4a,b). Second, male fertility depends on the two equally important major components of semen: healthy spermatozoa (in terms of their vitality, motility and morphology) and the composition of seminal fluid, which is important for sperm function. Secretory products from the seminal vesicles and prostate are crucial for sperm motility, viability, and chromatin stability, but they are also important for semen coagulation and liquefaction<sup>112–114</sup>. The detection of ZIKV RNA in the semen of three men who had undergone vasectomy<sup>21,47,48</sup>, two of whom also had virus isolated from their semen<sup>21,48</sup>, reinforces the results of animal and primary human cell studies in which the virus can replicate not only in the testes but also in the prostate and seminal vesicles. These findings reveal a new possible mechanism in which the virus can lead to subfertility by changing the proportion and composition of the fluid secreted by the major accessory male organs, the prostate, and the seminal vesicles.

#### Implications for assisted reproduction

As ZIKV can be sexually transmitted, leading to widespread transmission of the virus, the pregnancy-related risks associated with the virus could cause problems for an increasing number of people desiring treatment for infertility. Specifically, a potential risk of disease transmission exists at several stages of assisted reproduction using a variety of assisted reproduction technologies (ARTs)<sup>115</sup>. However, as yet, no study has reported the transmission of ZIKV via semen during use of ART.

No validated commercial tests based on RT-PCR have been developed for the detection of ZIKV in semen. Additionally, understanding of how the test results should be interpreted is limited, especially considering that detection of ZIKV RNA in semen does not necessarily indicate that a replication-competent or infectious virus is present<sup>55</sup>. Another complicating factor is that the serological tests do not provide further clarity, as a negative serum test result does not exclude the possibility of ZIKV being present in semen<sup>115</sup>. Moreover, serological testing for ZIKV IgM and IgG is

currently confounded by the cross reactivity with other circulating flaviviruses, including dengue virus<sup>116</sup>. As a result, testing of semen is not currently recommended by the US Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and the WHO<sup>115</sup>.

A study on samples from asymptomatic men, which showed a high percentage of ZIKV RNA detection (~35%) in their semen<sup>117</sup>, raises further concerns and highlights the potential threat of ZIKV for reproductive medicine and the implications for ART. The study included 14 blood donors who tested positive for ZIKV RNA in plasma collected at the time of asymptomatic blood donations. Overall, 5 of 14 (35.7%) tested positive for ZIKV RNA in semen collected 7–54 days after the index donations. The study authors emphasized an urgent need for licensed molecular tests to detect ZIKV RNA in semen and also concluded that systematic serological screening of semen donors should be performed.

The CDC, European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), FDA and WHO recommendations do not directly address ART issues related to ZIKV outbreaks; however, the recommendations provided for women of childbearing age or those planning pregnancy can also be applied to ART<sup>56</sup>. Several recommendations are applicable to male travellers returning from affected areas and their biological materials. First, people should not try to conceive naturally, donate gametes, or proceed with fertility treatment for 6 months according to the Human Fertilization and Emergency Act (HFEA). Second, sperm donors who have been infected with ZIKV should be deferred from donation for up to 6 months unless the semen tests negative for ZIKV. Third, anonymous or directed donors of sperm, oocytes, and embryos will be deemed ineligible if they have any of the following risk factors: medical diagnosis of ZIKV infection in the past 6 months, residence in or travel to an area with active ZIKV transmission within the past 6 months, or history of sexual contact with a male partner who, during the 6 months before this sexual contact, received a diagnosis of or experienced an illness consistent with ZIKV disease or had travelled to an area of active ZIKV transmission. In these recommendations, the emphasis is placed on the fact that the sperm preparation process that has been shown to be effective for minimizing the risk of HIV transmission has not yet been demonstrated to be effective in preventing transmission of ZIKV<sup>56</sup>.

Additionally, some professional societies have proposed recommendations directly applicable to the management of ART in patients with ZIKV. The American Society for Reproductive Medicine (ASRM) guidelines were developed with input from the CDC<sup>118</sup>. For males or females with a positive viral RT-PCR test result for ZIKV, treatment of infertility should be deferred until a subsequent re-test is negative in both the male and female partner and >6 months have passed from the time of the last positive result. For men and women who have not been specifically tested for ZIKV or with a negative ZIKV RT-PCR test, gamete or embryo cryopreservation should be considered and quarantined until a subsequent RT-PCR re-test is negative in both the male and female partner and >8 weeks have passed from the time

## REVIEWS

of gamete collection. For men not previously infected with ZIKV who are planning to travel to an area of active virus transmission, semen cryopreservation should be considered before travel, and testing for viral RNA by RT-PCR at the time of semen collection and within 1 week after return is recommended.

The CDC and WHO recommended serological testing of any pregnant woman who might have been exposed to ZIKV within the past 3 months through travel, place of residence, and/or sexual contact without protection but did not recommend testing for asymptomatic couples interested in attempting natural conception in which one or both partners had possible exposure to ZIKV<sup>56</sup>.

### Reducing ZIKV transmission during ART

Considering that carriers of ZIKV infection can be asymptomatic and that urogenital tissues can be infected by the virus, further studies of ZIKV transmission via different reproductive sites are required, and validated tests for viral disease positivity and infectivity in semen must be developed. Additionally, new laboratory protocols are needed to reduce the risk of ZIKV transmission during the different stages of ART. More specifically, just as strict guidelines have been set regarding the screening and handling of HIV, hepatitis C virus, and human tissues positive for hepatitis B virus, similar recommendations are needed to prevent contamination and inadvertent transmission within the ART laboratory<sup>19</sup>. Furthermore, although ZIKV is a relatively short-lived virus, the potentially devastating consequences of transmission to pregnant women<sup>19</sup> have led the FDA to require the deferral of donations of blood, tissue, oocyte, and sperm from anyone who has been infected or had the potential to be infected by ZIKV in the previous 6 months<sup>20</sup>. However, these guidelines were not set until 1 March 2016, raising the possibility that contaminated materials might already be present in ART laboratories<sup>19</sup>. Thus, samples stored in semen and gamete banks should also be tested for ZIKV.

### Conclusions

On the basis of many studies that confirm the sexual transmission of ZIKV, particular care is required to manage men who want to conceive after an episode of ZIKV infection, owing to the possibility of virus transmission

between partners and, in particular, the possibility of damage to the fetus, contributing to microcephaly and other sequelae. The need to prevent ZIKV transmission in fertility clinics is an additional concern. ZIKV can be present even in semen from asymptomatic donors, and thus methods to detect the virus and prevent the potential detrimental effects of ZIKV on individuals and offspring must be considered. A ZIKV vaccine could be an important way to protect the population from ZIKV infection and could be a step to control the disease. Moreover, vaccination could protect against damage to the male genital tract and consequently might avoid subsequent fertility concerns.

Current evidence indicates that some men who are infected can present with genitourinary symptoms, such as haematospermia, prostatitis, painful ejaculation, penile discharge, and oligospermia, but little is known about the real effect of ZIKV on fertility. Most of the currently available information about ZIKV infection that was able to replicate and produce infectious viruses. Additionally, primary human Sertoli cells, but not Leydig cells, were shown to be highly susceptible to ZIKV infection. These discoveries indicate that ZIKV infection can impair sperm parameters and function, at least in some men who have been infected. However, the actual proportion of men who are infected who might develop these changes and whether these changes are temporary or permanent are not yet known. As the 2016 outbreak of ZIKV was only a few years ago and scientists continue to monitor men affected by the virus, new studies are necessary to expand our limited knowledge of ZIKV infection in the male genital tract and determine the long-term effects of this pathogen on male fertility.

