

Efecto *in vitro* de la interacción entre espermatozoides humanos y los virus Chikungunya y Zika

In Vitro Effect of the Interaction between Human Sperm and Chikungunya and Zika Viruses

Yorjagis A. Méndez Cortina¹ <https://orcid.org/0000-0002-3282-7999>

Vicky Margarita Montaña Mendoza² <https://orcid.org/0000-0001-5271-4206>

Silvio Urcuqui-Inchima¹ <https://orcid.org/0000-0002-2865-3041>

Walter D. Cardona Maya^{2*} <https://orcid.org/0000-0003-0062-6444>

Paula Andrea Velilla¹ <https://orcid.org/0000-0003-0885-1320>

¹Universidad de Antioquia, Facultad de Medicina. Departamento de Microbiología y Parasitología, Grupo de Inmunovirología. Medellín, Colombia.

²Universidad de Antioquia, Facultad de Medicina. Departamento de Microbiología y Parasitología, Grupo de Reproducción. Medellín, Colombia.

*Autor para la correspondencia: wdario.cardona@udea.edu.co

RESUMEN

Introducción: El comportamiento endémico y epidémico de las arbovirosis transmitidas por diferentes especies del género *Aedes*, ha contribuido a la rápida distribución geográfica y diseminación de las enfermedades conocidas como fiebre del Zika y fiebre Chikungunya, ocasionadas por los virus Zika y Chikungunya, respectivamente. Si bien existe evidencia de la transmisión por vía sexual del Zika, y se ha observado la presencia del Chikungunya en semen, no se conocen muy bien los efectos de la interacción de esos dos virus con los espermatozoides.

Objetivo: Determinar los efectos *in vitro* de la interacción de los virus Zika y Chikungunya en los parámetros espermáticos convencionales y funcionales de espermatozoides humanos.

Metodos: Se realizó un estudio experimental en el laboraotrio del Grupo Reproducción, Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia entre julio 2019 y julio 2021.

Espermatozoides de once muestras de semen de individuos sanos fueron incubados con el los virus Zika y Chikungunya durante 3 horas a 37°C, 5 % de CO₂. Para cada muestra se cuantificó la movilidad y la viabilidad espermática por microscopio. Además, se evaluaron: potencial de la membrana mitocondrial espermática, integridad de la membrana espermática, lipoperoxidación de la membrana espermática y producción de especies reactivas de oxígeno intracelulares espermáticas, en respuesta a la incubación con el Zika o Chikungunya por citometría de flujo.

Resultados: La incubación de los espermatozoides con el Zika disminuyó la movilidad y la viabilidad espermática, y afectó negativamente los parámetros funcionales evaluados. En contraste, el Chikungunya incrementó ligeramente la movilidad espermática.

Conclusiones: Los resultados sugieren que el virus del Zika interactúa con los espermatozoides humanos y produce un desbalance entre el estrés oxidativo y su capacidad antioxidante, lo que afecta la movilidad espermática y podría estar implicado en la calidad espermática y el potencial fértil de los hombres infectados.

Palabras clave: semen; espermatozoides; fertilidad; especies reactivas de oxígeno; membrana espermática.

ABSTRACT

Introduction: The endemic and epidemic behavior of the arbovirosis transmitted by different species of the genus *Aedes* has contributed to the rapid geographical distribution and dissemination of the diseases known as Zika fever and Chikungunya fever, caused by the Zika and Chikungunya viruses, respectively. While there is evidence of the sexual transmission of Zika, and the presence of Chikungunya has been observed in semen, the effects of the interaction of these two viruses with the sperm are not known very well.

Objective: to determine the in-vitro effects of the interaction of Zika and Chikungunya viruses in the conventional and functional sperm parameters of human sperm.

Methods: An experimental study was carried out in the Laboratory of the Reproduction Group, Faculty of Medicine, at the University of Antioquia from July 2019 to July 2021. The sperm of eleven samples of semen of healthy individuals were incubated with Zika and Chikungunya viruses for 3 h a 37 ° C, 5 % CO₂. For each sample, mobility and sperm viability by microscope were quantified. In addition, it was evaluated the potential of the sperm mitochondrial membrane, the integrity and lipoperoxidation of the sperm

membrane, and the production of reactive species of sperm intracellular oxygen, in response to the incubation with zika or chikungunya by flow cytometry.

Results: The incubation of the sperm with Zika decreased mobility and sperm viability, and negatively affected the evaluated functional parameters. In contrast, Chikungunya slightly increased sperm mobility.

Conclusions: The results suggest that Zika virus interacts with human sperm and produces an imbalance between oxidative stress and its antioxidant capacity. This affects sperm mobility and could be involved in sperm quality and fertile potential of infected men.

Keywords: semen; sperm; fertility; reactive oxygen species; sperm membrane.

