



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Milene Rocha Ribeiro

**Estudo da infecção de vírus ZIKA em modelo de explantes
de placenta humana**

São José do Rio Preto

2018

Milene Rocha Ribeiro

Estudo da infecção de vírus ZIKA em modelo de explantes de placenta humana

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Paula Rahal

Co-orientador: Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira.

São José do Rio Preto

2018

Ribeiro, Milene Rocha.

Estudo da infecção de vírus ZIKA em modelo de explantes de placenta humana / Milene Rocha Ribeiro. – São José do Rio Preto, 2018
116 f.: il.

Orientador: Paula Rahal

Coorientador: Maurício Lacerda Nogueira

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Placenta. 2. Flavivírus. 3. Apoptose. 4. Interferon. 5. Caspase 3.
6. Virologia. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 576.858

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE UNESP -

Câmpus de São José do Rio Preto

Milene Rocha Ribeiro

Estudo da infecção de vírus ZIKA em modelo de explantes de placenta humana

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira
FAMERP – São José do Rio Preto
Co-orientador

Dr. Ícaro Putinhon Caruso
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. João Pessoa de Araújo Junior
UNESP – Botucatu

Dra. Paola Jocelan Scarin Provazzi Trabulsi
UNESP – São José do Rio Preto

Dra. Tatiana Elias Colombo
FAMERP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
04 de junho de 2018

Dedico este trabalho aos meus pais, Clóvis e Marlene e a minha irmã Marcelle, pelo amor incondicional, por todo apoio, carinho, paciência e cuidado. Vocês são o meu espelho, meu orgulho e meus amores.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Prof^a Dr^a Paula Rahal e Dr. Maurício Lacerda Nogueira pela oportunidade, pelo apoio, assistência e conhecimentos compartilhados;

A toda minha família, em especial aos meus pais Clóvis e Marlene, por todo amor, compreensão, preocupação e apoio;

À banca examinadora, Dr^a Fátima Pereira de Souza, Dr. João Pessoa Araújo Junior, Dr^a Paola Jocelan Scarin Provazzi Trabulsi, Dra. Tatiana Elias Colombo e aos suplentes Dr. Ícaro P. Caruso, Dr^a Debora Zuccari e Dr^a Rosa Sayoko por terem disponibilizado o seu tempo e contribuir na finalização deste trabalho;

Ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, do Hospital da Criança, em especial a equipe de enfermagem e a Prof^a. Dr^a. Denise Cristina Mós Vaz Oliani;

A todos do laboratório de Imunomorfologia (LIM), Unesp, em especial para Dr^a. Sônia Maria Oliani, Dr^a. Jusceli Brogin Moreli, Dr. Lucas Azevedo e Ma. Rafaela Batista Molás;

A todos do Laboratório de Imunologia e Genética da Famerp em especial a Dr^a. Cinara Brandão Mattos e Dr. Luis Carlos Brandão Mattos;

Ao Dr. Rafael Elias Marques do Laboratório Nacional de Biociências – LNBio;

Aos professores Pós-Graduação em Microbiologia e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do IBILCE/UNESP.

A Dr^a. Luciana de Arruda Barros do Departamento de Imunologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro e as alunas Michelle Papas e Lana Maeren.

Aos professores da Graduação em Ciências Biológicas, pelos incentivos, orientações e conhecimentos compartilhados, em especial Marina Frizzas, Eduardo Cirino, Cláudio Cerri e Maria Cláudia;

Às minhas orientadoras de iniciação científica Dr^a. Andréa Del Pilar de Souza Peñaloza e Dr^a. Mariza Pozzobom, do Laboratório de Citogenética, Embrapa-Cenargen, a todos os funcionários e amigos;

Ao meu orientador de iniciação científica Dr. Fábio Bueno dos Reis Junior, Laboratório de Microbiologia, a todos os funcionários e amigos;

A minha orientadora de DTI, Dr^a Maria Elita B. Castro, do Laboratório de Virologia do núcleo de Controle Biológico, Embrapa, a todos os funcionários e amigos;

A todos os colegas da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-FAMERP e a todos os colegas do IBILCE;

Ao apoio financeiro da FAPESP e CAPES.

A Deus.

RESUMO

O ZIKV é um vírus de RNA, não segmentado, de fita simples e sentido positivo membro da família *Flaviviridae*. O genoma viral possui uma arquitetura típica de flavivírus, com cerca de 11kb de comprimento, que codifica três proteínas estruturais (Capsídeo, precursor-Membrana, Envelope) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). Nas Américas, emergiu rapidamente após surto na ilha da Páscoa, Chile. No Brasil, o surto iniciou em 2015, aumentando consideravelmente casos de microcefalia em recém-nascidos. Aliada a esses casos, também foi observada a ocorrência de síndrome neurológica de Guillain-Barré. Essas associações transformaram o impacto da transmissão e infecções por ZIKV em uma preocupação de saúde pública global. O vírus é transmitido principalmente pelos mosquitos do gênero *Aedes*, que possuem ampla distribuição e apresentam grandes adaptações a ambientes urbanos. Além de transmissão vetorial, pode ser transmitido via sexual e materno-fetal. O objetivo deste trabalho foi comparar as infecções por uma cepa contemporânea de ZIKV com DENV2 em modelo de explantes de placenta humana a termo, bem como quantificar expressão de citocinas, interferons do tipo I, II e III e marcadores de apoptose induzida via infecção viral. Os resultados demonstram que os explantes da placenta a termo são permissivos e apoiam a infecção por ZIKV. A quantificação da carga viral entre infecções ZIKV e DENV2 foram similares. No entanto, DENV2 apresentou decréscimo na liberação de carga viral em 24 horas pós-infecção. A cinética da

replicação viral coincidiu com a expressão de citocinas pró-inflamatórias e o aumento de apoptose no tecido infectado. Clivagem de caspase 3 foi parcialmente dependente de TNF- α e o tratamento com Anti-TNF- α diminuiu significativamente essa ativação mediada por infecção viral. Cumulativamente, este modelo demonstra que os tecidos placentários humanos são alvo de infecção por ZIKV e que a infecção é patogênica para o tecido placentário.

Palavras-chave: placenta humana, *Flavivirus*, explantes, apoptose, interferon, caspase 3.

ABSTRACT

ZIKV is a non-segmented, single-stranded, positive-sense RNA virus and a member of the *Flaviviridae* family. Its genome has a typical 11 kB-long flavivirus architecture that encodes three structural proteins (Capsid, Precursor-Membrane, Envelop) and seven non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5). In the Americas, the viruses emerged rapidly after outbreak on Pascoa Island, Chile. The outbreak reached Brazil in 2015, substantially increasing cases of microcephaly in newborns. In addition to microcephaly, cases associated with neurological diseases such as Guillain-Barré syndrome have made ZIKV a global public health concern. The virus is mainly transmitted by mosquitoes of the genus *Aedes*, which are widely distributed and which have adapted well great to urban environments. In addition to vector transmission, ZIKV can be transmitted via sexual and maternal-fetal routes, the virus has been isolated is from sperm, amniotic fluid and central nervous systems of stillborn fetuses. The goal of this report was compare ZIKV-infected to DENV2 in full-term human placenta explant model. Quantify expression of cytokines, type I, II and III interferons and markers of induced-apoptosis by viral infection. The results demonstrated that full-term placenta explants are permissive and support ZIKV infection. Viral loads in ZIKV and DENV2 infections were similar. However, DENV2 presented a decrease in viral load release at 24 hours post infection (h.p.i). The kinetics of viral

replication coincided with the expression of proinflammatory cytokines and the increase of apoptosis in the infected tissue. Apoptosis was partially dependent on TNF- α . Anti-TNF- α treatment significantly decreased the activated-caspase 3 mediated viral infection. Cumulatively, this model demonstrates that human placental tissues are targets of ZIKV-infection and that the infection is pathogenic to placental tissue.