Published online: 29 January 2019

- Petersen, L. R., Jamieson, D. J., Powers, A. M., & Honein, M. A. Zika virus. *N. Engl. J. Med.* **374**, 1552–1563 (2016).
- Dick, G., Kitchen, S., & Haddock, A. Zika virus (J). *Isolations and serological specificity. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **46**, 509–520 (1952).
- Armstrong, P. et al. Zika virus response epidemiology and laboratory team. Travel-associated Zika virus disease cases among US residents—United States, January 2015–February 2016. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **65**, 286–289 (2016).
- Bachiller-Luque, P. et al. First case of imported Zika virus infection in Spain. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **34**, 243–246 (2016).
- Li, J. et al. Zika virus in a traveler returning to China from Caracas, Venezuela, February 2016. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 1133–1136 (2016).
- Perkasa, A. et al. Isolation of Zika virus from febrile patient. *Indonesia. Emerg. Infect. Dis.* **22**, 924–925 (2016).
- Thomas, D. L. Local transmission of Zika virus—Puerto Rico, November 23, 2015–January 28, 2016. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **65**, 154–158 (2016).
- World Health Organization. Emergencies - Zika virus situation reports. WHO <http://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/en/> (2018).
- World Health Organization. Zika virus (ZIKV) classification table data as of 20 June 2017. WHO <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255767/1/zika-classification-20June17-eng.pdf?ua=1> (2017).
- Zammarchi, L. et al. Zika virus infections imported to Italy: clinical, immunological and virological findings, and public health implications. *J. Clin. Virol.* **63**, 52–55 (2015).
- Cao-Lormeau, V. M. et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet* **387**, 1531–1539 (2016).
- Kuno, G., Chang, G. J. J., Tsuchiya, K. R., Karabatsos, N., & Cropp, C. B. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J. Virol.* **72**, 73–83 (1998).
- Chan, J. F., Choi, G. K., Yip, C. C., Cheng, V. C., & Yuen, K. Y. Zika fever and congenital Zika syndrome: an unexpected emerging arboviral disease. *J. Infect.* **72**, 507–524 (2016).
- Cugola, F. R. et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature* **534**, 267–271 (2016).
- Mlakar, J. et al. Zika virus associated with microcephaly. *N. Engl. J. Med.* **374**, 951–958 (2016).
- Duffy, M. R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, federated states of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* **360**, 2536–2543 (2009).
- Kraemer, M. U. et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *A. albopictus*. *eLife* **4**, 1–18 (2015).
- Gardner, L. M., Chen, N., & Sarkar, S. Global risk of Zika virus depends critically on vector status of *Aedes albopictus*. *Lancet Infect. Dis.* **16**, 522–523 (2016).
- McCarthy, M. Vectors for Zika virus may spread further than was previously thought, CDC reports. *BMJ* **353**, 1 (2016).