Recibido: 29/09/2020

Aceptado: 08/11/2020

Introducción

Las enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes han promovido un gran interés en salud pública después de los brotes ocurridos en los últimos años en las áreas tropicales y subtropicales, incluidos los causados por el virus Chikungunya (CHIKV) y el virus Zika (ZIKV), dos arbovirus de la familia *Togaviridae* y *Flaviviridae*, respectivamente. El genoma de esos virus está compuesto por un ARN monocatenario de polaridad positiva, que codifica para las proteínas estructurales y no estructurales. El CHIKV y el ZIKV son transmitidos por la picadura de mosquitos hembra infectados del género *Aedes* (*Ae*), principalmente *Ae aegypti* y *Ae albopictus*.^(1,2)

Además de la transmisión por los mosquitos *Ae*, se han confirmado otras rutas importantes de transmisión del ZIKV, incluyendo transfusiones sanguíneas, vía perinatal al feto y vía sexual de hombre a mujer.⁽³⁾ El ARN del ZIKV ha sido aislado de diferentes fluidos humanos, incluido el semen, donde puede persistir por largos períodos de tiempo después de la aparición inicial del cuadro clínico.⁽⁴⁾ Es más, se ha reportado ZIKV infeccioso en semen hasta 69 días después del inicio de los síntomas.⁽⁵⁾ Se ha reportado que la infección por el ZIKV disminuye la concentración y la movilidad espermática,^(6,7) incluso después de la fase aguda de la infección.⁽⁸⁾

Estudios *in vitro* han evidenciado que el ZIKV infecta una amplia gama de células en el tracto reproductivo masculino, que afecta la fertilidad. *Govero* y otros⁽⁹⁾ reportaron una disminución en la concentración y movilidad espermática, asociada a la destrucción de las células germinales y somáticas en los testículos de ratones infectados con una cepa africana del ZIKV.^(9,10) Además, se han observado partículas virales intactas en la membrana y en el interior de los espermatozoides, lo que sugiere que tanto el líquido seminal como los espermatozoides podrían actuar como una vía de transmisión del virus.⁽¹¹⁾

En primates no humanos-babuinos *Papio anubis*-, la infección por el ZIKV produjo alteraciones en la espermatogénesis, al desencadenar la disminución de la concentración espermática posinfección.⁽¹²⁾ Aunque menos frecuente, también se han observado cambios celulares como el incremento de la fragmentación del DNA y anomalías de la pieza intermedia de los espermatozoides en ratones infectados por el ZIKV.⁽¹⁰⁾ Esos resultados sugieren que la infección por el ZIKV tiene efectos adversos en la salud sexual y reproductiva masculina.

A pesar de no existir evidencia sólida sobre la transmisión sexual del CHIKV, *Bandeira* y otros reportaron la presencia de ARN del CHIKV en sangre, orina y semen durante la fase aguda en un paciente adulto coinfectado con virus del dengue 3.⁽¹³⁾ Las muestras de orina y semen dieron positivas para el CHIKV aún después de 30 días de la aparición de los síntomas. Esos resultados permiten postular la posible transmisión del virus por vía sexual y su presencia en el testículo podría asociarse con efectos deletéreos similares a los reportados para el ZIKV. Sin embargo, aún no existen estudios orientados a estudiar la relación entre el CHIKV y los espermatozoides humanos, es por ello que el objetivo del presente estudio fue determinar los efectos *in vitro* de la interacción de los virus CHIKV y ZIKV en los parámetros espermáticos convencionales y funcionales de espermatozoides humanos.

Métodos

Se incluyeron 11 muestras de semen de individuos aparentemente sanos, recolectadas por masturbación en un recipiente estéril, después de un período de abstinencia sexual de 2 a 5 días. El estudio fue aprobado por el comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia en Medellín, Colombia. Cada participante, después de haber

leído el consentimiento informado, y habérsele explicado el objetivo de la investigación y las condiciones de la toma de la muestra, aceptó participar voluntariamente en el estudio.

A cada muestra seminal (n=11) se le cuantificó la movilidad y la viabilidad espermática, de acuerdo con los lineamientos establecidos en el manual para el análisis seminal publicado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2010,⁽¹⁴⁾ antes y después de la incubación con el ZIKV o CHIKV, en un microscopio de luz con objetivo de 40X. Todas las muestras que se incluyeron en el estudio fueron normozoospermicas.

Además, se cuantificó el efecto del ZIKV sobre el potencial de membrana mitocondrial (n=3), la integridad de la membrana (n=3), la lipoperoxidación de la membrana (n=3) y los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares (n=3), y de los espermatozoides humanos.

Incubación directa de los espermatozoides humanos con los virus

Cinco millones de espermatozoides suspendidos en medio HAM-F10 (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) fueron incubados con el ZIKV (linaje asiático), a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,5, 1 y 2. Para el caso del CHIKV (aislado clínico colombiano) se usó una MOI de 1, 5 y 10. En ambos casos la incubación se realizó durante 3 horas a 37°C. La movilidad espermática se determinó al inicio de la incubación (0 h), a los 10 minutos y luego cada hora. Como control se utilizaron espermatozoides no infectados, pero incubados solo con medio HAM-F10 (Fig. 1).