Key words: human placenta, *Flavivirus*, explants, apoptosis, interferon, activated-caspase 3

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema geral de genoma do vírus ZIKA.	21
Figura 2. Replicação de Flavivirus.	25
Figura 3. Rotas de infecção ZIKV placentar e paraplacentar.	29
Figura 4. Armazenamento de placenta humana.....	39
Quadro 1. Sequência de ácidos nucleicos iniciadores utilizados para quantificação viral.....	43
Quadro 2. Anticorpos utilizados para imuno-histoquímica.	45
Quadro 3. Lista de primers utilizados para expressão gênica.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AmEpCs	Células epiteliais amnióticas
Axl	Receptor Tirosina Quinase
C	Capisídeo
CAPRIN	Proteína Associada ao Ciclo Celular 1
CZS	Síndrome congênita do Zika
CHKV	Vírus Chikungunya
DENV	Vírus Dengue
E	Envelope
gRNA	RNA genômico
G3BP1	Proteína Ativadora de GTPase (Domínio SH3) 1
G3PB2	Proteína Ativadora de GTPase (Domínio SH3) 2
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
H.p.i	Horas pós- infecção
ISG	Gene estimulador de interferon
Irf3	Fator Regulador 3 do Interferon
Irf5	Fator Regulador 5 do Interferon
Irf7	Fator Regulador 7 do Interferon
JEV	Vírus da encefalite japonesa
KDa	Kilodalton
Kb	Kilo base

Mertk	C-Mer proto-oncogene tirosina quinase
mL	Mililitros
mm ³	Milímetro cúbico
NSs	Proteínas não estruturais
NK	Células Natural Killer
NF-Kb	Factor Nuclear kappa B
pMr	Proteína pré-membrana
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA
sfRNA	RNA sub-genómico
TCD50	50% Dose infectante
TNF-a	Fator de necrose tumoral
Tyro3	Proteína Tirosina Quinase 3
ZIKV	Vírus Zika
WNV	Vírus Nilo Ocidental

SUMÁRIO

Capítulo I	
1. INTRODUÇÃO	18
1.1. GENOMA VIRAL	20
1.3. REPLICAÇÃO VIRAL	24
1.4. TRANSMISSÃO VERTICAL.....	27
1.5. RECPTORES E ENTRADA VIRAL	33
2. OBJETIVO GERAL	37
2.1 Objetivos específicos	37
3. MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1. CULTURA DE CÉLULAS E VÍRUS.....	38
3.1.1. Amostras de placenta humana.....	38
3.1.2. Cultura de explantes de vilos coriônicos	39
3.2. INFECÇÃO VIRAL	41
3.2.1. Tratamento anti-TNF- α	41
3.2.2. Tratamento polyinosic: polycytidylic acid (Poly (I:C)).....	42
3.3. QUANTIFICAÇÃO VIRAL.....	42
3.3.1 Ensaio RT-qPCR.....	42
3.3.2. Ensaio de Placa	43
3.5. ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	44
3.6. IMUNO-HISTOQUÍMICA	44
3.7. EXPRESSÃO GÊNICA.....	46
3.8. ENSAIO TUNEL	47

3.9. ANÁLISE DE DADOS.....	50
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
Artigo Científico (Archives Virology)	63
INTRODUCTION.....	65
MATERIALS AND METHODS.....	67
RESULTS AND DISCUSSION	73
Placental explants support ZIKV infection	73
ZIKV infection induces cytokine expression in the placental explants	80
ZIKV-infected placental explants undergo apoptosis.....	87
REFERÊNCIAS.....	94
APÊNDICES.....	111
Apêndice A- Suplementar Information.....	111
Apêndice B. Parecer Comitê de Ética	114

Capítulo I

1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos últimos vinte anos, a expansão de *Flavivirus* e *Alphavirus* impactou fortemente a saúde global. Inicialmente o vírus Dengue (DENV), depois, vírus Nilo Ocidental (WNV), Chikungunya (CHKV) e recentemente o vírus Zika (ZIKV) (Musso *et al.*, 2015; Weaver e Lecuit, 2015).

Em 2007, o vírus Zika causou surtos na Ilha Yap, Micronésia, seguido de surto na Polinésia Francesa, em 2013. O primeiro relato nas Américas ocorreu na Ilha da Páscoa em 2014. Anteriormente a esses surtos, poucos casos foram relatados desde seu primeiro isolamento viral em macacos *rhesus*, na Floresta Zika, Uganda, em 1947 (Lanciotti *et al.*, 2007; Duffy *et al.*, 2009; Enfissi *et al.*, 2016).

No Brasil, a introdução do vírus foi detectada em 2015, na região nordeste, e em seguida em diversos estados e vários países da América do Sul, incluindo Colômbia, Equador, Suriname, Venezuela, Guiana Francesa e Paraguai. Espalhando-se para América Central, Caribe e México (PAHO/WHO, 2016). Países não endêmicos como os Estados Unidos, Canadá, Japão e Europa relataram casos de infecções por ZIKV de viajantes que retornaram ao país de origem após permanecerem em regiões que passavam por surto da infecção (Musso *et al.*, 2014; Hennessey *et al.*, 2016).

O vírus é transmitido principalmente pelos mosquitos do gênero *Aedes*. Na África, ZIKV foi isolado em diferentes mosquitos, incluindo *Ae. Furcifer*, *Ae. Minutus*, *Ae. neoafricano*, *Ae. Albopictus*, entre outros, e mosquitos

pertencentes aos gêneros *Anopheles* (*An. Coustani*, *An. Gambiae*) e *Mansonia* (*Ma. Uniformis*) (Haddow *et al.*, 2012; Marcondes e Ximenes, 2016; Slavov *et al.*, 2016). A manutenção viral no continente Africano é mantida por primatas não humanos considerados os reservatórios naturais, já os seres humanos hospedeiros amplificadores (Vorou, 2016).

Além da transmissão vetorial, o ZIKV é transmitido via sexual, materno-fetal e transfusão de sangue (Frank *et al.*, 2016; Winkler *et al.*, 2017). A transmissão sexual do vírus ZIKA foi sugerida em 2011, Senegal, em que um homem ao retornar infectado ao seu país de origem, transmitiu o vírus a uma mulher através de relações sexuais (Foy *et al.*, 2011). A transmissão sexual pode estar relacionado à persistência em longo prazo de ZIKV nos testículos e sêmen (Atkinson *et al.*, 2016), conforme estudos em camundongos e humanos (Govero *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2018).

A transmissão materno-fetal de flavivirus em humanos foi relatada pela primeira vez em 2002, Nova York, na qual a infecção por WNV resultou em coriorretinite bilateral e destruição neuronal no feto (Alpert *et al.*, 2003). O vírus da encefalite japonesa (JEV) também foi isolado de natimortos sugerindo que a infecção viral poderia ser a causa dos abortos espontâneos (Chaturvedi *et al.*, 1980).

Quanto aos casos clínicos, a infecção por ZIKV era apenas associada a sintomas leves (dor de cabeça, erupção cutânea, conjuntivite). Após surtos nas Américas, outras patologias neurológicas como a síndrome de Guillain-

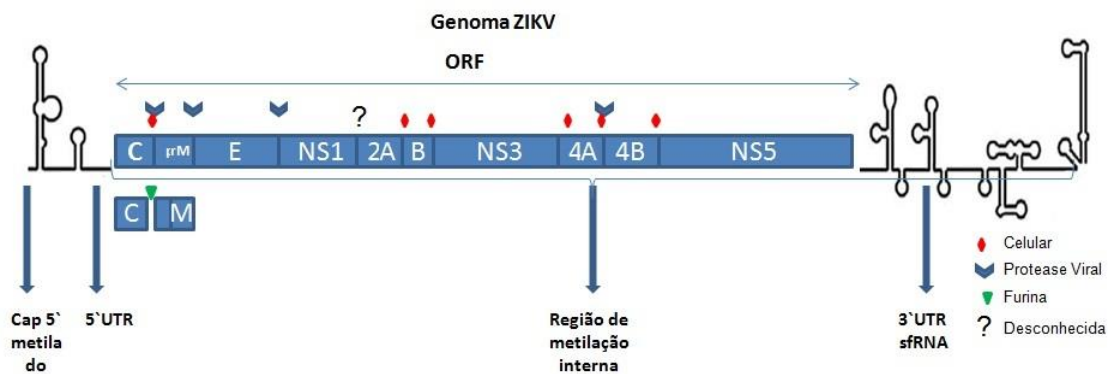
Barré e a microcefalia em neonatos foram observadas (Calvet *et al.*, 2016b; Cao-Lormeau *et al.*, 2016).

1.1. GENOMA VIRAL

ZIKV, membro da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* é um vírus de RNA, não segmentado, de fita simples e polaridade positivo (Wikan e Smith, 2016). O genoma viral possui uma arquitetura típica de flavivírus, com cerca de 11kb de comprimento. (Figura 1). O genoma consiste em um único quadro de leitura aberta (ORF) que é flanqueado por regiões não traduzidas de 5' UTRs e 3'UTRs. Essa ORF codifica uma poliproteína que é clivada por proteases virais e do hospedeiro, resultando em três proteínas estruturais: capsídeo (C), pré-membrana (prM) e envelope (E), e sete não estruturais (NS) proteínas: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5.

A região 5'UTR possui aproximadamente 107 nucleotídeos de tamanho e contém uma estrutura cap (5'cap). Já a região e 3'UTR, com 428 nucleotídeos, apresenta estrutura hairpin e ausência de poly- (A) (Kim *et al.*, 2015; Yun e Lee, 2017). A metilação da região 5'cap (m7GpppAmG) é importante para iniciar a tradução do genoma, bem como, proteger o genoma viral da degradação (Klema *et al.*, 2015). Além disso, duas regiões internas do genoma viral, 2'-O de adenosina e N-6 de adenosina (m6A) podem ser metilados e conseqüentemente influenciar na replicação viral (Chung *et al.*, 2010; Klema *et al.*, 2015; Göertz *et al.*, 2017).