20. Centers for Disease Control and Prevention. Guidance for U.S. laboratories testing for Zika virus infection. CDC <https://www.cdc.gov/zika/laboratories/lab-guidance.html> [updated July 24 2017].
21. Arsuaga, M., Bujalance, S. G., Diaz-Mendez, M., Vázquez, A. & Arribas, J. R. Probable sexual transmission of Zika virus from a vasectomised man. *Lancet Infect. Dis.* **16**, 1107 (2016).
22. Davidson, A. Suspected female-to-male sexual transmission of Zika virus—New York City, 2016. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **65**, 716–717 (2016).
23. Deckard, D. T. Male-to-male sexual transmission of Zika virus—Texas, January 2016. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **65**, 372–374 (2016).
24. D'Ortenzio, E. et al. Evidence of sexual transmission of Zika virus. *N. Engl. J. Med.* **374**, 2195–2198 (2016).
25. Foy, B. D. et al. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, CO, USA. *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 880–882 (2011).
26. Hills, S. L. Transmission of Zika virus through sexual contact with travelers to areas of ongoing transmission—continental United States, 2016. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **65**, 215–216 (2016).
27. Brooks, R. B. Likely sexual transmission of Zika virus from a man with no symptoms of infection—Maryland, 2016. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **65**, 915–916 (2016).
28. Fréour, T. et al. Sexual transmission of Zika virus in an entirely asymptomatic couple returning from a Zika epidemic area, France, April 2016. *Euro. Surveill.* **21**, 30254 (2016).
29. Turnel, J. M. et al. Late sexual transmission of Zika virus related to persistence in the semen. *Lancet* **387**, 2501 (2016).
30. Venturi, G. et al. An autochthonous case of Zika due to possible sexual transmission, Florence, Italy, 2014. *Euro. Surveill.* **21**, 30148 (2016).
31. Frank, C. et al. Sexual transmission of Zika virus in Germany, April 2016. *Euro. Surveill.* **21**, 30252 (2016).
32. Russell, K. et al. Male-to-female sexual transmission of Zika virus—United States, January–April 2016. *Clin. Infect. Dis.* **64**, 211–213 (2016).
33. Barzon, L. et al. Virus and antibody dynamics in travelers with acute Zika virus infection. *Clin. Infect. Dis.* **66**, 1173–1180 (2017).
34. Musso, D. et al. Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 359–361 (2015).
35. Nicastrì, E. et al. Persistent detection of Zika virus RNA in semen for six months after symptom onset in a traveller returning from Haiti to Italy, February 2016. *Euro. Surveill.* **21**, 30314 (2016).
36. Reusken, C. et al. Longitudinal follow-up of Zika virus RNA in semen of a traveller returning from Barbados to the Netherlands with Zika virus disease, March 2016. *Euro. Surveill.* **21**, 30251 (2016).
37. Mansuy, J. M. et al. Zika virus: high infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen. *Lancet Infect. Dis.* **16**, 405 (2016).
38. Paz-Bailey, G. et al. Persistence of Zika virus in body fluids—preliminary report. *N. Engl. J. Med.* **379**, 1234–1243 (2017).
39. Mansuy, J. M. et al. Zika virus in semen and spermatozoa. *Lancet Infect. Dis.* **16**, 1106–1107 (2016).
40. Barzon, L. et al. Infection dynamics in a traveller with persistent shedding of Zika virus RNA in semen for six months after returning from Haiti to Italy, January 2016. *Euro. Surveill.* **21**, 30316 (2016).
41. Atkinson, B. et al. Detection of Zika virus in semen. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 940 (2016).
42. Harrower, J. et al. Sexual transmission of Zika virus and persistence in semen, New Zealand, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 1855–1857 (2016).
43. Mansuy, J. M. et al. Zika virus in semen of a patient returning from a non-epidemic area. *Lancet Infect. Dis.* **16**, 894–895 (2016).
44. García-Bujalance, S. et al. Persistence and infectivity of Zika virus in semen after returning from endemic areas: report of 5 cases. *J. Clin. Virol.* **96**, 110–115 (2017).
45. Huits, R. et al. Kinetics of Zika virus persistence in semen. *Bull. World Health Organ.* **6**, 1–12 (2016).
46. Souto, I. O. et al. Persistence of Zika virus in semen 93 days after the onset of symptoms. *Enferm. Infect. Microbiol. Clin.* **36**, 21–23 (2016).
47. Huits, R. et al. Zika virus in semen: a prospective cohort study of symptomatic travellers returning to Belgium. *Bull. World Health Organ.* **95**, 802–809 (2017).
48. Froeschl, G. et al. Long-term kinetics of Zika virus RNA and antibodies in body fluids of a vasectomized traveller returning from Martinique: a case report. *BMC Infect. Dis.* **17**, 55 (2017).
49. Atkinson, B. et al. Complete genome sequence of Zika virus isolated from semen. *Genome Announc.* **4**, e011116–16 (2016).
50. Sánchez-Montalvo, A. et al. Zika virus dynamics in body fluids and risk of sexual transmission in a non-endemic area. *Trop. Med. Int. Health* **23**, 92–100 (2018).
51. Torres, J. R., Martínez, N. & Moros, Z. Microhematospermia in acute Zika virus infection. *Int. J. Infect. Dis.* **51**, 127 (2016).
52. Joguet, G. et al. Effect of acute Zika virus infection on sperm and virus clearance in body fluids: a prospective observational study. *Lancet Infect. Dis.* **17**, 1200–1208 (2017).
53. Biava, M. et al. Persistence of ZIKV-RNA in the cellular fraction of semen is accompanied by a surrogate-marker of viral replication. Diagnostic implications for sexual transmission. *New Microbiol.* **40**, 50–53 (2017).
54. 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. *Emerg. Infect. Dis.* **23**, 137–139 (2017).
55. Mead, P. S. et al. Zika virus shedding in semen of symptomatic infected men. *N. Engl. J. Med.* **378**, 1377–1385 (2018).
56. Epelboin, S. et al. Zika virus and reproduction: facts, questions and current management. *Hum. Reprod. Update* **23**, 629–645 (2017).
57. Rasmussen, S. A., Jamieson, D. J., Honein, M. A. & Petersen, L. R. Zika virus and birth defects—reviewing the evidence for causality. *N. Engl. J. Med.* **374**, 1981–1987 (2016).
58. Dos Santos, T. et al. Zika virus and the Guillain-Barré syndrome—case series from seven countries. *N. Engl. J. Med.* **375**, 1599–1601 (2016).
59. Aubry, M. et al. Zika virus seroprevalence, French Polynesia, 2014–2015. *Emerg. Infect. Dis.* **23**, 669–672 (2017).
60. Chakhtoura, N., Hazra, R. & Spong, C. Y. Zika virus: a public health perspective. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* **30**, 116–122 (2018).
61. Stefanovic, K. B., Gregg, P. C. & Soung, M. Evaluation and treatment of hematospermia. *Am. Fam. Physician* **80**, 1421–1427 (2009).
62. Atkinson, B. et al. Presence and persistence of Zika virus RNA in semen, United Kingdom, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* **23**, 611–615 (2017).
63. Bagasa, O. et al. Cellular targets and receptor of sexual transmission of Zika virus. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **25**, 679–686 (2017).
64. Lemke, G. Biology of the TAM receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, 1–17 (2013).
65. Breton, S. & Stewart, D. T. Atypical mitochondrial inheritance patterns in eukaryotes. *Genome* **58**, 423–431 (2015).
66. Bagasa, O. et al. Detection of HIV-1 proviral DNA in sperm from HIV-1-infected men. *AIDS* **8**, 1669–1674 (1994).
67. Shimajima, M. et al. Tyro3 family-mediated cell entry of Ebola and Marburg viruses. *J. Virol.* **80**, 10109–10116 (2006).
68. Shimajima, M., Ikeda, Y. & Kawakawa, Y. The mechanism of Axl-mediated Ebola virus infection. *J. Infect. Dis.* **196**, S259–S263 (2007).
69. Meertens, L. et al. The TIM and TAM families of phosphatidylinositol receptors mediate dengue virus entry. *Cell Host Microbe* **12**, 544–557 (2012).
70. Charrel, R. N. et al. Background review for diagnostic test development for Zika virus infection. *Bull. World Health Organ.* **94**, 574–584 (2016).
71. World Health Organization. WHO Director-General summarizes the outcome of the Emergency Committee regarding clusters of microcephaly and Guillain-Barré syndrome. *WHO* <http://www.who.int/en/news-room/detail/01-02-2016-who-director-general-summarizes-the-outcome-of-the-emergency-committee-regarding-clusters-of-microcephaly-and-guillain-barr%C3%A9-syndrome> (2016).
72. Li, R. et al. Zika virus infections, a review. *Radiol. Infect. Dis.* **4**, 88–95 (2017).
73. da Cruz, T. E. et al. Prolonged detection of Zika Virus RNA in vaginal and endocervical samples from a Brazilian woman, 2018. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0623> (2018).
74. Morrison, T. E. & Diamond, M. S. Animal models of Zika virus infection, pathogenesis, and immunity. *J. Virol.* **91**, e00009–17 (2017).
75. Osuna, C. E. et al. Zika viral dynamics and shedding in rhesus and cynomolgus macaques. *Nat. Med.* **22**, 1448–1455 (2016).
76. Koide, F. et al. Development of a Zika virus infection model in cynomolgus macaques. *Front. Microbiol.* **7**, 2028 (2016).
77. Hirsch, A. J. et al. Zika Virus infection of rhesus macaques leads to viral persistence in multiple tissues. *PLoS Pathog.* **13**, e1006219 (2017).
78. Dudley, D. M. et al. A rhesus macaque model of Asian-lineage Zika virus infection. *Nat. Commun.* **7**, 12204 (2016).
79. Spearman, P. Current progress in the development of HIV vaccines. *Curr. Pharm. Des.* **12**, 1147–1167 (2006).
80. Antony, J. M. & MacDonald, K. S. A critical analysis of the cynomolgus macaque, *Macaca fascicularis*, as a model to test HIV-1/SIV vaccine efficacy. *Vaccine* **33**, 3073–3083 (2015).
81. Andrade, M. C. R. et al. Biologic data of *Macaca mulatta*, *Macaca fascicularis*, and *Saimiri sciureus* used for research at the flocruz primate center. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **99**, 584–589 (2004).
82. Govero, J. et al. Zika virus infection damages the testes in mice. *Nature* **540**, 439–442 (2016).
83. Ma, W. et al. Zika virus causes testis damage and leads to male infertility in mice. *Cell* **167**, 1511–1524 (2016).
84. Winkler, C. W. et al. Adaptive immune responses to Zika virus are important for controlling virus infection and preventing infection in brain and testes. *J. Immunol.* **198**, 3526–3535 (2017).
85. Uraki, R. et al. Zika virus causes testicular atrophy. *Sci. Adv.* **3**, e1602899 (2017).
86. Sheng, Z. Y. et al. Sertoli cells are susceptible to ZIKV infection in mouse testis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 272 (2017).
87. Uraki, R. et al. Fetal growth restriction caused by sexual transmission of Zika virus in mice. *J. Infect. Dis.* **215**, 1720–1724 (2017).
88. Kawiecki, A. B. et al. Tissue tropisms, infection kinetics, histologic lesions, and antibody response of the MR766 strain of Zika virus in a murine model. *Virol. J.* **14**, 82 (2017).
89. Duggal, N. K. et al. Frequent Zika virus sexual transmission and prolonged viral RNA shedding in an immunodeficient mouse model. *Cell Rep.* **18**, 1751–1760 (2017).
90. Chan, J. F. W. et al. Zika virus infection in dexamethasone-immunosuppressed mice demonstrating disseminated infection with multi-organ involvement including orchitis effectively treated by recombinant type I interferons. *EBioMedicine* **14**, 112–122 (2016).
91. Siddharthan, V. et al. Zika virus infection of adult and fetal STAT2 knock-out hamsters. *Virology* **507**, 89–95 (2017).
92. Grant, A. et al. Zika virus targets human STAT2 to inhibit type I interferon signaling. *Cell Host Microbe* **19**, 882–890 (2016).
93. Lazear, H. M. et al. A mouse model of Zika virus pathogenesis. *Cell Host Microbe* **19**, 720–730 (2016).
94. Griffin, B. D. et al. DNA vaccination protects mice against Zika virus-induced damage to the testes. *Nat. Commun.* **8**, 15743 (2017).
95. Xu, K. et al. Recombinant chimpanzee adenovirus vaccine AdC7-M/E protects against Zika virus infection and testis damage. *J. Virol.* **92**, e01722–17 (2018).
96. Tang, H. et al. Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. *Cell Stem Cell* **18**, 587–590 (2016).
97. Zmurko, J. et al. The viral polymerase inhibitor 7-deaza-2'-C-methyladenosine is a potent inhibitor of in vitro Zika virus replication and delays disease progression in a robust mouse infection model. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0004695 (2016).
98. Chen, J. et al. Zika virus infects renal proximal tubular epithelial cells with prolonged persistency and cytopathic effects. *Emerg. Microbes Infect.* **6**, e77 (2017).
99. Jang, H. C. et al. First imported case of Zika virus infection into Korea. *J. Kor. Med. Sci.* **31**, 1173–1177 (2016).
100. Percivalle, E., Zavattoni, M., Fausto, F. & Rovida, F. Zika virus isolation from semen. *New Microbiol.* **40**, 197–198 (2017).
101. Matheron, S. et al. Long-lasting persistence of Zika virus in semen. *Clin. Infect. Dis.* **63**, 1264–1264 (2016).
102. Spencer, J. L. et al. Replication of Zika virus in human prostate cells: a potential source of sexually transmitted virus. *J. Infect. Dis.* **217**, 538–547 (2018).