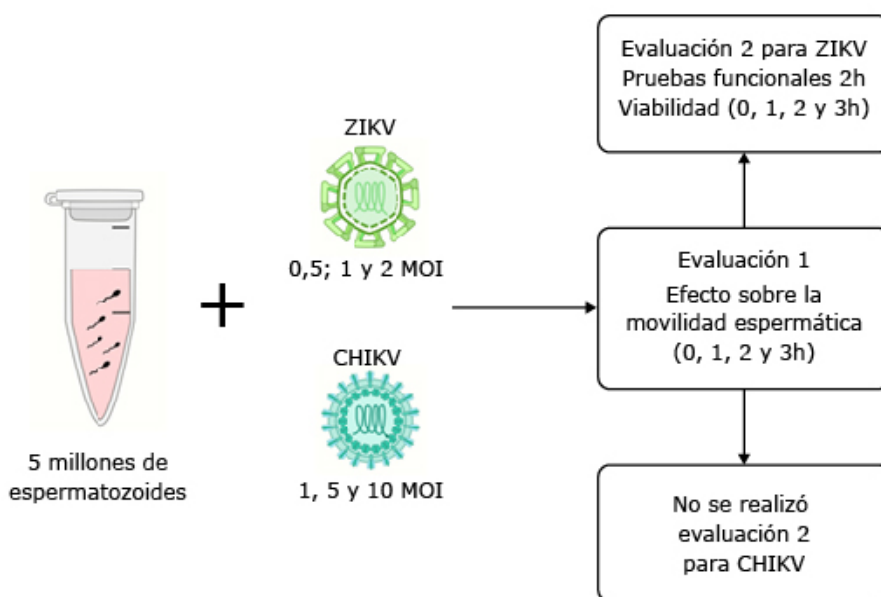


Fig. 1 - Flujograma de la metodología. Efecto de la interacción del ZIKV y CHIKV con los espermatozoides humanos.

Determinación de parámetros seminales convencionales

Después de la incubación de los espermatozoides con el ZIKV o el CHIKV, se realizó la cuantificación de la movilidad y la viabilidad espermática en recuentos por duplicado de al menos 200 espermatozoides al tiempo: 0, 1, 2 y 3 h posincubación (hpin), y se utilizó un microscopio de luz con el objetivo 40X.

La cuantificación inicial de los parámetros seminales es considerada como el tiempo inicial. El tiempo cero son las características espermáticas justo antes de incubarlas con cada virus, mientras que el tiempo inicial (0,1 h, 5 o 6 min) después de incubar los espermatozoides con cada virus, es el tiempo requerido metodológicamente para poder realizar la cuantificación inicial.

La movilidad de los espermatozoides según los lineamientos de la OMS, se clasificó en:

- espermatozoides móviles progresivos,
- espermatozoides móviles no progresivos,
- espermatozoides inmóviles.

La viabilidad de los espermatozoides se determinó con la tinción con eosina Y, y se clasificaron como vivos los espermatozoides que excluyeron el colorante. Los resultados

son expresados como el cambio en el porcentaje de la movilidad, posterior a la normalización, con respecto a la muestra control (% estudio / % control).

Determinación de los parámetros seminales funcionales

La determinación del efecto del virus sobre los parámetros seminales funcionales se realizó después de evidenciar el efecto sobre los parámetros convencionales. Con base en los resultados observados después de la interacción directa con los virus, se seleccionó solo la MOI de 2 y el tiempo de 2 hpin. En todas las muestras se usaron entre 5000 y 10 000 espermatozoides y las lecturas se realizaron en el clitómetro de flujo *LSR Fortessa* (*BD Biosciences, CA, USA*) y se analizaron con el programa *FlowJo* (*Flowjo, Treestar Inc., Ashland, OR, USA*).

Determinación del potencial de membrana mitocondrial espermática

Después de 2 hpin, los espermatozoides, tanto del control como los incubados con ZIKV (MOI de 2), se trataron con 0,25 mg/mL de yoduro de propidio (IP) (*Molecular Probes® Inc, OR, USA*) y 10 nM de 3,3'-dihexiloxacarbocianina (DIOC6) (*Molecular Probes®*) durante 30 min. Los espermatozoides se lavaron una vez, y se centrifugaron a 300g/5 min. El botón fue resuspendido en PBS 1X y se realizó la lectura en el citómetro de flujo de 10 000 espermatozoides por muestra, de acuerdo con el protocolo descrito previamente.^(15,16,17)

Determinación de la integridad de la membrana espermática

De acuerdo con el protocolo previamente establecido,^(15,16,18) después de 2 hpin con ZIKV, los espermatozoides se incubaron con IP a una concentración final de 0,25 mg/mL y 1 µM de Sybr 14 (*LIVE/DEAD® Sperm-Viability Kit, Molecular Probes®*) durante 30 minutos. Estos fueron lavados una vez con PBS 1X y finalmente el botón celular se resuspendió en PBS 1X y se realizó la lectura por citometría, de acuerdo con el protocolo descrito previamente.^(15,16,18)

Análisis de la lipoperoxidación de la membrana espermática

Después de 2 hpin con ZIKV, los espermatozoides se incubaron con el colorante BODYPI C11 (*Molecular Probes® Inc, OR, USA*) durante 30 minutos; se lavaron una vez con PBS

1X, se resuspendió el botón en PBS 1X y se realizó la lectura en el citómetro, según el protocolo descrito previamente.^(15,16,18)

Evaluación de los niveles de especies reactivas de oxígeno intracelulares espermáticas

Luego de 2 h pin con ZIKV, los espermatozoides se incubaron con 1 μ M 2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y 0,25 mg/mL IP durante 30 min. Se lavaron 3 veces con PBS 1X y finalmente el botón fue resuspendido en PBS 1X. La lectura para determinar los niveles de especies reactivas de oxígeno se realizó en el citómetro de flujo, de acuerdo con el protocolo previamente descrito.^(15,16,18)

Para el análisis estadístico se realizó una prueba de Friedman y comparaciones múltiples de Dunn's para la comparación de los grupos con el grupo control. Todas las determinaciones se realizaron mediante el programa estadístico GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.) y se consideró un nivel mínimo de significancia del 95 %, valor $p < 0,05$.