Figura 1. Esquema geral de genoma do vírus ZIKA. Na figura está indicada a poliproteína que codifica as proteínas estruturais (C, prM, E) e as proteínas não estruturais (NS1, NS2A, 2B, NS3, NS4A, 2B, NS5). O gRNA ZIKV pode ser internamente metilado por MTases do hospedeiro e é flanqueado por região 5' e 3'UTR. Estas regiões contêm estruturas resistentes de RNA harpin. Terminal 3'UTR pode ser degradado por exoribonucleases, resultando na formação de duas espécies de sfRNA.



(adaptada, Yun and Lee, 2017).

Estudo recente verificou padrões de metilação (m6A) diferentes entre os genomas de isolados de ZIKV de Porto Rico e Dakar, pertencentes à linhagem Asiática e à Africana, respectivamente, nas regiões de RNA que codificam as proteínas E, NS1, NS3 e NS5 (Gokhale *et al.*, 2016; Lichinchi *et al.*, 2016). (Lichinchi *et al.*, 2016).

A região 3'UTR contém três estruturas de hairpin secundárias conhecidas como 3'-stem (I, II, II'-SLs). Essa região ainda possui quatro SLs curtos, dos quais a função permanece desconhecida e uma sequência complementar de ciclização (CS) (Göertz *et al.*, 2017). Algumas mutações e

deleções dentro da CS ou nas regiões hairpin secundárias geram vírus inviáveis, sugerindo que essas regiões podem ser essenciais para a replicação e tradução viral (Akiyama *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2016; Göertz *et al.*, 2017). Outra região importante localizada na 3'UTR é a sequência que gera RNA subgenômico não codificante (sfRNA) por meio da degradação de exoribonucleases do hospedeiro. Essa degradação produz RNAs funcionais que contribuem para o estabelecimento de uma infecção produtiva e evasão de respostas antivirais da célula hospedeira (Pijlman, 2014; Charley e Wilusz, 2016; Ng *et al.*, 2017).

As funções de sfRNA são amplamente estudadas e em células de mamíferos atua como um antagonista da resposta imune inata dependente de interferon e do gene induzido pelo ácido retinóico (RIG-I)(Manokaran *et al.*, 2015). Podem também servir como local de ligação para proteínas celulares, como G3BP1, G3BP2 e CAPRIN, que são necessárias para a tradução de mRNAs induzidos por interferon (Bidet *et al.*, 2014).

A proteína do capsídio (C) é altamente básica, com massa molecular de aproximadamente 11 KDa, sendo responsável pela formação do nucleocapsídio junto com o RNA viral. A proteína precursora da glicoproteína M (PrM) com 26 KDa é translocada para dentro do RE. A principal função dessa proteína é prevenir que a proteína E sofra rearranjo por catálise ácida durante o trânsito através da via secretória. A conversão da partícula viral imatura para o vírus maduro ocorre na via secretória e coincide com a clivagem de PrM nos

fragmentos Pr e M pela protease furina encontrada no CG ou por enzimas relacionadas (Roby et al. 2011).

A proteína E, 53 KDa, é a maior proteína de superfície dos flavivírus e está relacionada com a ligação viral ao receptor celular e fusão intermembranas. Ela é composta de duas subunidades, cada uma constituída por três domínios: domínios I, II, III. O domínio I é formado por estrutura B-pregueada com o eixo orientado paralelamente ao eixo viral. Esse domínio N-terminal contém duas ligações dissulfetos e exige na superfície uma única cadeia de carboidrato. O domínio II é projetado ao longo da superfície viral por entre as regiões transmembranas da subunidade homodímero. O peptídeo de fusão, que media a inserção dentro da membrana da célula-alvo é localizado na ponta distal do domínio II com relação a região transmembrana. O domínio III contém a porção C-terminal da proteína e uma estrutura em prega similar à observada nas imunoglobulinas (Lindenbach et al. 2007).

As proteínas não estruturais são essenciais para a replicação, montagem dos vírions e a evasão da resposta imune do hospedeiro. A proteína NS1 tem um peso molecular de 46-55 KDa, dependendo do seu estado de glicosilação. Ela está presente em múltiplas formas oligoméricas, e é encontrada em diferentes locais celulares. Além de sua função na replicação do vírus, tem papel imunogênico bem conhecido (Muller e Young, 2013; Apte-Sengupta *et al.*, 2014). A proteína NS2A, não tem função enzimática, mas é necessária para replicação e montagem dos vírus. Pesquisa com cepa DENV utilizando genética reversa revelou pontos de interações intramoleculares e

intermoleculares, as quais NS2A e NS2B regulam a replicação do vírus, montagem, secreção e efeito citopático induzido por vírus (Wu *et al.*, 2017). Além disso, a proteína NS2B atua como um cofator essencial para a proteína NS3. A proteína NS3, 69 KDa, contém um domínio de protease na região N-terminal e um domínio de helicase / NTPase no C-terminal. Apesar de não serem conhecidas todas as funções de NS3, admite-se que a principal é o relaxamento da fita de RNA viral (Chiang e Wu, 2016; Tian *et al.*, 2018).

A proteína NS4B, 27 KDa, é uma proteína de membrana integral, e tem como função estabelecida modular a resposta imune do hospedeiro suprimindo a sinalização de interferom α/β . Já a proteína NS4A induz a reordenação da membrana bem como a autofagia para melhorar a replicação viral (Xie *et al.*, 2015). A proteína NS5, 100 KDa, é conhecida por não possuir muitas variações em sua estrutura de ácidos nucleicos, sendo, portanto, a mais conservada proteína entre as NSs. Ela é de grande importância para a replicação viral, uma vez que realiza duas atividades enzimáticas independentes. Na região N-terminal exerce atividade de metiltransferase e na região C-terminal é uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (Bhattacharya *et al.*, 2008; Sampath e Padmanabhan, 2009).

1.3. REPLICAÇÃO VIRAL

A replicação dos Flavivirus inicia-se com a adsorção do vírus ao receptor da célula-alvo e posterior penetração via endocitose. Após a internalização do vírus, a vesícula endocítica sofre acidificação e fusão entre o envelope viral e a

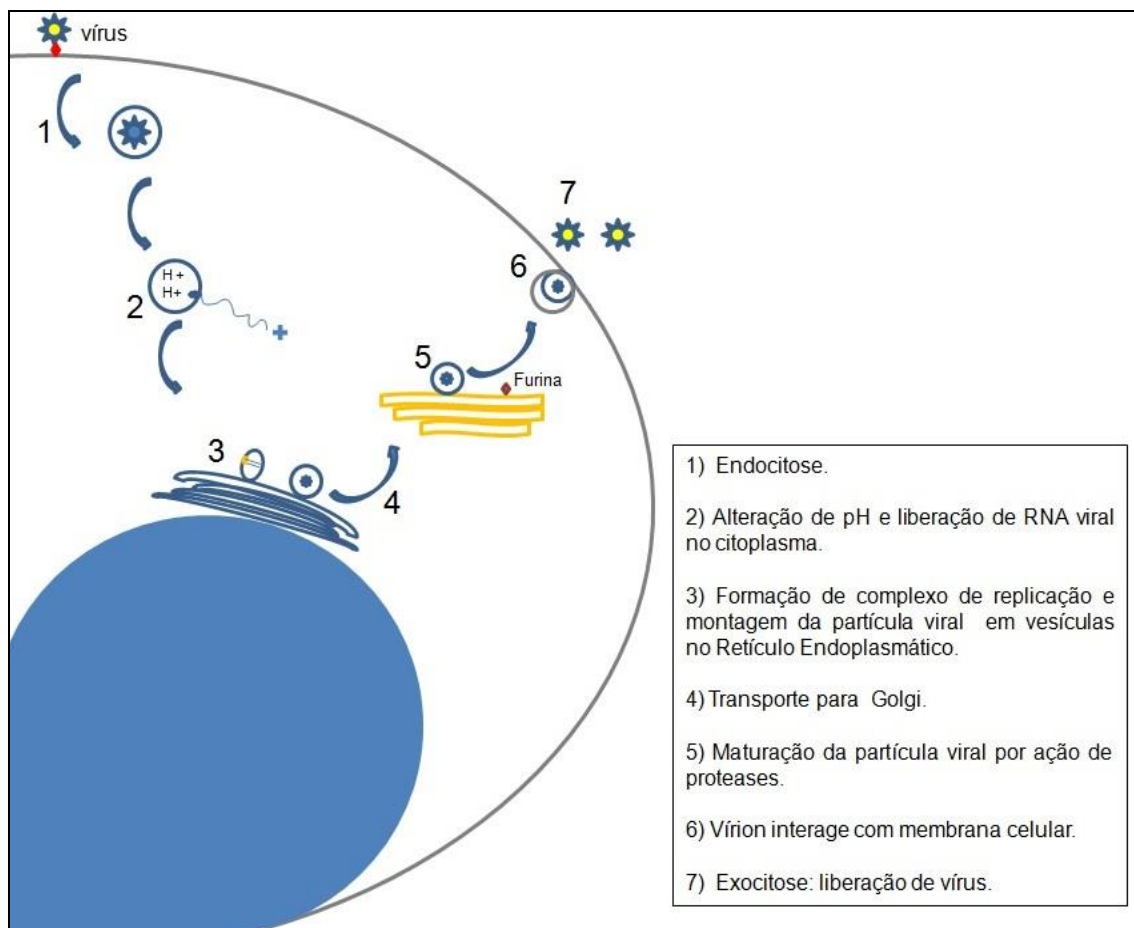
membrana do endossoma. A proteína E sofrerá mudanças conformacionais que culminarão na liberação do capsídeo no citoplasma e em seguida o RNA viral é liberado no citoplasma para iniciar a replicação viral (Ng *et al.*, 2017). Em seguida, este RNA servirá como molde para a síntese de um RNA fita negativa e posteriormente o mRNA (fita positiva), que será traduzido em proteínas virais ou direcionado para compor os novos vírus (Figura 2).