## REVIEWS

103. Kim, W. et al. RUNX1 is essential for mesenchymal stem cell proliferation and myofibroblast differentiation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, 16389–16394 (2014).
104. Kumar, A. et al. Human Sertoli cells support high levels of Zika virus replication and persistence. *Sci. Rep.* **8**, 5477 (2018).
105. Takashima, S. et al. Functional differences between GDNF-dependent and FGF2-dependent mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Stem Cell Rep.* **4**, 489–502 (2015).
106. Dym, M. & Fawcett, D. W. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol. Reprod.* **3**, 308–326 (1970).
107. Dym, M. The fine structure of the monkey (Macaca) Sertoli cell and its role in maintaining the blood-testis barrier. *Anat. Rec.* **175**, 639–656 (1973).
108. Kaur, G., Thompson, L. A. & Dufour, J. M. Sertoli cells - Immunological sentinels of spermatogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **30**, 36–44 (2014).
109. Sharpe, R. M., McKinnell, C., Kvilvin, C. & Fisher, J. S. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* **125**, 769–784 (2003).
110. Chui, K. et al. Characterization and functionality of proliferative human Sertoli cells. *Cell Transplant.* **20**, 619–635 (2011).
111. Amann, R. P. The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? *J. Androl.* **29**, 469–487 (2008).
112. World Health Organization. *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen* (WHO, 2010).
113. Robert, M. & Gagnon, C. Sperm motility inhibitor from human seminal plasma: association with semen coagulum. *Hum. Reprod.* **10**, 2192–2197 (1995).
114. Comhaire, F. H., Vermeulen, L. & Pieters, O. Study of the accuracy of physical and biochemical markers in semen to detect infectious dysfunction of the accessory sex glands. *J. Androl.* **10**, 50–53 (1989).
115. Cordeiro, C. N., Bano, R., Cross, C. I. W. & Segars, J. H. Zika virus and assisted reproduction. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* **29**, 175–179 (2017).
116. Lee, W. T. et al. Development of Zika virus serologic testing strategies in New York state. *J. Clin. Microbiol.* **56**, e01591–17 (2017).
117. Musso, D. et al. Detection of Zika virus RNA in semen of asymptomatic blood donors. *Clin. Microbiol. Infect.* **23**, e1001–e1003 (2017).
118. American Society for Reproductive Medicine. Guidance for providers caring for women and men of reproductive age with possible Zika virus exposure. *csrm* [https://www.asrm.org/globalassets/asrm/asrm-content/news-and-publications/practice-guidelines/non-members/guidance\\_for\\_providers\\_zika\\_virus\\_exposure.pdf](https://www.asrm.org/globalassets/asrm/asrm-content/news-and-publications/practice-guidelines/non-members/guidance_for_providers_zika_virus_exposure.pdf) (2018).
119. Washington, C. I. et al. Keeping the Zika virus out of the assisted reproductive technology laboratory. *Semin. Reprod. Med.* **34**, 293–298 (2016).
120. Food and Drug Administration. Donor screening recommendations to reduce the risk of transmission of Zika virus by human cells, tissues, and cellular and tissue-based products. *FDA* <https://www.fda.gov/downloads/biologicsbloodvaccines/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/tissue/ucm488582.pdf> (2016).

**Acknowledgements**

This work was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES), Brazilian Government.

**Author contributions**

F.A.K., C.S.S.M., G.M.Z.F.D., E.D., A.R.B.A.C., T.T.S. and M.E.L.C. wrote the manuscript. All authors researched data for the article, took part in discussions of content and wrote and edited the article before submission.

**Competing interests**

The authors declare no competing interests.

**Publisher's note**

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Review criteria**

The authors performed an extensive PubMed, MEDLINE, Web of Science and Scopus Scholar search for full-text papers and abstracts published in English, with no restrictions regarding to the initial date of publication up to April 2018. Search terms used were 'Zika virus' and 'Zika virus infection' plus 'male infertility', 'fertility', 'infertility', 'semen', 'spermatozoa', 'testis', 'epididymis', 'seminal vesicles', 'prostate', 'seminiferous tubules', 'orchitis', 'prostatitis', 'urethritis', 'vasectomy', 'Sertoli cells', 'spermatogonia', 'Leydig cells', 'spermatogenesis', 'haematospermia', 'oligo-spermia', 'azoospermia', 'sperm motility', 'semen analysis' and 'cell culture techniques'. In addition, the reference lists of the selected papers were searched for additional relevant publications. Epidemiology bulletins from the US Centers for Disease Control and Prevention (CDC) were also included.

## **2. EXPERIMENTAÇÃO CIENTÍFICA**

### **2.1 Objetivos:**

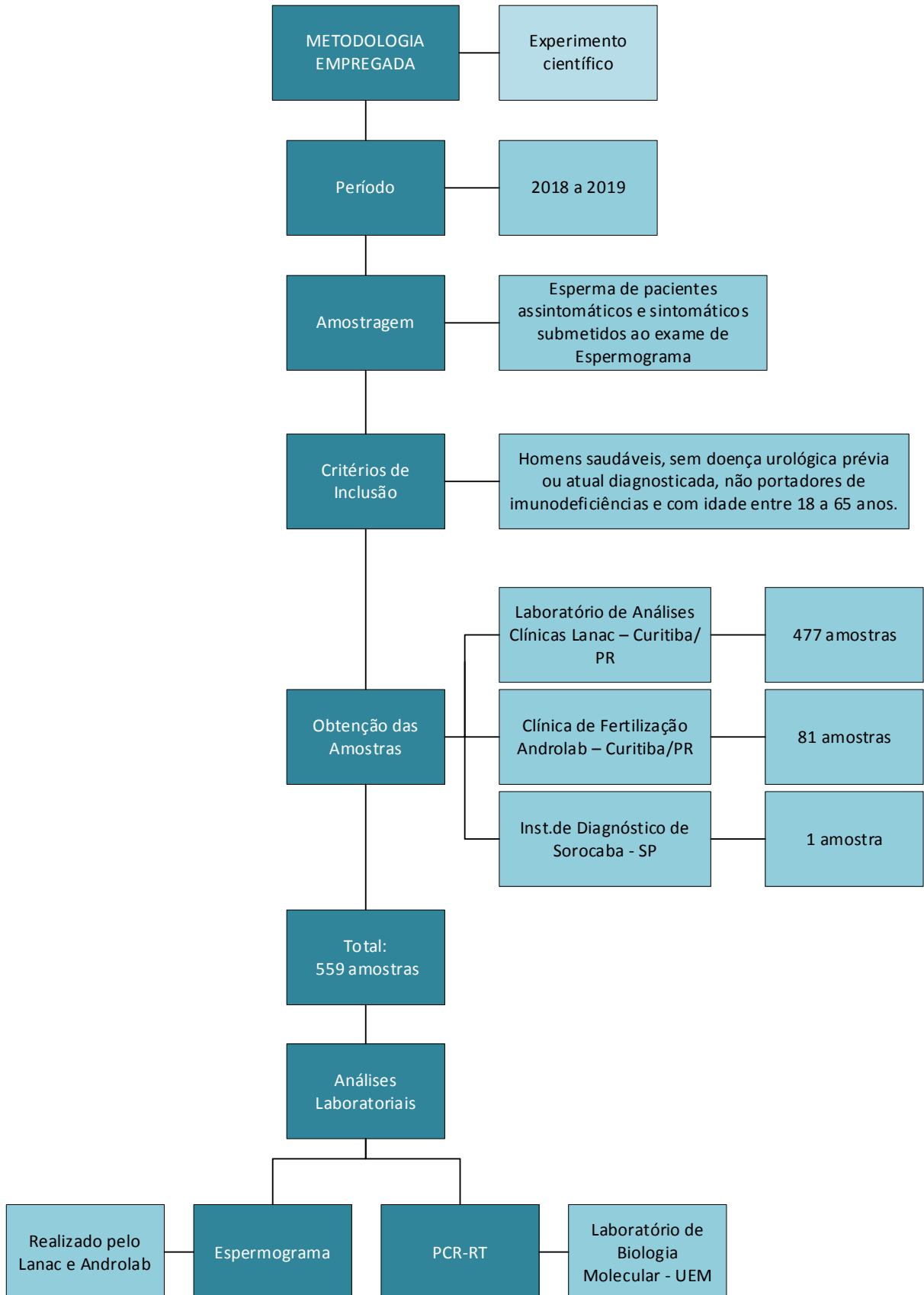
O objetivo geral da parte de experimentação científica foi estudar a história natural do vírus Zika (ZIKV) em sêmen de homens sintomáticos e assintomáticos bem como avaliar a sua influência na saúde reprodutiva masculina.