Resultados

En la muestra total, la incubación del CHIKV con los espermatozoides incrementó tanto la movilidad progresiva como la movilidad total de los espermatozoides desde el momento 0, comparado con el grupo control. El efecto fue independiente de la multiplicidad de infección (MOI) viral usada, aunque con la MOI de 10 se observó un ligero incremento tanto de la movilidad progresiva como total, en la primera y segunda hora de incubación. Además, se encontró una alta variabilidad entre los espermatozoides de cada una de las muestras. Luego de 3 h de incubación, la movilidad total disminuyó a porcentajes similares a la muestra control (Fig. 2).

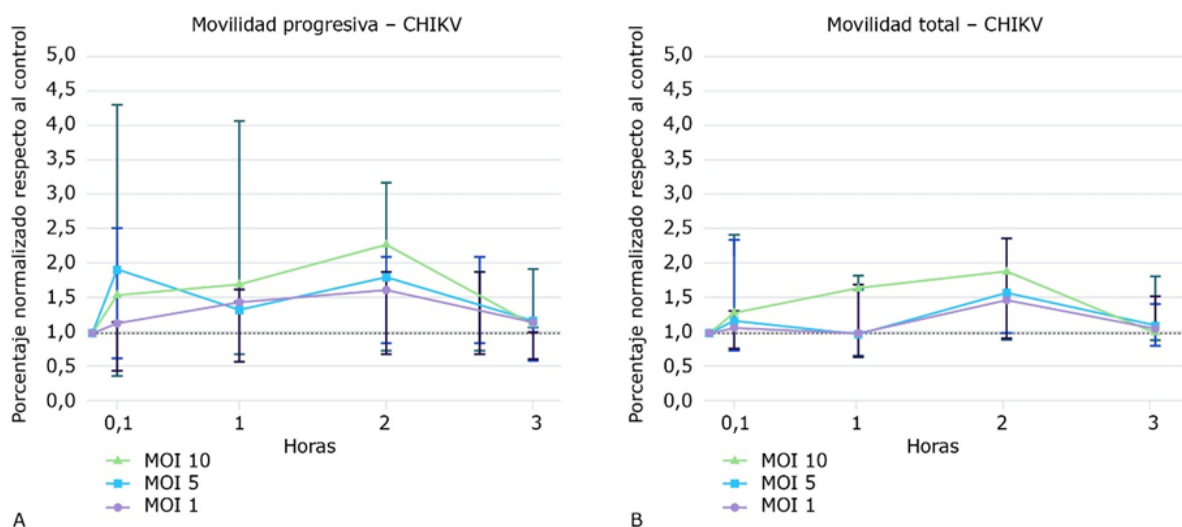


Fig. 2 - Movilidad de espermatozoides en respuesta al contacto con el CHIKV. A) Movilidad progresiva; B) Movilidad total CHIKV.

Se observa porcentaje normalizado respecto al control de la movilidad progresiva y movilidad total de los espermatozoides incubados con el CHIKV, según la MOI, al tiempo inicial (0 h), a los 5-6 min (0,1), y a 1, 2 y 3 hpin.

La interacción de los espermatozoides con el ZIKV disminuye la movilidad y la viabilidad. En las siguientes figuras se muestra el comportamiento de la movilidad de los espermatozoides incubados con el ZIKV. En la muestra total, la incubación con el ZIKV disminuyó tanto la movilidad progresiva como la movilidad total de los espermatozoides, principalmente con una MOI de 1 y 2, en los 3 tiempos de incubación evaluados, comparado con el grupo control. Sin embargo, al retar los espermatozoides con la MOI de 0,5, esta no afectó la movilidad espermática y fue muy similar a la del grupo control (Fig. 3).