Os novos nucleocapsídeos virais (constituídos pela proteína C e o RNA fita positivo) são formados e entram no lúmen do retículo endoplasmático de forma que ficam envoltos pela membrana do mesmo associada a proteínas E e prM, conhecido como vírion imaturo, no qual será transferido ao sistema de Golgi por meio de vesículas, onde recebe as glicosilações necessárias (Fernandez-Garcia *et al.*, 2009)

No sistema de Golgi essas partículas imaturas sofrem processamento e clivagem de prM para M, por uma enzima conhecida como furina. Essa etapa corresponde a maturação da partícula viral (Kaufmann e Rossmann, 2011).

Após evento de maturação da partícula viral, a proteína C interage com o RNA viral formando a nucleocapsídeo, uma região funcional necessária para a dimerização na montagem viral. A proteína do capsídeo contém uma sequência hidrofóbica interna que medeia a associação da membrana plasmática liberando novas partículas virais ao meio extracelular por exocitose (Fernandez-Garcia *et al.*, 2009).

Figura 2. Replicação de Flavivirus. Esquema dos eventos ocorridos na replicação e amadurecimento de ZIKV dentro da célula hospedeira seguido de sua liberação para o ambiente extracelular. O ciclo de replicação é composto por quatro estágios principais: replicação de RNA viral, tradução de RNA em proteínas virais, montagem de partícula viral e liberação dos vírus.



(adaptada, Göertz et al., 2017).

1.4. TRANSMISSÃO VERTICAL

Após surto em 2015, no Brasil, a infecção por ZIKV em gestantes foi fortemente associada a transmissão congênita devido ao aumento de números de casos de microcefalia em recém-nascidos (Beckham *et al.*, 2016; Malkki, 2016; Panchaud *et al.*, 2016). Posteriormente, foram observadas outras malformações fetais, oftalmológicas, auditivas, incluindo várias manifestações neurológicas, que atualmente são descritas como Síndrome Congênita do ZIKV, (Miranda-Filho *et al.*, 2016; Lucey *et al.*, 2017). Essa associação foi confirmada pela detecção do vírus em líquido amniótico e em cérebro de recém-nascidos com microcefalia demonstrando que o ZIKV atravessa a barreira placentária por um mecanismo ainda desconhecido (Calvet *et al.*, 2016b).

Estudos recentes utilizando modelos experimentais de ratos também indicaram que o vírus pode atravessar a barreira placentária levando à transmissão congênita de ZIKV. A infecção sistêmica em camundongos fêmea grávidas resultou em desenvolvimento anormal do cérebro e microcefalia na prole, que foi atribuída ao neurotropismo viral (Cugola *et al.*, 2016; Miner *et al.*, 2016a; Wu *et al.*, 2016).

Adicionalmente, a infecção de trofoblastos e células endoteliais de placenta de rato infectados com ZIKV e primatas não humanos também foram relatadas (Adams Waldorf *et al.*, 2016; Miner *et al.*, 2016a). No entanto, a maioria dos modelos animais utilizados para estudar a infecção por ZIKV tem a expressão dos receptores de interferon tipo I (A129) e tipo I e tipo II (AG129)

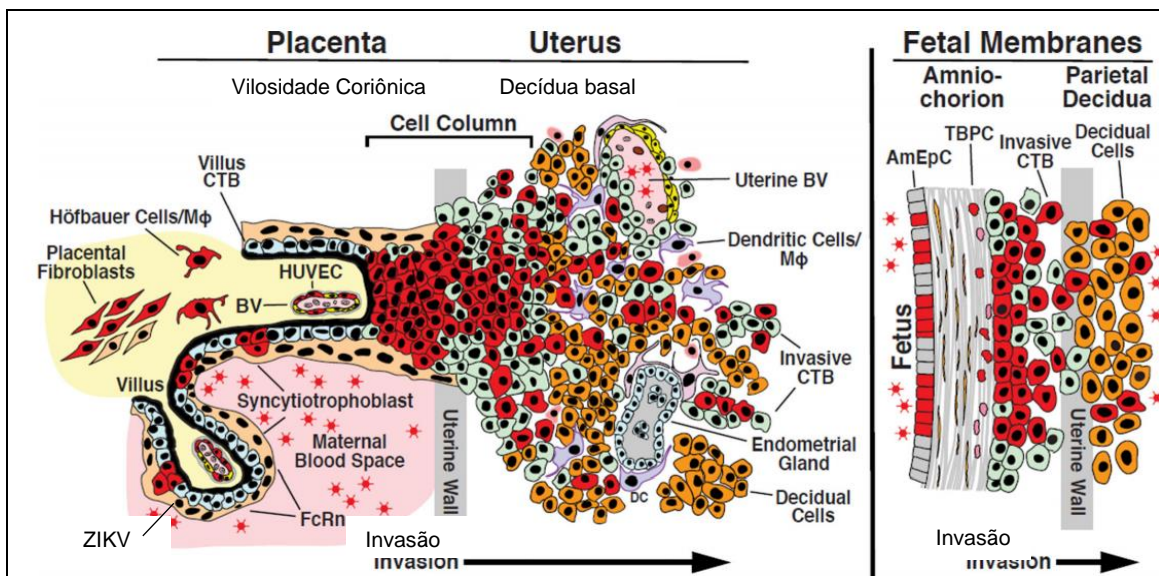
ausentes (Aliota *et al.*, 2016; Rossi *et al.*, 2016). Os ratos que não possuem componentes de respostas imunes inatas, incluindo Mavs^{-/-} Irf3^{-/-} Irf5^{-/-} Irf7^{-/-}, também mostraram susceptibilidade à infecção pelo ZIKV (Lazear *et al.*, 2016).

Embora esses modelos sejam úteis para avaliar a eficácia das vacinas, podem não representar os efeitos reais associados à transmissão placentária do vírus em indivíduos imunocompetentes, bem como, as condições na placenta que favorecem a multiplicação viral, incluindo uma eventual inflamação local. Além do modelo animal, cultura de explantes de placenta humana de amostras de grávidas do primeiro trimestre confirmaram que ZIKV se replica diferencialmente em uma ampla gama de células maternas e fetais, incluindo fibroblastos, trofoblastos, células Hofbauer e células mesenquimais do cordão umbilical (El Costa *et al.*, 2016).

Tabata *et al.* (2016), infectaram diversas células primárias da placenta e explantes de média e tardia gestação e propuseram duas rotas de transmissão vertical, a placentar e paraplacentar (Figura 3). Na transmissão placentar, os citotrofoblastos extravilosos (CTBV) são infectados ao invadirem a decídua basal e a parede uterina. CTBV ancoram as vilosidades e estabelecem conexões físicas entre mãe e feto. Desse modo o vírus presente no sangue materno disseminaria para células placentárias e CTBV (Tabata *et al.*, 2016). Já a na rota paraplacentar, o ZIKV disseminado na decídua parietal, infectaria células trofoblásticas progenitoras (TBPCs) e depois células epiteliais amnióticas (AmEpCs) na membrana amniótica. Os vírus liberados no líquido

amniótico poderiam infectar diversas células fetais susceptíveis (Tabata *et al.*, 2016).