Para cumprir este objetivo geral, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar a presença do ZIKV em sêmen de homens assintomáticos submetidos ao exame de espermograma, por meio de reação em cadeia da polimerase em tempo real (rRT-PCR), em Curitiba/PR;
- Determinar a prevalência, carga viral e duração da infecção pelo ZIKV em sêmen e sangue de homens sintomáticos, por rRT-PCR
- Acompanhar periodicamente a carga viral do ZIKV no sêmen e sangue dos homens positivos até sua negatificação;
- Avaliar os parâmetros de fertilidade masculina periodicamente através da análise do sêmen (espermograma), nas mesmas amostras submetidas ao rRT-PCR;
- Avaliar a correlação entre a carga viral e o tempo de duração da infecção no sêmen com os parâmetros avaliados no espermograma, para desta forma verificar a influência do ZIKV na saúde reprodutiva masculina;

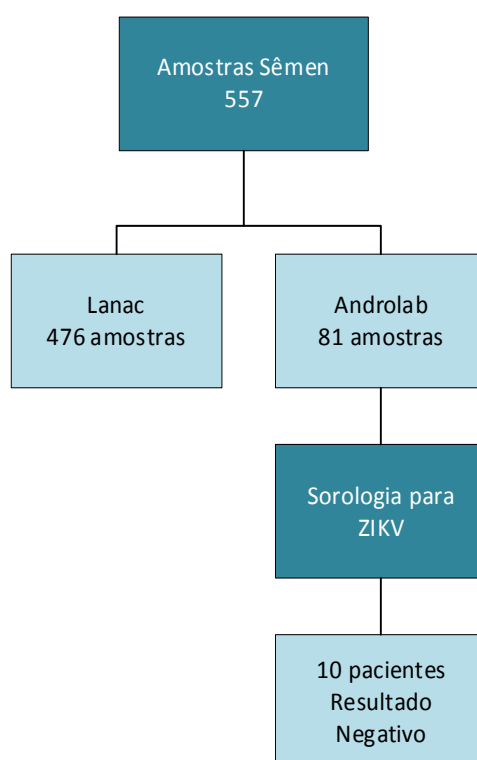
### **2.2. Metodologia:**

A metodologia utilizada está sintetizada no esquema a seguir:



Mais detalhadamente, foram convidados para participar do estudo pacientes que iriam se submeter ao exame de espermograma no Laboratório de Análises Clínicas Lanac e Laboratório de Fertilidade Androlab, ambos situados em Curitiba/PR. Os critérios de inclusão foram: homens saudáveis (sem doença urológica prévia ou atual diagnosticada), assintomáticos para ZIKV e não portadores de imunodeficiências, com idade entre 18 a 65 anos.

Foram coletadas 557 amostras de sêmen, sendo 476 do Laboratório Lanac e 81 do Androlab. Não foram realizados exames sorológicos para ZIKV nestes pacientes, exceto, em 10 do Androlab, os quais foram todos negativos para IgM e IgG para ZIKV.



Adicionalmente, foi realizada uma busca ativa de pacientes que foram notificados como positivos para ZIKV na Secretaria de Saúde Municipal de São José dos Pinhais/PR e de Sorocaba/SP, sendo sintomáticos e comprovadamente positivos para ZIKV. Foram no total de dois pacientes, convidados a comparecer no Laboratório Lanac de Curitiba/PR (um paciente) e Instituto de Diagnóstico de Sorocaba/SP (um paciente) para coleta de sêmen e realização do espermograma.

### 2.2.1. Coleta das amostras de sêmen:

Todas as amostras de sêmen foram coletadas pelos próprios pacientes por masturbação, e realizado o espermograma conforme preconizado pela *World Health Organization*, 2010

(OMS), sendo avaliado por este exame os parâmetros de fertilidade de cada paciente. Os pacientes foram previamente informados sobre a execução da pesquisa e adesão, sendo que a mesma só foi concretizada após a assinatura do termo de consentimento, bem como responder a um questionário previamente à coleta do material. Este projeto foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética e Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UEM (COPEP) (CAAE 56724716.4.0000.0104/2016).

<b>QUESTIONÁRIO ESPERMOGRAMA</b>	
<b>Paciente:</b>	
1. Tempo de abstinência sexual _____	dias.
2. Motivo da realização do espermograma: [ ] Controle pós-vasectomia [ ] infertilidade [ ] Outros: _____	
3. Idade: _____	Estado Civil: _____ Tempo de Casado: _____
4. Tem filhos, quantos: _____	
5. Medicação atual: _____ [ ] uso contínuo	
6. Cirurgias anteriores, data: [ ] varicocele _____ [ ] outros _____	
7. Teve febre acima de 38° C nos últimos 90 dias: [ ] Sim [ ] Não	
8. Já teve ou tem: [ ] caxumba, [ ] varicocele, [ ] orquite (inflamação testículos), [ ] DST, [ ] Hérnia, [ ] Diabetes, [ ] Hipertensão, [ ] infecção urinária, [ ] Atual corrimento, ardência, coceira.	
_____, _____ de 20__	
Declaro que as informações acima são verdadeiras.	
_____ Paciente	

Além do espermograma, toda amostra de sêmen foi submetida a Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR) multiplex para os arbovírus ZIKV, DENV e CHIKV, onde casos positivos para ZIKV seriam acompanhados com novas análises a cada 20 dias para verificação da carga viral e espermograma, até negativar. O total de amostras de sêmen coletadas, entre pacientes assintomáticos e sintomáticos foi de 559.

Para detecção do ZIKV através da técnica do qRT-PCR, foi utilizado 300 µL de sêmen, transferido para um tubo com 1,0 mL de solução salina 0,9% estéril, imediatamente após a coleta e armazenados à -20°C até o momento da extração do RNA.

### 2.2.2. Extração de RNA:

Os ácidos nucleicos totais foram extraídos através do Kit DNA/RNA Invitrogen (ThermoFisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. Para o controle do processo de extração, o controle interno foi preparado e adicionado às amostras durante a extração. Foi utilizado controle de amostra humana (HSC), material não infeccioso de células humanas e controle positivo para o conjunto de iniciadores e sonda de RNase P (RP) que é extraído simultaneamente com as amostras de teste e incluído como amostra durante o preparo do qRT-PCR. O HSC deve gerar resultados negativos com conjuntos de iniciador e sonda para ZIKV, mas resultados positivos para RP. O HSC é um componente do conjunto de controle positivo para ensaio qRT-PCR para ZIKV.

### 2.2.3. Detecção do RNA do ZIKV pela técnica de qRT-PCR:

Para a detecção do ZIKV foi utilizado o kit multiplex ZIKA, Dengue e Chikungunya (X GEN, Mobius).