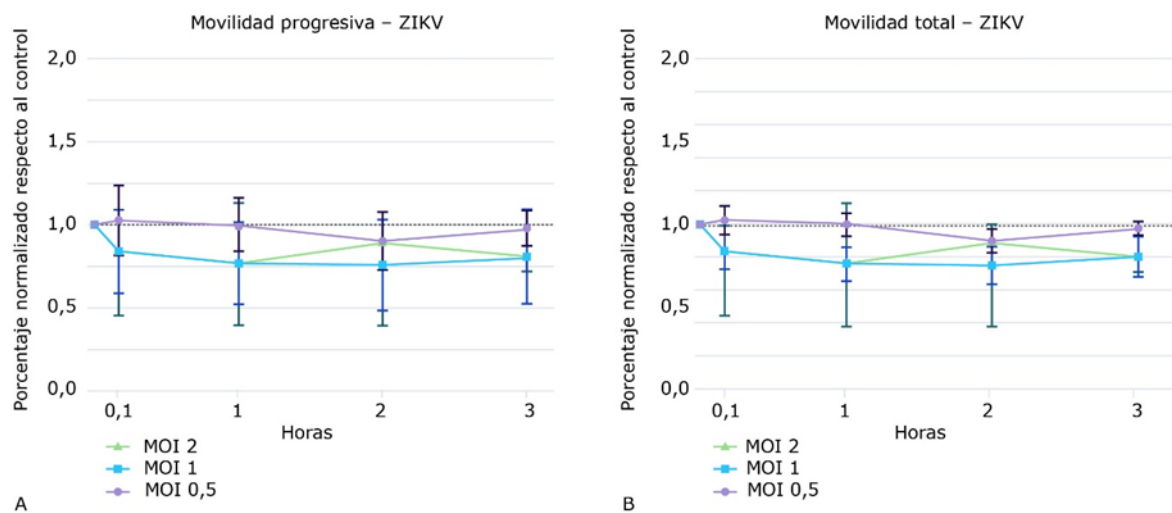


Fig. 3 - Movilidad de espermatozoides en respuesta al contacto con el ZIKV. **A)** Porcentaje normalizado respecto al control de la movilidad progresiva; **B)** movilidad total de los espermatozoides incubados con el ZIKV según la MOI, al tiempo inicial (0 h), a los 5-6 min (0,1), y 1, 2 y 3 hpin.

Resultados similares fueron observados para la viabilidad espermática; las MOI de 1 y 2 del ZIKV disminuyeron la viabilidad en comparación con el control al momento inicial (0 h), 1, 2 y 3 hpin (Fig. 4). Sin embargo, la MOI de 0,5 no afectó la viabilidad espermática, excepto a las 3 hpin, donde se observó una ligera disminución.

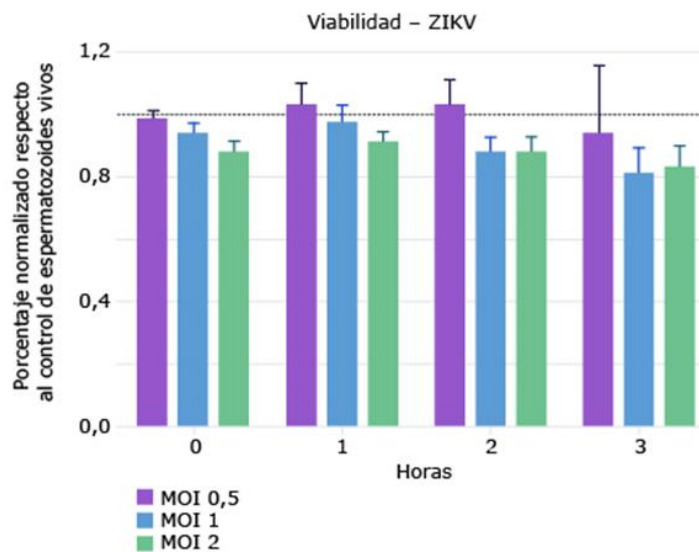


Fig. 4 - Viabilidad de espermatozoides incubados con el ZIKV. Porcentaje normalizado respecto al control de la viabilidad con las tres MOI usadas (0,5, 1 y 2), durante 0, 1, 2 y 3 hpin.

Por otro lado, se evaluaron los parámetros seminales funcionales de los espermatozoides de 3 muestras de semen que fueron incubados con el ZIKV durante 2 h con una MOI de 2. Los espermatozoides incubados con el ZIKV mostraron una disminución en el porcentaje de células con potencial de membrana mitocondrial (PMM) alto (65,9 [51,5 – 67,6] vs 74,5 [55,7 – 78,1]) y en las intensidades medias de fluorescencia (5743 [4147 – 8229] vs 6766 [4289 – 10430]), comparado con el control. Igualmente se observó una disminución en la viabilidad de los espermatozoides incubados con el ZIKV en comparación con el control (58,9 [40,8 – 71,9] vs 69,5 [57,1 – 81]). La lipoperoxidación de las membranas espermáticas fue significativamente mayor en los espermatozoides incubados con el ZIKV, comparado con el control (92,3 [30 – 95,9] vs 0,3 [0,29 – 0,7]). En la muestra total también se observó un incremento en el número de espermatozoides muertos y necróticos después de la incubación, comparado con el control (28,1 [19,4 – 49,3] vs 205 [10,7 – 36,7]), e igualmente se observó un ligero incremento en el porcentaje de producción de ROS en respuesta a la incubación con el ZIKV (71,7 [65,5 - 79] vs 66,7 [63,7 - 85]).

Discusión

Hasta la fecha se conoce muy poco sobre el impacto del ZIKV y CHIKV en la calidad espermática, y sobre la infección del tracto reproductivo masculino humano. Igualmente, no existen estudios que evalúen el efecto *in vitro* de la interacción de esos dos virus con los espermatozoides humanos. Dado que la información disponible se basa en modelos murinos y primates no humanos,^(9,10,11,12) es indispensable realizar estudios que permitan entender mejor la repercusión de esas arbovirosis en las variables del espermograma humano y la fertilidad.

Se ha reportado que algunos virus con tropismo por el tracto reproductivo masculino,^(19,20,21,22,23,24) incluidos virus de las paperas, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C y el VIH-1, tienen la capacidad de interactuar con los espermatozoides y perturbar sus funciones vitales.^(25,26,27,28) Esto conlleva a una alteración de la calidad seminal, que incluye una disminución del volumen de eyaculado, pérdida de movilidad espermática, reducción de la concentración, e inclusive, la muerte de los espermatozoides.