Figura 3. Rotas de infecção ZIKV placentar e paraplacentar. A esquerda corte transversal do útero com citotofoblastos invasivos mediando à ancoragem das vilosidades coriônicas. A direita a membrana amniocoriônica envolve o compartimento fetal com células amnióticas em contato direto com o líquido amniótico. Entre 15-20 semanas de gestação as membranas amniocoriônicas fundem-se e entram em contato com a decídua parietal e um subgrupo de CTB, derivado de TBPC, invade a decídua parietal que reveste a parede uterina.



Retirado de (Tabata *et al.*, 2016).

Curiosamente, TBPCs foram pouco permissivos ao vírus Zika em cultura de explantes a termo, devido a liberação de interferon do tipo III, que além de atuar de forma autócrina, também apresentou função parácrina, protegendo outras células placentárias (Bayer *et al.*, 2016). Esses dados sugestionam que as diferenças de suscetibilidade de células placentárias podem estar relacionadas com a idade gestacional. De acordo com o estudo realizado por Jagger *et al.* (2017), modelo em camundongo grávida revelou diferenças de patogênese conforme a idade gestacional. Infecção por ZIKV no início da gravidez ocasionou a morte do feto e insuficiência da placenta, já na média gestação foi observada diminuição intracraniana, enquanto que, infecção tardia não apresentou danos fetais (Jagger *et al.*, 2017).

Além da idade gestacional, o estudo também demonstrou influência de interferon do tipo III modulando resposta imune na interface materno-fetal (Jagger *et al.*, 2017). Os mecanismos de evasão imunológica em que flavivírus bloqueiam respostas de interferon (α/β) para estabelecer infecção primária são bem estabelecidos (Muñoz-Jordán e Fredericksen, 2010). Interferons são moduladores-chave da imunidade inata, uma desregulação ou inativação de vias relacionadas a genes incentivadores de interferon (ISGs) podem ser fundamentais para uma infecção produtiva e a persistência viral nos tecidos placentários (Miorin *et al.*, 2017).

Os interferons desempenham um papel importante na primeira linha de defesa contra infecções virais. Eles fazem parte do sistema imunológico não

específico e são induzidos em um estágio inicial da infecção viral e são classificados em três tipos, interferons do tipo I, II e III. IFN- α e IFN- β , conhecidos coletivamente como IFNs tipo I, são as principais citocinas efetoras da resposta imune do hospedeiro contra infecções virais, entretanto, também são induzidos em resposta a ligantes bacterianos e outros lipolissacarídeos indicando um papel fisiológico amplo para a defesa e homeostase do hospedeiro. IFNs do tipo I são produzidos por quase todas as células do corpo, enquanto o tipo II, IFN- γ é produzido apenas por células especializadas no sistema imunológico conhecidas como linfócitos T e células natural killer e tem como funções ativar células fagocitárias, a diferenciação de células T auxiliares e o controle inato de patógenos não-virais. IFN tipo III é composto por três genes: IFN- λ 1, IFN- λ 2, IFN- λ 3 e IFN- λ 4. Apesar de compartilhar semelhanças com IFNs de tipo I, como o receptor IFNAR, IFNs de tipo II revelaram-se com propriedades únicas, sendo portanto, os principais reguladores da imunidade antiviral em células epiteliais (Levy *et al.*, 2011; Odendall e Kagan, 2015).

Zang *et al.* (2017) demonstraram que a proteína NS1 de WNV antagoniza a produção de IFN- β através da supressão da ativação do receptor do gene I induzível pelo ácido retinóico (RIG-I) e do gene associado à diferenciação do melanoma 5 (MDA5), que são sensores virais cruciais no sistema imunológico inato do hospedeiro (Zhang *et al.*, 2017). A proteína NS5 de JEV utiliza diversas estratégias para suprimir a resposta imunológica do hospedeiro, podendo inibir a expressão de IFN- β induzida por RNA de fita

dupla (dsRNA), bem como, interagir com proteínas de transporte nuclear do hospedeiro e inibir a translocação de IRF3 e NF-kB (Ye *et al.*, 2017).

Por outro lado, estudos sobre o impacto do aumento de interferons séricos em grávidas e na interface materno fetal ainda são raros. Comba *et al.* (2015) relataram que o aumento dos níveis de IFN- γ no sangue e no endométrio de mulheres grávidas foram significativamente maiores em pacientes que apresentaram aborto do que em pacientes com níveis normais (Comba *et al.*, 2015). O efeito de IFN- γ celular antiproliferativo pode ser prejudicial a uma gravidez (Yui *et al.*, 1994; Sun *et al.*, 2005; Kieckbusch *et al.*, 2015). Estudo com infecção por *Toxoplasma gondii* demonstrou que IFN- γ secretado por células NK da decídua na interface materno-fetal modulou apoptose de trofoblastos (Zhang *et al.*, 2015).

Em estudo realizado *in vitro*, células embrionárias de ratos foram tratadas com IFN- β e IFN- α , apesar de não terem sido observados efeitos teratogênicos, o tratamento causou retardo no crescimento de embriões (Uçar *et al.*, 2016). Outro estudo recente tratou com IFN tipo I explantes de vilosidades coriônicas humanos de média gestação, infectados com ZIKV. O tratamento sugeriu que as complicações na gravidez, incluindo abortos espontâneos e restrição de crescimento poderiam ser associados a esse interferon (Yockey *et al.*, 2018).

1.5. RECEPTORES E ENTRADA VIRAL

A suscetibilidade de células-alvo a flavivírus é intimamente dependente da quantidade e distribuição dos receptores celulares (Rey *et al.*, 2017). Dessa forma, o reconhecimento do vírus pelas células é mediado por interação entre as proteínas da superfície do vírus e os componentes da membrana plasmática celular (Grove e Marsh, 2011).

Apesar de uma intensa investigação, receptores específicos para flavivírus ainda não foram identificados, mas um grande número de moléculas foi descrito mediando endocitose viral (Cruz-Oliveira *et al.*, 2015). Entre elas, glicosaminoglicanos, tais como sulfato de heparano e lectinas, a molécula de adesão de células dendríticas (DC-SIGN), o receptor de manose (MR), o receptor de lipopolissacarídeo (LPS) e proteínas induzidas por estresse, como as proteínas de choque térmico 70 e 90 e a chaperoninas (Hidari e Suzuki, 2011; Moller-Tank e Maury, 2014).

O tropismo por células placentárias e neuronais em infecção ZIKV levantou questões sobre a possibilidade de existirem receptores celulares específicos nesses tecidos (Nayak *et al.*, 2016). Diversos estudos apontaram receptores da família de tirosinas quinases TAM (Tyro3, Axl e Mertk), e um membro da família de proteínas da imunoglobulina de células T (TIM1), como um fator importante na transmissão materno-fetal de ZIKV (Nowakowski *et al.*, 2016; Savidis *et al.*, 2016).

Meertens *et al.* (2017) demonstraram que a infecção por ZIKV promoveu a atividade da Axl quinase melhorando a infecção em células da glia (Meertens

et al., 2012; Meertens *et al.*, 2017). Em células primárias de astrócitos, a ausência de genética de Axl protegeu as células contra infecção pelo ZIKV, mas não bloqueou a entrada viral (Chen *et al.*, 2018). Em células trofoblásticas primárias a inibição de Axl levou a uma redução da infecção por ZIKV. De um modo geral, células na interface materno-fetal apresentam receptores TAM e TIM1 amplamente expressos, dos quais o receptor TIM1 apresentou um papel mais significativo na infecção congênita por ZIKV (Tabata *et al.*, 2016).

Mecanismo de entrada via exossomos também é discutido como possível mecanismo de entrada de ZIKV associado à via de autofagia secretora (não convencional), pela qual células trofoblásticas transferem vírus entre si (Ponpuak *et al.*, 2015). Outro mecanismo de transferência viral entre células mediado por vesículas é a transcitose. Pesquisa em modelo *in vivo* de barreira hematoencefálica demonstrou que apesar da manutenção da integridade endotelial, partículas virais infecciosas cruzaram a monocamada pela via dependente de endocitose ou por transcitose (Papa *et al.*, 2017).

Diversos modelos animais tais como, camundongos, porcos neonatais, embriões de galinha e primatas não humanos foram desenvolvidos para estudar a patogênese e a infecção por ZIKV (Dudley *et al.*, 2016; Goodfellow *et al.*, 2016; Lazear *et al.*, 2016; Darbellay *et al.*, 2017). Esses modelos fornecem uma gama de possibilidades para pesquisar complicações neurológicas, desenvolvimento inicial da vacina, avaliação terapêutica, entre outras. No entanto, podem não traduzir ou limitar estudos de fisiopatologias de síndrome congênita de vírus Zika, uma vez que possuem diferenças significativas de

placentação como hormônios, remodelamento de artérias espiraladas e invasividade de trofoblasto (Bradley e Nagamine, 2017; Newman *et al.*, 2017).