<b>Especificidade ZIKV</b>	100% para o Vírus Zika
<b>Especificidade DENV</b>	100% para o Vírus da dengue
<b>Especificidade CHIKV</b>	100% para o Vírus Chikungunya
<b>Sensibilidade (LOD) ZIKV</b>	10 <sup>4</sup> cópias/mL com probabilidade de 100%
<b>Sensibilidade (LOD) DENV</b>	10 <sup>3</sup> cópias/mL com probabilidade de 100%
<b>Sensibilidade (LOD) CHIKV</b>	10 <sup>4</sup> cópias/mL com probabilidade de 100%

Foram utilizados os seguintes controles na amplificação: vírus Zika inativado (controle positivo); RNase P humano (controle de qualidade das amostras e indicador de que o ácido nucleico resultou do processo de extração); Controle negativo (será adicionado água no lugar da amostra; é um controle de contaminação ou funcionamento impróprio dos reagentes do ensaio que resultam em falso-positivos).

Após a conclusão da série, os dados foram salvos e analisado seguindo as instruções do fabricante do instrumento. As análises foram realizadas separadamente para cada alvo usando uma configuração de limiar manual. Limiares devem ser ajustados para ficar no início da fase exponencial das curvas de fluorescência e acima de qualquer sinal de fundo. O procedimento escolhido para definir o limiar deve ser utilizado de forma consistente.

Antes que os resultados possam ser determinados para cada amostra clínica, a validade da placa testada será determinada. Para que um ensaio seja válido, os controles devem produzir os resultados esperados:

- Controles de ensaio (ácido nucleico extraído de ZIKV inativos) devem ser positivos e estar dentro do intervalo esperado de valores de CT. Se os controles de ensaio forem negativos a placa será repetida.
- Controle negativo não pode dar amplificação;
- HSC (controle de extração) deve ser positivo com conjunto de iniciador/sonda para RP devido ao DNA humano no HSC e negativo com conjuntos de iniciador/sonda para o vírus. Um resultado positivo com o HSC e iniciador/sondas para vírus indicam a ocorrência de contaminação cruzada. Se for obtido um resultado positivo;
- O ensaio de RP para cada amostra deve ser positivo.

Se todos os controles tiverem sido realizados de forma adequada, a análise de cada alvo será prosseguida:

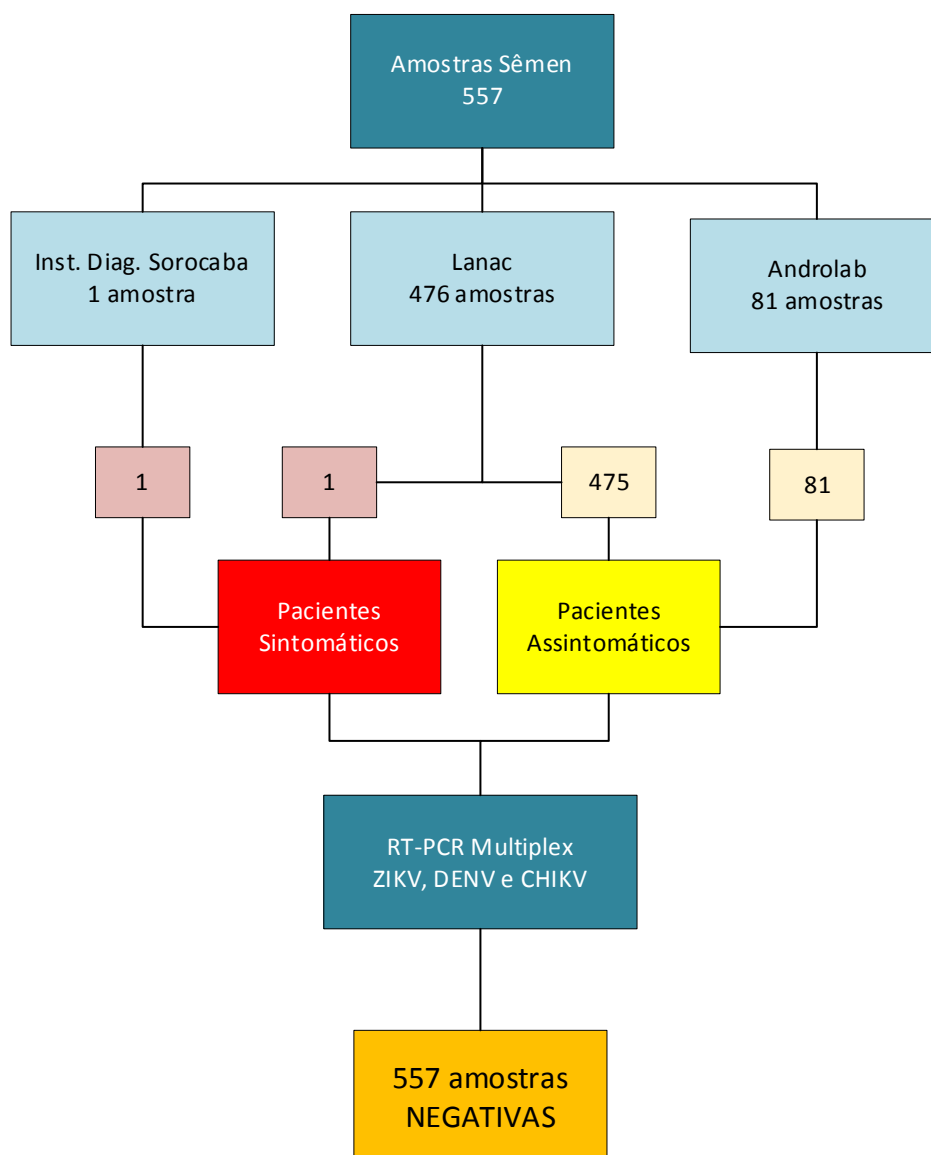
- Verdadeiros positivos devem produzir curvas exponenciais com fases logarítmicas, lineares e estacionárias;
- Fracos positivos devem sempre ser interpretados com cautela. As curvas de fluorescência devem ser observadas associadas a esses resultados. Se as curvas forem verdadeiras curvas exponenciais, a reação deverá ser interpretada como positiva.

O ensaio para a detecção do RNA do vírus alvo foi realizado em duplicata em todas as amostras. As amostras foram consideradas positivas para RNA do ZIKV quando foram detectados valores de threshold inferiores a 40 ciclos em ambas as repetições. As amostras com valores de threshold limiares ou superiores a 40 ciclos, ou com apenas uma repetição positiva foram repetidamente testadas. Amostras negativas que demonstraram presença de inibidores na reação de PCR, no ensaio utilizando o controle endógeno, foram relatadas como indeterminadas.

#### **2.2.4. Resultados obtidos**

A seguir pode ser observado o esquema geral de execução do projeto bem como seus resultados.