En el presente estudio se observó que el CHIKV no afectó negativamente la movilidad espermática *in vitro*, pero en contraste el virus posiblemente activa los espermatozoides. En el caso del ZIKV, la incubación con los espermatozoides indujo un efecto negativo sobre la movilidad, la viabilidad y los parámetros funcionales espermáticos.

Uno de los principales hallazgos de este estudio es la evidencia que el efecto sobre el espermatozoide varía según el virus, la MOI y el tiempo de interacción virus-espermatozoide. En los espermatozoides que estuvieron incubados con el ZIKV, se observó una disminución del potencial de membrana mitocondrial (PMM) y un aumento de la peroxidación lipídica, asociado a la disminución de la movilidad (progresiva y total) de los espermatozoides. Además, el contacto ZIKV-espermatozoide disminuyó la viabilidad y aumentó el número de células necróticas, con respecto al control. Estos datos sugieren que el contacto del virus con los espermatozoides resulta en un desbalance entre la producción de oxidantes y antioxidantes en semen, dando lugar al estrés oxidativo, que podría alterar la estructura y función de los espermatozoides como se ha descrito previamente.^(29,30,31,32) Si bien no se encontraron diferencias significativas con respecto a la producción de ROS entre el control y las muestras expuestas al ZIKV, el aumento de la lipoperoxidación de la membrana de los espermatozoides, como el que se observó en el presente estudio, se ha relacionado con un aumento de ROS, debido a que puede inhibir la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, reducir la NADPH intracelular y aumentar los niveles de glutatión reducido, lo que finalmente induce una cascada que disminuye la fosforilación del axonema y aumenta la lipoperoxidación.⁽³³⁾

Además, el aumento de la lipoperoxidación puede resultar en la pérdida de la fluidez e integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides, lo que puede reducir la reacción acrosómica y afectar la interacción espermatozoide-oocito,^(32,34) con implicaciones negativas en la fertilidad y la fecundación. De igual modo, la disminución del PMM se ha asociado con anomalías en el seminograma,^(35,36,37) en especial, la reducción de la movilidad de los espermatozoides y la capacidad fertilizante.^(38,39,40) Se ha observado que los espermatozoides que tienen mayor movilidad tienen PMM más altas,⁽³⁹⁾ una estructura mitocondrial íntegra con un grado de actividad óptima,⁽⁴⁰⁾ y mayor capacidad de fertilización. Por el contrario, la reducción del PMM puede ocasionar una disminución de la movilidad espermática, posiblemente por la reducción de ATP, producto de la alteración de la membrana mitocondrial;^(36,40,41,42) a su vez, los espermatozoides son menos capaces de experimentar la reacción acrosómica.⁽³⁸⁾

Aunque no se observó una modificación drástica en el análisis seminal, los resultados son consistentes con reportes previos que muestran que los individuos infectados por el ZIKV presentan una alteración de los parámetros espermáticos.^(43,44) Resultados similares se encontraron en ratones infectados.^(45,46) En concordancia con los resultados presentados en este trabajo, *Joguet* y otros⁽⁴⁴⁾ también observaron un impacto en la movilidad espermática en pacientes con infección *in vivo* por ZIKV, y una disminución en la movilidad total y progresiva entre los 7 y 20 días posinfección. Sin embargo, no se evidenció que la infección *in vivo* influenciara la viabilidad de los espermatozoides, incluso a largo plazo. Por el contrario, un estudio piloto con modelos de primates no humanos, en el que se realizaron análisis espermáticos computarizados, no pudo establecer que la infección *in vivo* tuviese un impacto en la movilidad espermática.⁽⁴⁷⁾ Contrario a lo observado con el ZIKV, los resultados obtenidos sugieren que el CHIKV podría inducir la hiperactivación espermática, posiblemente como resultado de la activación de cascadas de señalización que regulan la movilidad espermática. Al igual que en el caso particular del CHIKV, no se observó un efecto negativo del virus sobre la movilidad espermática, y tampoco se determinó el efecto del virus sobre los parámetros funcionales. Entre las limitaciones del presente trabajo se incluyen el pequeño número de muestras analizadas y la alta variación inter individuo en el efecto del virus. Los resultados sugieren que el virus del ZIKV interactúa con los espermatozoides humanos y produce un desbalance entre el estrés oxidativo y su capacidad antioxidante, lo que afecta la movilidad espermática y podría, además, estar implicado en la calidad espermática y el potencial fértil de los hombres infectados.

Referencias bibliográficas

1. Caglioti C, Lalle E, Castilletti C, Carletti F, Capobianchi MR, Bordi L. Chikungunya virus infection: an overview. *New Microbiol.* 2013;36(3):211-27. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.rmu.2015.06.001>
2. Hamel R, Dejarnac O, Wichit S. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol.* 2015;89(17):8880-96. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00354-15>
3. Brito CA, Henriques-Souza A, Soares CR, et al. Persistent detection of Zika virus RNA from an infant with severe microcephaly—a case report. *BMC infectious diseases.* 2018;18(1):1-9. DOI: <http://doi.org/10.1186/s12879-018-3313-4>