Neste contexto, o cultivo de explantes é uma técnica ainda em aprimoramento, mas eficaz em pesquisas em laboratório. Também denominado método *ex vivo*, caracteriza-se pelo cultivo de fragmentos de órgãos colhidos com punch de biópsia ou bisturi, incubados em placas com meio de cultura em temperatura semelhante à corpórea, mimetizando as condições do organismo vivo (Randall *et al.*, 2011). A técnica de cultivo de explantes mostra-se vantajosa por permitir a redução no número de animais utilizados em experimentação laboratorial, uma vez que são produzidos inúmeros explantes a partir de um único doador, permitindo ainda maior controle ambiental para experimentação *in vitro*, quando comparado com o modelo *in vivo*. A aplicação de doses definidas das substâncias de interesse diretamente no órgão alvo, comparando amostras tratadas e controles provenientes de um único doador, permite a obtenção de resultados sólidos (Randall *et al.*, 2011). Este método possibilita a avaliação da morfologia dos órgãos analisados, bem como a dosagem de hormônios e mensuração da produção de proteínas e muco (LLOYD; KENNEDY; MENDICINO, 1984). Essas características tornam o método propício para pesquisas com substâncias tóxicas ou xenobióticos e com patógenos (Van Poucke *et al.*, 2010; Pinton *et al.*, 2012)

Associada a essas vantagens, há que se considerar a questão bioética. A sociedade atual exige cada vez mais o controle no uso de animais em

experimentação. Nesse sentido, o modelo de cultivo de explantes atende, além dos requisitos éticos, também aos legais. A normatização (decreto 93.933 aprovado em 1987) do Conselho Nacional de Saúde determina que todo estudo deve ser planejado de maneira a obter o máximo de informações utilizando-se o menor número de animais (SCHNAIDER e SOUZA, 2003).

Portanto, os impactos da epidemiologia, o conhecimento das patogêneses e a ação teratogênica, e novos modelos de estudos demonstram a relevância do desenvolvimento de pesquisas que possam ampliar os conhecimentos e elucidar os aspectos biológicos, moleculares, bioquímicos e epidemiológicos do vírus Zika. Este trabalho tem como objetivo avaliar se o modelo de explantes de tecido placentário a termo pode ser utilizado como um modelo adequado para estudo *ex vivo* em infecções por *Flavivirus*.

2. OBJETIVO GERAL

Estudar as infecções por ZIKV e DENV2 em modelo de explantes de placenta humana a termo, bem como, quantificar a expressão de citocinas pró-inflamatórias e interferons do tipo I, II e III. E verificar a apoptose induzida no tecido via infecções.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a replicação de ZIKV e DENV2 em culturas de explantes de placenta humana;
- Comparar curva de replicação viral em explantes infectados;
- Avaliar os danos tecidual em decorrência de apoptose induzida por ZIKV e DENV2;
- Avaliar viabilidade dos explantes de placenta humana submetidos a infecção;
- Caracterizar explantes de placenta humana infectados por ZIKV e DENV2;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CULTURA DE CÉLULAS E VÍRUS

Células Vero E6 foram adquiridas do American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA) e cultivadas em frascos de cultura de 75 cm² (Cultilab) em meio Eagle's Minimum Essential Medium (MEM, Thermo Fisher) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB) (Cultilab), 100 U/mL de penicilina (Sigma) e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma) em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂. Células Vero foram utilizadas para multiplicação de estoques virais e ensaio de quantificação viral por método TCD₅₀. A estirpe ZIKV-BR (GenBank, número KU497555) foi gentilmente cedida por Pedro Vasconcelos, Instituto Evandro Chagas, FIOCRUZ, PA. Esta estirpe foi isolada de um caso de infecção por ZIKV, no estado da Paraíba, Brasil, e foi distribuído como parte de ZIKA FAPESP NETWORK após quatro passagens em células C6/36 (Faria *et al.*, 2016). Para infecções com vírus DENV foi utilizado a estirpe DENV-2 New Guinea C (NGC) (GenBank AF038403).

3.1.1. Amostras de placenta humana

Placentas humanas foram coletadas de pacientes gestantes após o parto cesariano eletivo (38 a 40 semanas de gestação, placenta a termo). As placentas selecionadas para o estudo eram de pacientes saudáveis que não apresentaram pré-eclâmpsia, diabetes, hipertensão, doenças infecciosas e

outras manifestações clínicas que pudessem interferir nos resultados. A coleta das placentas foi autorizada pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP, Brasil (CAAE 55472216.7.0000.5415).

A placenta foi armazenada em saco estéril, adicionada soro fisiológico, acondicionada em caixa térmica e levada imediatamente para Laboratório de Pesquisa em Virologia para processamento (Figura 4).



Figura 4. Armazenamento de placenta humana. Placenta a termo coletada após parto cesariano sem ruptura, acondicionada em saco estéril com soro fisiológico dentro de caixa térmica.

3.1.2. Cultura de explantes de vilos coriônicos

O tecido placentário foi dissecado e lavado em solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril em até 15 minutos após a coleta. Inicialmente com a porção fetal voltada para cima foi realizado um corte triangular. Essa porção foi transferida para placa de petri e lavada com PBS 1X por aproximadamente 3 vezes. Em seguida, vilos coriônicos placentários

terminais foram coletados em 5 mm³ e posteriormente colocados em placas de 12 poços (um por poço), lavados novamente com PBS 1X, e cultivados em meio Meio de Eagle`s modificado de Dulbecco (DMEM,Cultilab)/Mistura Nutriente F-12 (HAMF-12 , Thermo Fisher) proporção 1:1, suplementados com 10% de SBF, e adicionado antibióticos penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (Sigma) durante 24h a 37 °C, 5% de CO² (Figura 5).

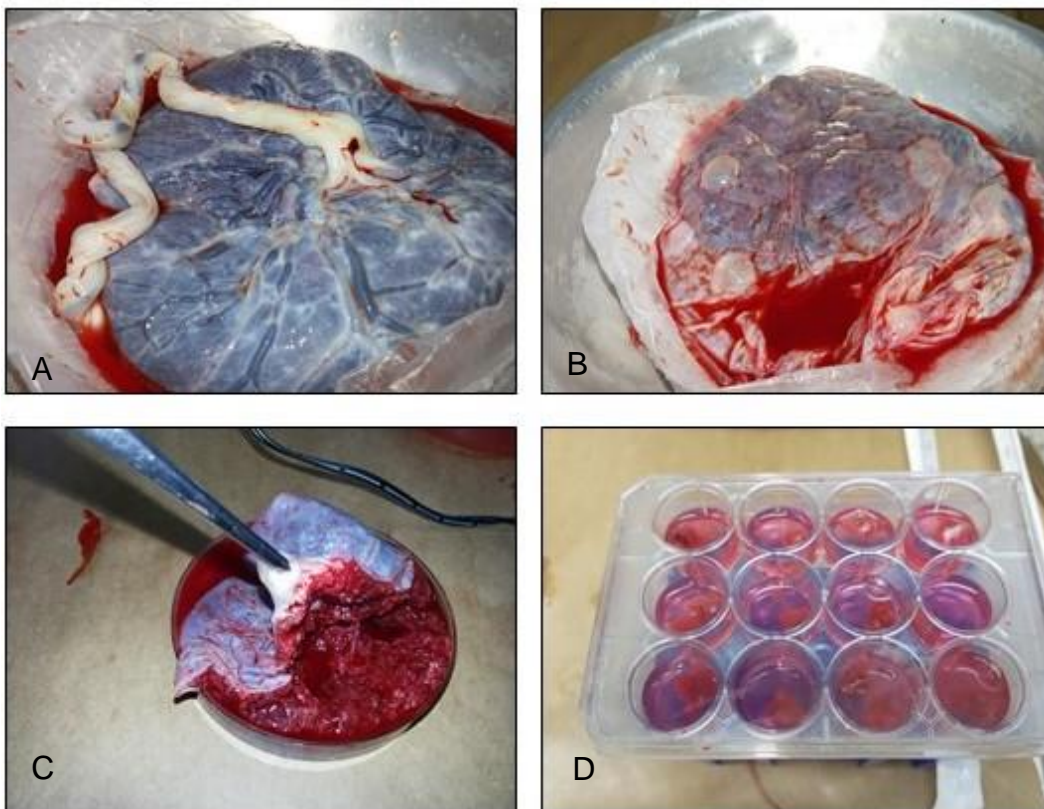


Figura 5. Placenta a termo.(A) Face placentária fetal. (B) Face placentária maternal. (C) Dissecação da placenta para retirada vilos corionicos. (D) Cultura de explantes de placenta humana.