### Recursos financeiros para o projeto

Fonte de Recurso: Processo: 440521/2016-5. Chamada MCTIC/FNDCT-CNPq/MEC-CAPES/MS-Decit/Nº14/2016 - Prevenção e combate ao vírus Zika

## CAPÍTULO III

### CONCLUSÕES

As publicações analisadas na revisão sistemática sobre a história natural do ZIKV e sua influência na fertilidade masculina, demonstraram:

1. A confirmação da transmissão sexual do ZIKV e a necessidade de cuidados especiais no planejamento de gravidez, em caso de infecção entre as partes;
2. Foram identificadas associações entre a transmissão sexual do ZIKV e doenças neurológicas em fetos, como microcefalia;
3. O ZIKV pode estar presente no sêmen de homens assintomáticos por um longo período, devendo ser cuidadosamente analisado sua utilização em clínicas de fertilidade;
4. A presença e persistência do ZIKV no trato genital masculino, bem como sua viremia são incertos;
5. Homens infectados pelo ZIKV poderão apresentar sintomas genito-urinários clássicos, como hematospermia microscópica e/ou macroscópica, prostatite, ejaculação dolorosa e oligospermia;
6. Foram observadas alterações nos parâmetros seminais e função espermática em alguns homens infectados pelo ZIKV, sem, no entanto, ter a definição se serão temporárias ou definitivas;
7. Foi observado que além dos testículos a infecção pelo ZIKV pode atingir a próstata, epidídimo e vesícula seminal, demonstrando a importância do estudo da cinética do vírus no trato genital masculino;
8. O desenvolvimento de uma vacina contra o ZIKV poderá ser uma aliada no controle da doença, bem como na proteção de danos no trato genital masculino;

9. Esses achados podem contribuir para políticas de saúde pública em países com e sem a transmissão autóctone do ZIKV. Contudo, investigações posteriores envolvendo grupos maiores de indivíduos com infecção por ZIKV são necessárias para melhor compreensão da transmissão sexual desse vírus.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

- Realizar estudos complementares de forma a melhor compreender os mecanismos que medeiam o impacto celular do ZIKV a longo prazo no trato genital masculino;
- Realizar estudos para determinar a prevalência, carga viral e duração da infecção pelo ZIKV em sêmen, de forma a compreender melhor a cinética do vírus;
- Investigar o ZIKV em bancos de sêmen, principalmente de doadores assintomáticos;
- Realizar estudos para avaliar se a infecção congênita pelo ZIKV pode afetar futuramente a fertilidade da criança;
- Divulgar os resultados obtidos, visando contribuir com a construção de medidas públicas para o entendimento da infecção do ZIKV e seu impacto na fertilidade masculina.

**ANEXO 1**

Normas da Revista *Nature Reviews Urology*

# REVIEWS

## Guidelines for authors of Review articles

Review articles in *Nature Reviews* journals aim to provide accessible, authoritative and balanced overviews of a field or topic. These articles are targeted towards readers from advanced undergraduate level and upwards, including researchers, academics and clinicians, and should be accessible to readers working in any discipline.

### Manuscript elements

#### Title

The title should be a maximum of 90 characters, including spaces. Abbreviations and punctuation should be avoided.

#### Affiliations

Our preference is to minimize the number of addresses per author where possible. Affiliations should be limited to primary addresses or those that must be cited for funding reasons. Additional affiliations and/or funding information can be added to the Acknowledgements section. Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

#### Abstract

The unstructured abstract of up to 200 words should introduce the main themes of the article in a succinct, easily digestible way to engage a broad readership. All information mentioned in the abstract must be addressed in the main article. The abstract should contain minimal specialist details, no references and no display item citations.

#### Introduction

The opening section of the manuscript should provide vital background information and highlight why the topic is of importance. It should also make clear why it is timely to write on this topic. We recommend that you round off this section with a guiding paragraph that states clearly what will be discussed in the article.

#### Main headings

Main headings should be used to break up the text. They should be no longer than 38 characters, including spaces, and should avoid abbreviations.

#### Subheadings

Subheadings should be used to subdivide main sections to help guide non-specialist readers. Up to two levels of subheadings are permitted, with a maximum of 39 and 80 characters, respectively, including spaces.

#### Concluding section

The article should end with a brief summary of the main points of the article, and include a discussion of the implications of the latest work and possible future research directions.

#### References

Approximately 25 references per 1,000 words of article text are recommended; see correspondence from the handling editor for the specific limits for your article. Please keep the reference list as up to date as possible and avoid referring extensively to your own published work. Citations of personal communications should be kept to a minimum and not included in the reference list; written permission from the correspondent must be provided to the handling editor.

Papers in the numbered reference list must have been published or accepted for publication by a named publication. For in-press articles, embargo times must be considered, and an e-mail confirming acceptance from the editors of the original research journal may be required. Meeting abstracts and presentations, or articles deposited in recognized preprint servers, should be avoided but may be included at the editor's discretion.

References should be included as superscript numbers and cited sequentially in the following order: main text, boxes, figures and then tables. The numbered references should be listed at the end of the article in the following format:

1. Author, A. B. Title of the article. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **7**, 101-109 (2003).
2. Author, A. B. & Author, B. C. Title of the article. *Nat. Cell Biol.* **6**, 123-131 (2001).
3. Author, A. B., Author, Z. X. & Author, B. C. Title of the article. *EMBO J.* **25**, 3454-3461 (2006).
4. Author, A. B. in *Title of Book* (ed. Surname, I. N.) 75-98 (Publisher, City, 2000).

If a reference has six or more authors, only the first author should be listed followed by 'et al.'.

Clinical trials should be cited as a reference using the following format:

5. US National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov*, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01939899> (2016).

## REVIEWS

22

General websites can be provided in a 'further information' box, but specific online articles should be cited as a reference using the following format:

6. Author. Title of online article. *Website name*. http address (2015).

The *Nature Reviews* style can be obtained for Endnote (see <http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>).

#### Highlighted references (optional)

Please select key references (5-10% of the total) and provide a single sentence for each, highlighting the significance of the work.

#### Glossary

Glossary terms are one-sentence definitions for specialist terms. The handling editor can provide guidance on the choice of glossary terms.

#### Key points

Please provide a list of 4-6 brief (30 words or fewer) bullet points that highlight the main messages of the Review.

#### Acknowledgements (optional)

You may use this section to thank any funding bodies or acknowledge help with preparing the manuscript.

#### Contributions

Authors are requested to declare their authorship contribution during the submission process. A statement of these contributions will be published in the final article.

#### Review criteria (optional)

You may provide details of how the research for the content of the Review was performed.

#### Online linking

The article text can be linked to a number of online resources where appropriate. Online resources can provide further information on human disease and gene-based information (sequence, expression, protein structure and phenotype) on the human genome and model systems, and can include clinical trial repositories. Please provide links to any particular resources that would increase the usefulness of your article.

#### Supplementary information

Supplementary display items can be included at the editor's discretion if they add substantial value to the article. Please note that videos or images featuring sensitive content cannot be published as Supplementary information. Supplementary items are not edited and supplementary figures are not redrawn by the journal, so authors are asked to ensure that they are accurately, clearly and succinctly presented. Supplementary items must be referred to in the main text, in the format (Supplementary information S1 (box/figure/table)) or (Supplementary video 1). They should be submitted in a single document (with a single reference list) where possible, and appear in the order of citation in the main text. Large spreadsheets and videos can be supplied separately.

#### Display items

Review articles typically contain up to seven display items (Boxes, Figures or Tables) to help explain specific points made in the main text or to explain the background science. These items must be cited in the correct order within the main text in the format (FIG. 1). We prefer to avoid reproducing material from other publications, unless it is exceptionally informative. For further information, please see the Materials from third parties section.

##### Boxes

Boxes should be provided as part of the article document. These display items can be useful for explaining basic concepts or for providing peripheral discussions of interest. Boxes must have a short title, can contain a maximum of 300 words and may include an illustration, a table or equations. Subheadings and bullet points are also permitted. Footnotes may be used sparingly.

##### Figures (see also our [Artwork guide](#))

Figures can include drawn schematics, photographs, histology slides, medical imaging scans and/or graphs. Each figure must be fully labelled, have a short title and have a concise legend that guides the reader through each component of the figure. All abbreviations must be defined in the legend.

Schematics will be redrawn and developed by our in-house team of art editors in consultation with the handling editor after the article has been peer reviewed. Multiple panels (designated a, b, c, and so on) can be included in a single figure. Please bear in mind the following when drafting your figures: be clear in what the

figure is meant to show; avoid unnecessary imagery; have a logical flow of information; use colour consistently; and provide additional reference material if necessary. For chemical structures, please refer to our [Style guide for chemical structures](#) and [download the ChemDraw template](#).

Photographs should be supplied in at least 300 dpi resolution at their final published size. We support the following image formats: JPEG, TIFF, PSD and EPS. Ideally, photographic files will be in CMYK colour format rather than RGB. We will need to obtain consent to use photographs in which individuals can be identified; please discuss this with the handling editor. Sensitive images will be included in the PDF and print versions of the article only (not the HTML version).