4. Penot P, Briclher S, Guilleminot J. Infectious Zika virus in vaginal secretions from an HIV-infected woman, France, August 2016. *Eurosurveillance*. 2017;22(3):304-44. DOI: <http://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.3.30444>
5. Arsuaga M, Bujalance SG, Díaz-Menéndez M, Vázquez A, Arribas JR. Probable sexual transmission of Zika virus from a vasectomised man. *The Lancet Infectious diseases*. 2016;16(10):1107. DOI: [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30320-6](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30320-6)
6. Huits R, De Smet B, Ariën KK, Van Esbroeck M, Bottieau E, Cnops L. Zika virus in semen: a prospective cohort study of symptomatic travellers returning to Belgium. *Bulletin of the World Health Organization*. 2017;95(12):802. DOI: <https://doi.org/10.2471/BLT.17.181370>
7. Lalle E, Colavita F, Iannetta M. Prolonged detection of dengue virus RNA in the semen of a man returning from Thailand to Italy, January 2018. *Euro Surveill*. 2018;23(18):18-00197. DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.18.18-00197>
8. Bujan L, Mansuy J-M, Hamdi S, Pasquier C, Joguet G. 1 year after acute Zika virus infection in men. *The Lancet Infectious Diseases*. 2020;20(1):25-6. DOI: [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30678-4](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30678-4)
9. Govero J, Esakky P, Scheaffer SM. Zika virus infection damages the testes in mice. *Nature*. 2016;540(7633):438-42. DOI: <http://doi.org/10.1038/nature20556>
10. Griffin BD, Muthumani K, Warner BM. DNA vaccination protects mice against Zika virus-induced damage to the testes. *Nature communications*. 2017;8(1):1-8. DOI: <http://doi.org/10.1038/ncomms1574>
11. Uraki R, Jurado KA, Hwang J. Fetal growth restriction caused by sexual transmission of Zika virus in mice. *The Journal of infectious diseases*. 2017;215(11):1720-4. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jix204>
12. Peregrine J, Gurung S, Lindgren MC. Zika virus infection, reproductive organ targeting, and semen transmission in the male olive baboon. *Journal of Virology*. 2019;94(1):e01434-19. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.01434-19>
13. Bandeira AC, Campos GS, Rocha VFD. Prolonged shedding of Chikungunya virus in semen and urine: A new perspective for diagnosis and implications for transmission. *ID Cases*. 2016;6:100-3. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.idcr.2016.10.007>
14. Organization WHO. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Behalf of the World Health Organization. Ginebra: Medical Panamericana; 2010.

15. Mayorga Torres JM, Peña B, Cadavid AP, Cardona Maya WD. La importancia clínica del ADN espermático en el análisis seminal cotidiano. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*. 2015 [acceso20/01/2021];80:265-8. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75262015000300012
16. Mayorga-Torres BJ, Camargo M, Agarwal A, du Plessis SS, Cadavid AP, Cardona Maya WD. Influence of ejaculation frequency on seminal parameters. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015;13(1):47. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0045-9>
17. Mayorga-Torres B, Camargo M, Cadavid A, du Plessis S, Cardona Maya WJA. Are oxidative stress markers associated with unexplained male infertility? *2017;49(5):e12659*. DOI: <https://doi.org/10.1111/and.12659>
18. Mayorga-Torres BJ, Cardona-Maya W, Cadavid A, Camargo M. Evaluación de los parámetros funcionales espermáticos en individuos infértiles normozoospermicos. *Actas Urol Esp*. 2013;37(4):221-7. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.acuro.2012.06.008>
19. Cardona Maya WD, Du Plessis SS, Velilla PA. Semen as virus reservoir? *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2016;33(9):1255-6. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0747-8>
20. Cardona Maya WD, Du Plessis SS, Velilla PA. SARS-CoV-2 and the testis: similarity with other viruses and routes of infection. *Reprod Biomed Online*. 2020;40(6):763-4. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.04.009>
21. Cardona Maya WD, Rugeles MT. Father-to-Child HIV Transmission: Do Not Forget Sperm Cells as Vectors. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2019;35(9):785. DOI: <https://doi.org/10.1089/AID.2019.0055>
22. Cardona-Maya WD, Hernandez PAV, Henao DE. Male Ebola Survivors: Do Not Forget to Use a Condom! *Reprod Sci*. 2019;26(10):1326. DOI: <https://doi.org/10.1177/1933719114563733>
23. Cardona-Maya W, Velilla PA, Montoya CJ, Cadavid A, Rugeles MT. In vitro human immunodeficiency virus and sperm cell interaction mediated by the mannose receptor. *J Reprod Immunol*. 2011;92(1-2):1-7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jri.2011.09.002>
24. Omolaoye TS, Adeniji AA, Cardona Maya WD, du Plessis SS. SARS-COV-2 (Covid-19) and male fertility: Where are we? [Article]. *Reprod Toxicol*. 2021;99:65-70. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.11.012>
25. Rubin S, Eckhaus M, Rennick LJ, Bamford CG, Duprex WP. Molecular biology, pathogenesis and pathology of mumps virus. *J Pathol*. 2015;235(2):242-52. DOI: <https://doi.org/10.1002/path.4445>