3.2. INFECÇÃO VIRAL

Explantos placentários humanos cultivados após 24h, em placa de 12 poços, foram infectados com ZIKV-BR e DENV2 a um título de 1×10^4 TCD₅₀. Para infecção dos explantes foram utilizados DMEM/HAMF-12 (1:1) suplementado, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) com ausência de SFB. A cultura infectada foi incubada durante 4 horas para permitir a adsorção viral, em seguida, os explantes foram lavados no mínimo três vezes com PBS (1X) para a remoção total do inóculo. Os explantes foram então mantidos em DMEM/HAMF-12 com 2% de SFB. Os sobrenadantes de cultura infectados e seus controles não infectados foram coletados as: 0, 3, 6, 12, 24, 72 e 120 horas após a infecção sem adicionar meios novos ou lavagens para extração de RNA total. Aproximadamente 50µL de sobrenadantes da cultura de 24, 48 e 72h foram utilizados para quantificação de β-hCG por eletroquimioluminescência, Roche Hitachi, modelo Cobas e411.

Os sobrenadantes de 24h e 72h também foram armazenados -80°C e utilizados para ensaio de placa. Já os tecidos cultivados, infectados e não infectados foram utilizados para extração de RNA, e fixados em paraformaldeído a 4% para histologia e imuno-histoquímica.

3.2.1. Tratamento anti-TNF- α

Explantos placentários dos vilos coriônicos cultivados foram tratados com concentração de 100 ng/mL de anticorpo neutralizante anti-TNF RII/ TNFRSF1B (R & D Systems, Minneapolis, MN) por 24h. Após tratamento,

explantes foram infectados com ZIKV-BR e DENV2 a um título de 1×10^4 TCD₅₀, descrito acima (item 3.2). Subsequente à infecção os explantes foram lavados três vezes com PBS (1X) para a remoção total do inóculo, e adicionada meio DMEM/HAMF-12 com 2% de SFB. Os tecidos tratados com anti-TNF- α infectados e sem infecção foram coletados em 72h e 120h, fixados em paraformaldeído a 4% para imuno-histoquímica de marcação de caspase 3.

3.2.2. Tratamento polyinosic: polycytidylic acid (Poly (I:C))

Após 24h de cultivo de explantes placentários humanos, em placa de 12 poços, o meio de cultura foi removido e novo meio adicionado, DMEM/HAMF-12 (1:1) suplementado com 10% SFB, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 μ g/mL) e 50 μ g/mL de poly (I:C) (Sigma-Aldrich). Explantes tratados e não tratados com poly (I:C) foram coletados 24h e 72h após tratamento e congelados a -80°C para extração de RNA total e análise de interferon e citocinas.

3.3. QUANTIFICAÇÃO VIRAL

3.3.1 Ensaio RT-qPCR

O RNA do sobrenadante de explantes infectados com ZIKV e DENV2, bem como o controle não infectado, foi submetido a extração pelo método do Trizol LS Reagent (Life Technologies), de acordo com as especificações do fabricante. As amostras de RNA foram diluídas em água livre de nucleases, e armazenadas a -80°C. Os níveis de ZIKV nessas amostras foram quantificados

por método de curva padrão, RT-qPCR, baseado em ensaio TaqMan, (GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System, REF AG120), condições de ciclagem de acordo com instruções do fabricante. Para análise do RNA de DENV2 foi utilizando o kit Super-Script III Platinum Syber Green One Step RT-qPCR (REF 1136-059) descrito por (Chutinimitkul *et al.*, 2005). Os iniciadores e sondas estão descritos no quadro 1. Para elaboração da curva padrão, os RNAs das amostras quantificadas foram diluídos em série 1:10 para obtenção das concentrações 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 . A eficiência da curva apresentou valor de 98%.

Quadro 1. Sequência de ácidos nucléicos iniciadores utilizados para quantificação viral.

Alvo	Forward primer	Reverse primer
ZIKV	5'- CCG CTG CCC AAC ACA AG -3'	5'- CCA CTA ACG TTC TTT TGC AGA CAT-3'
ZIKV-Probe	5'- AGC CTA CCT TGA CAA GCA GTC AGA CAC TCA A -3'	
DENV2	5'-TTAGAGGAGACCCCTCCC-3'	5'-GAGACAGCAGGATCTCTGG-3'

3.3.2. Ensaio de Placa

O RNA de ZIKV e DENV2 dos sobrenadantes de explantes infectados também foi quantificado por ensaio de placa. As células Vero foram plaqueadas na densidade de 5×10^5 células por poço numa placa de 6 poços e cultivadas durante 24h a 37 °C sob 5% de CO². As diluições em série do sobrenadante da

cultura de explantes (24 e 72 h.p.i) foram adicionadas a cada poço para incubação de 1h. Após a remoção do meio, as monocamadas infectadas foram cobertas com 1,5% de carboximetilcelulose/MEM com 2% de SFB, proporção de 1:1. Os focos de placas foram detectados em 5 dias após a fixação com 10% de solução de formalina e coloração com 2% de violeta de cristal.

3.5. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os explantes infectados e seus controles não infectados foram fixados em 4% de formalina tamponada durante 24h, desidratadas em etanol graduado e incorporadas em parafina para análise histopatológica. Posteriormente, cortes com 3µm foram realizados em micrótomo e colocados em lâminas de vidro para a análise morfológica através da coloração por hematoxilina e eosina (HE). A seguir o material foi analisado e fotografado usando objetiva (40x) em microscópio Axioskop 2-Mot Plus Zeiss (Carl Zeiss, Jena, Alemanha). Para quantificar a fragmentação nuclear, foram fotografados dez campos aleatórios de experimento em triplicata e o número de núcleos picnóticos foi contado para cada foto. Nos vilos placentários, foram analisados os aspectos morfológicos, compreendendo, sinciciotrofoblasto, citotrofoblasto e mesênquima.

3.6. IMUNO-HISTOQUÍMICA

Explantes placentários infectadas com ZIKV-BR e DENV2, 72 e 120 h.p.i, e não infectados foram marcados com anticorpos descritos no quadro 3. Amostras tratadas com anticorpos neutralizantes anti-TNF- α coletadas 72h após a infecção foram marcadas com anti-caspase 3 (17 kDa). As secções de

tecido em série de 3µm de espessura foram desparafinizadas e reidratadas antes da recuperação do antígeno em tampão citrato pH 6,0. A atividade endógena de peróxido foi bloqueada com 3% de peróxido de hidrogênio durante 30 minutos, seguido por bloqueio com 10% de soro bovino de albumina (BSA, Sigma-Aldrich, EUA) em solução salina tampão Tris (TBS) durante 2h. As lâminas foram incubadas com anticorpo primário, descritos no quadro 2, em 10% de TBS-BSA durante 1 hora a 37 ° C, em ensaios independentes. Após o passo de lavagem, as secções foram incubadas com um anticorpo secundário, 1: 500 (anticorpo conjugado com HRP anti-rato ou anti-coelho, Abcan). A coloração positiva foi detectada utilizando 3,3'-diaminobenzidina (substrato DAB, Invitrogen, EUA). Finalmente, as seções foram contra coradas com hematoxilina (InlabConfiança). Os controles negativos foram realizados na ausência de anticorpos primários. A análise foi realizada em microscópio Axioskop 2-Mot Plus (Carl Zeiss, Jena, GR), utilizando o software AxioVision para análises quantitativas. A análise densitométrica foi utilizada para determinar a intensidade da caspase 3 e 4G2 em seções de tecido placentário em uma escala arbitrária de 0 a 255. Os dados foram expressos como média ± S.D.

Quadro 2. Anticorpos utilizados para imuno-histoquímica.

Anticorpo	Produção	Tipo	Laboratório	Diluição
4G2	Rato	Policlonal	UFMG	1: 100
Caspase 3	Coelho	Monoclonal	ab2302	1: 200

Citoqueratina 7	Rato	Monoclonal	Dako	1: 250
Vimentina	Coelho	Monoclonal	Dako	1: 150

3.7. EXPRESSÃO GÊNICA

A extração de RNA total foi realizada em 200 µL de TRizol LS (ThermoFisher Scientific) de acordo com recomendações do fabricante. As amostras foram quantificadas para os seus níveis de ácidos nucleicos, via NanoDrop 2000 UV – Vis spectrophotometer (ThermoFisher Scientific). Os RNAs extraídos foram diluídos para 50 ng/µL em água livre de nuclease, tratados com DNase (Sigma-Aldrich) e armazenadas a -80°C. Oito genes foram analisados para todas as amostras, descritas no quadro 3. A especificidade e eficiência de cada par de iniciadores foram testadas através da curva de dissociação e diluição seriada (90-100% de eficiência obtida na concentração de cDNA utilizada nos experimentos), respectivamente. Todos os genes foram analisados em duplicata para, no mínimo, 4 placentas de pacientes diferentes. O método CT comparativo foi utilizado para quantificar os níveis de expressão gênica usando valores de referência do gene GAPDH para normalização. Sequências dos iniciadores utilizados estão descritas no quadro 3. As análises de expressão de genes de citocinas foram realizadas utilizando um kit de PCR qRT-PCR de Super-Script III Platinum Syber Green OneStep (Invitrogen, REF 1136-059). As condições de ciclagem foram as seguintes: uma etapa inicial de desnaturação a 42°C por 3 min, 95°C por 5 min, seguida por amplificação de 35

ciclos a 95°C por 15 seg e 60°C por 30 seg, finalizando com 40°C por um min. O volume total de reação foi de 15 µL, composta por 5 µL de SYBR Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific), 0,5 µL (10 µM) de cada par dos iniciadores, 0,5 µL de enzimas, 3,6 µL de água livre de nucleases e 5 µL de amostra.