##### Tables

Tables should be provided as part of the article document. These display items should be clear and as simple as possible, have a short title, no legend, contain at least three columns of data and preferably fit on one portrait-oriented A4 page. All cells must have an entry, footnotes may be used and definitions of all abbreviations must be provided. For tables with large amounts of graphical content (for example, chemical structures), please provide separate image files.

##### Videos

Videos can be included as supplementary information online. We support the following video formats: MP4, AVI, MOV, MPG, QT, WMV and RV. The maximum file size supported is 2 GB.

## Editorial stages

### Synopsis

Please provide a short synopsis by the agreed deadline. The synopsis should start with a paragraph that sets out the rationale for the article as a whole and include an outline of the sections and subsections that you are planning for the article. Please include a provisional list of display items (Boxes, Figures and/or Tables) and ~15 key references to illustrate the timeliness and/or impact of the article.

### Submission

Articles should be submitted via our web-based manuscript tracking system using the link supplied by the handling editor. The article files should contain the article and any tables or boxes in a single Microsoft Word document; the figures should be provided in a separate single file if possible. When the files have been successfully uploaded and received by the handling editor, you will receive an e-mail acknowledgement.

#### File types

- Please submit the text of your manuscript as a Microsoft Word file (.docx, .doc or .rtf) and not as a PDF.
- We can accept figure files from the following software: Powerpoint, Illustrator (CS or earlier) and Photoshop, and Canvas if saved as EPSF or JPEG.
- Please provide native Chemdraw files (.cdx) for chemical structures.

### Initial editorial assessment

The editor will assess the organization, structure and accessibility of the article and may contact authors to discuss any initial problems before formal peer-review. They might also suggest additional text sections and display items at this stage.

### Peer review and revisions

Articles are peer reviewed by several experts in the field. The handling editor will provide feedback to the corresponding author on how to proceed once all referee reports have been received. A formal rebuttal will be required for articles for which revisions are requested. If the handling editor considers the article to have been adequately revised, it will be accepted-in-principle.

### Detailed edit and revisions

All articles are edited by our in-house editors and figures are redrawn and developed by our in-house art editors. Editing takes into account structure, flow, clarity, language, scientific correctness and consistency, to ensure that the article meets our high publication standards. Authors then review suggested changes and make or discuss revisions with the editor before formal acceptance of the manuscript.

### Copy-editing

All articles are copy-edited before publication. Copy-editing takes into account house style, grammar, spelling, official nomenclature use and final checks for consistency throughout the manuscript.

### Proofing

You will have a chance to review the final text and display items in a typeset proof, which will be e-mailed to the corresponding author as a PDF. Only essential changes (factual correctness, typing errors, serious layout problems) can be made at this stage; you will have two working days to check the proofs.

### Policies

#### Competing interests

In the interests of transparency, any competing interests must be declared both within the text of the article and via our web-based manuscript tracking system (MTS) upon submission. A detailed explanation can be found in the *Nature* journals' policy on competing interests: <http://www.nature.com/authors/policies/competing.html>

Authors can decline to disclose their competing interests if they are bound by confidentiality agreements, but we will publish the fact that they have declined to provide information. At the *Nature Reviews* journals, competing interests may be disclosed to referees and will be published online and/or in print.

#### Copyright

Copyright for all content in *Nature Reviews* journals is assigned to Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature, unless authors are contractually unable to assign copyright, for example if they are government employees, in which case they should grant a Licence to Publish instead. The corresponding author will be provided with a copyright assignment form when the article reaches the accept-in-principle stage, which should be completed and returned to the editorial office as early as possible. If a Licence to Publish form is required, please inform the handling editor.

#### Authorship

All authors are expected to have been involved at least in the research, writing and/or substantial reviewing of the draft manuscript. If the author list changes after initial submission, all co-authors must sign a change of authorship form; please discuss with the handling editor.

#### ORCID for corresponding authors

As part of our efforts to improve transparency in authorship, we request that all corresponding authors on published papers provide their Open Researcher and Contributor Identifier (ORCID), before resubmitting the final version of the manuscript. ORCID helps the scientific community achieve unambiguous attribution of all scholarly contributions.

Corresponding authors should link their ORCID to their account on the MTS. From the MTS home page, click on 'Modify my Springer Nature account' and then on 'ORCID Create/link an Open Researcher Contributor ID (ORCID)'. This will re-direct you to the ORCID website. If you already have an ORCID account, enter your ORCID email and password and click on 'Authorize'. If you do not have an account, you can create one at this stage. Linking ORCID and MTS accounts can be done at any time prior to acceptance. For more information please visit <http://>



## REVIEWS

24

[www.springernature.com/orcid](http://www.springernature.com/orcid). If you experience technical issues please contact the Platform Support Helpdesk at <https://digitalsubmissions.freshdesk.com/support/tickets/new>.

Non-corresponding authors do not have to link their ORCID but are encouraged to do so. Please note that it will not be possible to add/modify ORCID details at the proofing stage.

### Materials from third parties

We prefer to avoid reproducing material (for example, figures, tables, boxes and videos) directly from other publications unless it is exceptionally informative. However, we recognize that to illustrate some concepts the use of published data is required and the reuse of previously published display items might be necessary. If you do not own the item, or wish to reuse items from previously published or copyrighted material, you must declare this; the corresponding author will be provided with a Third Party Rights Table to make these declarations, which should be completed and returned to the editorial office as early as possible. If we are unable to obtain the necessary rights for display items to be reproduced or adapted, we will contact you to discuss the sourcing of alternative material.

### Data sharing

A condition of publication in a *Nature* journal is that authors are required to make materials, data, code and associated protocols promptly available to readers without undue qualifications. Any restrictions on the availability of materials or information must be disclosed to the editors at the time of submission. Any restrictions must also be disclosed in the submitted manuscript. Further details on the *Nature* journals' policy on availability of data, material and methods can be found here: <http://www.nature.com/authors/policies/availability.html>

### Self-archiving

Authors can self-archive the accepted-in-principle version of their *Nature Reviews* article with a release date of six months post-publication. They cannot self-archive the published PDF or HTML versions of their articles, the *Nature Reviews* versions of boxes, figures and tables, or any boxes, figures and tables that were originally published elsewhere for which they do not possess copyright. *Nature Reviews* does not provide a manuscript deposition service for articles.

### Plagiarism

The *Nature Reviews* journals aim to publish articles that provide originality and fresh insight and will not knowingly publish an article containing text copied from previously published work, including the author's own. The *Nature Reviews* journals are part of CrossCheck, an initiative to help editors verify the originality of submitted manuscripts. As part of this process, submitted manuscripts are scanned and compared with the CrossCheck database. For further details on the *Nature* journals' policy on plagiarism, see: <http://www.nature.com/authors/policies/plagiarism.html>

### Patient consent & confidentiality

For all articles including information or clinical photographs that could in any way lead to a patient or patients being identified by the readers, written and signed consent to publish must be obtained from each patient concerned before submission. Informed consent comprises: the patient or guardian granting consent via a *Nature* consent form (or any alternative form, provided it meets our requirements). The image must be removed if authors have not obtained informed consent and/or a human research participant cannot be traced.

### Biosecurity issues

*Nature Reviews* editors might seek advice on any aspect of a submitted paper that raises concerns. These might occasionally include security issues such as the threat posed by bioweapons. Advice might be sought on such issues as part of the refereeing process. As is the case for all publishing decisions, the ultimate decision of whether to publish an article is the responsibility of the Chief Editor of the journal concerned. Further details can be found in the *Nature* journals' policy on biosecurity: <http://www.nature.com/authors/policies/biosecurity.html>.

### Permissions

All material published in *Nature Reviews* journals is protected by copyright law. Permission requests to use figures or images from any *Nature Reviews* title can be granted online through the Rightslink® service. To use this system, click on the Rights & permissions link in the HTML version of the article for which you wish to request a permission.