26. Savasi V, Parisi F, Oneta M. Effects of highly active antiretroviral therapy on semen parameters of a cohort of 770 HIV-1 infected men. *PLoS One*. 2019;14(2):e0212194. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212194>
27. Dulioust E, Du AL, Costagliola D. Semen alterations in HIV-1 infected men. *Hum Reprod*. 2002;17(8):2112-8. DOI: <https://doi.org/10.1093/humrep/17.8.2112>
28. Karamolahi S, Yazdi RS, Zangeneh M, Makiani MJ, Farhoodi B, Gilani MAS. Impact of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection on sperm parameters of infertile men. *Int J Reprod Biomed*. 2019;17(8):551-6. DOI: <https://doi.org/10.18502/ijrm.v17i8.4820>
29. Aitken RJ, Buckingham DW, Brindle J, Gomez E, Baker HW, Irvine DS. Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leukocytes in washed sperm preparations and seminal plasma. *Hum Reprod*. 1995;10(8):2061-71. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136237>
30. Griveau JF, Dumont E, Renard P, Callegari JP, Le Lannou D. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 1995;103(1):17-26. DOI: <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1030017>
31. Twigg J, Fulton N, Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum Reprod*. 1998;13(6):1429-36. DOI: <https://doi.org/10.1093/humrep/13.6.1429>
32. Cruz DF, Lume C, Silva JV. Oxidative stress markers: Can they be used to evaluate human sperm quality? *Turk J Urol*. 2015;41(4):198-207. DOI: <https://doi.org/10.5152/tud.2015.06887>
33. Pereira R, Sa R, Barros A, Sousa M. Major regulatory mechanisms involved in sperm motility. *Asian J Androl*. 2017;19(1):5-14. DOI: <https://doi.org/10.4103/1008-682X.167716>
34. Hosseinzadeh Colagar A, Karimi F, Jorsaraei SG. Correlation of sperm parameters with semen lipid peroxidation and total antioxidants levels in astheno- and oligoasthenoteratospermic men. *Iran Red Crescent Med J*. 2013;15(9):780-5. DOI: <https://doi.org/10.5812/ircmj.6409>
35. Kasai T, Ogawa K, Mizuno K. Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. *Asian J Androl*. 2002;4(2):97-103. DOI: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0272.2010.01117.x>

36. Marchetti C, Obert G, Deffosez A, Formstecher P, Marchetti P. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Hum Reprod.* 2002;17(5):1257-65. DOI: <https://doi.org/10.1093/humrep/17.5.1257>
37. Paoli D, Gallo M, Rizzo F. Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility. *Fertil Steril.* 2011;95(7):2315-9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.03.059>
38. Agnihotri SK, Agrawal AK, Hakim BA. Mitochondrial membrane potential (MMP) regulates sperm motility. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2016;52(9):953-60. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11626-016-0061-x>
39. Gallon F, Marchetti C, Jouy N, Marchetti P. The functionality of mitochondria differentiates human spermatozoa with high and low fertilizing capability. *Fertil Steril.* 2006;86(5):1526-30. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.03.055>
40. Wang X, Sharma RK, Gupta A. Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. *Fertil Steril.* 2003;80 Suppl 2:844-50. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(03\)00983-x](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(03)00983-x)
41. Alamo A, De Luca C, Mongioi LM. Mitochondrial Membrane Potential Predicts 4-Hour Sperm Motility. *Biomedicines.* 2020;8(7). DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines8070196>
42. Barbagallo F, La Vignera S, Cannarella R, Aversa A, Calogero AE, Condorelli RA. Evaluation of Sperm Mitochondrial Function: A Key Organelle for Sperm Motility. *J Clin Med.* 2020;9(2). DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm9020363>
43. Avelino-Silva VI, Alvarenga C, Abreu C. Potential effect of Zika virus infection on human male fertility? *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2018;60:e64. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201860064>
44. Joguet G, Mansuy JM, Matusali G. Effect of acute Zika virus infection on sperm and virus clearance in body fluids: a prospective observational study. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(11):1200-8. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30444-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30444-9)
45. Si L, Meng Y, Tian F. A Peptide-Based Virus Inactivator Protects Male Mice Against Zika Virus-Induced Damage of Testicular Tissue. *Front Microbiol.* 2019;10:2250. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02250>
46. Govero J, Esakky P, Scheaffer SM. Zika virus infection damages the testes in mice. *Nature.* 2016;540(7633):438-42. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature20556>

47. Vogt MB, Frere F, Hawks SA, Perez CE, Coutermarsh-Ott S, Duggal NK. Persistence of Zika virus RNA in the epididymis of the male reproductive tract. *Virology*. 2021;(560):43-53. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2021.05.001>

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Yorjagis A. Méndez Cortina: Concepción y diseño del trabajo, búsqueda y revisión bibliográfica, recolección e interpretación de los resultados, redacción del manuscrito y revisión crítica del documento final.

Vicky Margarita Montaña Mendoza: Concepción y diseño del trabajo, búsqueda y revisión bibliográfica, recolección e interpretación de los resultados, redacción del manuscrito y revisión crítica del documento final.

Silvio Urcuqui-Inchima: Interpretación de los resultados, revisión crítica del documento final y aprobación de la versión final.

Walter D. Cardona Maya: Concepción y diseño del trabajo, interpretación de los resultados, redacción del manuscrito, revisión crítica del documento final y aprobación de la versión final.

Paula Andrea Velilla: Concepción y diseño del trabajo, interpretación de los resultados, redacción del manuscrito, revisión crítica del documento final y aprobación de la versión final.