3.8. ENSAIO TUNEL

A detecção da fragmentação do DNA nuclear como marcador morfológico do processo de apoptose em seções histológicas foi realizada utilizando o ensaio TUNEL. O ensaio foi realizado utilizando o kit de detecção de morte celular in situ (Kit de detecção de morte de células in situ, TMR vermelho). Resumidamente, lâminas de tecido de 3 mm, não infectados e após 3 dias de infecção foram desparafinadas, hidratadas e enxaguadas com tampão de fosfato 0,1 M (pH 7,4), seguido de bloqueio com 3% de albumina de soro bovino (BSA) e 20% de SFB. Foi adicionada a mistura de reação TUNEL (mistura de nucleotídeos marcada com fluorescência de TdT) e as lâminas foram incubadas durante 60 minutos a 37°C.

Para o controle negativo foram incubadas apenas com solução de etiqueta TdT sem a mistura de enzima TdT. Para o controle positivo, as amostras foram tratadas com DNase I 3u/mL por 10 minutos à temperatura ambiente. As análises quantitativas foram realizadas utilizando o software de análise de imagem Image-Pro®Plus e as imagens fluorescentes de células TUNEL positivas foram capturadas no microscópio BX53 System, Olympus, a

40x, na detecção de canais vermelhos na faixa de 570-620 nm. Os testes foram realizados em duplicata e as imagens de três campos aleatórios foram adquiridas de cada slide para calcular a média +/- SD.

Quadro 3. Lista de primers utilizados para expressão gênica.

Gene	Forward primer	Reverse primer
IL-6	5'- TGT GAA AGC AGC AAA GAG GCA CTG -3'	5'- ACA GCT CTG GCT TGT TCC TCA CTA -3'
IL-10	5'- AAT AAG GTT TCT CAA GGG GCT -3'	5'- AGA ACC AAG ACC CAG ACA TCA A -3'
IL-1 β	5'- GTC ATT CGC TCC CAC ATT CT -3'	5'- ACT TCT TGC CCC CTT TGA AT -3'
TNF- α	5'- CAG AGG GAA GAG TTC CCC AGG GAC C -3'	5'- CCT TGG TCT GGT AGG AGA CGG -3'
INF- β	5'- TAG CAC TGG CTG GAA TGA GA -3'	5'- TCC TTG GCC TTC AGG TAA TG -3'
INF- γ	5'-CCA ACG CAA AGC AAT ACA TGA -3'	5'- CCT TTT TCG CTT CCC TGT TTT A -3'
IFN- λ 1	5'- GGG AAG CAG TTG CGA TTT AG -3'	5'- GAT TTG AAC CTG CCA ATG TG -3'
INF- λ 4	5'- AGG GTC CTT AAC CGA CTG TG -3'	5'- AAA CAA CCA ATG CGA TCA AA -3'
GAPDH	5'-GTG GAC CTG ACC TGC CGT CT-3'	5'-GGA GGA GTG GGT GTC GCT GT-3'

3.9. ANÁLISE DE DADOS

Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism (Versão 6; GraphPad, CA). Os resultados são expressos como média +/- SD. Para análises estatísticas foram utilizados teste ANOVA unidirecional ou quando necessário bidirecional, seguido de teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ou teste de Bonferroni. As análises experimentais apresentadas foram de no mínimo de 3 experimentos independentes. A significância foi tomada como $P < 0,05$.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS WALDORF, K. M. et al. Fetal brain lesions after subcutaneous inoculation of Zika virus in a pregnant nonhuman primate. **Nat Med**, v. 22, n. 11, p. 1256-1259, Nov 2016. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27618651> >.

AKIYAMA, B. M. et al. Zika virus produces noncoding RNAs using a multi-pseudoknot structure that confounds a cellular exonuclease. **Science**, v. 354, n. 6316, p. 1148-1152, 12 2016. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27934765> >.

ALIOTA, M. T. et al. Correction: Characterization of Lethal Zika Virus Infection in AG129 Mice. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 5, p. e0004750, May 2016. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27214379> >.

ALPERT, S. G.; FERGERSON, J.; NOËL, L. P. Intrauterine West Nile virus: ocular and systemic findings. **Am J Ophthalmol**, v. 136, n. 4, p. 733-5, Oct 2003. ISSN 0002-9394. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14516816> >.

APTE-SENGUPTA, S.; SIROHI, D.; KUHN, R. J. Coupling of replication and assembly in flaviviruses. **Curr Opin Virol**, v. 9, p. 134-42, Dec 2014. ISSN 1879-6265. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25462445> >.

ATKINSON, B. et al. Detection of Zika Virus in Semen. **Emerg Infect Dis**, v. 22, n. 5, p. 940, May 2016. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27088817> >.

BAYER, A. et al. Type III Interferons Produced by Human Placental Trophoblasts Confer Protection against Zika Virus Infection. **Cell Host Microbe**, v. 19, n. 5, p. 705-12, May 2016. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27066743> >.

BHATTACHARYA, D. et al. Phosphorylation of yellow fever virus NS5 alters methyltransferase activity. **Virology**, v. 380, n. 2, p. 276-84, Oct 2008. ISSN 1096-0341. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18757072> >.

BRADLEY, M. P.; NAGAMINE, C. M. Animal Models of Zika Virus. **Comp Med**, v. 67, n. 3, p. 242-252, Jun 2017. ISSN 1532-0820. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28662753> >.

BECKHAM, J. D. et al. Zika Virus as an Emerging Global Pathogen: Neurological Complications of Zika Virus. **JAMA Neurol**, v. 73, n. 7, p. 875-9, Jul 2016. ISSN 2168-6157. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27183312> >.

BIDET, K.; DADLANI, D.; GARCIA-BLANCO, M. A. G3BP1, G3BP2 and CAPRIN1 are required for translation of interferon stimulated mRNAs and are targeted by a dengue virus non-coding RNA. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 7, p. e1004242, Jul 2014. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24992036> >.

CALVET, G. et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **Lancet Infect Dis**, v. 16, n. 6, p. 653-660, Jun 2016. ISSN 1474-4457. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26897108> >.

CARTER, A. M. Animal models of human placentation--a review. **Placenta**, v. 28 Suppl A, p. S41-7, Apr 2007. ISSN 0143-4004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17196252> >

CAO-LORMEAU, V. M. et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1531-1539, Apr 2016. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26948433> >.

CHAN, J. F. et al. Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease. **J Infect**, v. 72, n. 5, p. 507-24, May 2016. ISSN 1532-2742. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26940504> >.

CHATURVEDI, U. C. et al. Transplacental infection with Japanese encephalitis virus. **J Infect Dis**, v. 141, n. 6, p. 712-5, Jun 1980. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6248601> >.

CHARLEY, P. A.; WILUSZ, J. Standing your ground to exoribonucleases: Function of Flavivirus long non-coding RNAs. **Virus Res**, v. 212, p. 70-7, Jan 2016. ISSN 1872-7492. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26368052> >.

CHEN, J. et al. AXL promotes Zika virus infection in astrocytes by antagonizing type I interferon signalling. **Nat Microbiol**, v. 3, n. 3, p. 302-309, Mar 2018. ISSN 2058-5276. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29379210> >.

_____. Zika virus infects renal proximal tubular epithelial cells with prolonged persistency and cytopathic effects. **Emerg Microbes Infect**, v. 6, n. 8, p. e77, Aug 2017. ISSN 2222-1751. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28831192> >.

COMBA, C. et al. Role of inflammatory mediators in patients with recurrent pregnancy loss. **Fertil Steril**, v. 104, n. 6, p. 1467-74.e1, Dec 2015. ISSN 1556-5653. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26368793> >.

CHOTIWAN, N. et al. Rapid and specific detection of Asian- and African-lineage Zika viruses. **Sci Transl Med**, v. 9, n. 388, May 2017. ISSN 1946-6242. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28469032> >.

CHUNG, K. Y. et al. Higher catalytic efficiency of N-7-methylation is responsible for processive N-7 and 2'-O methyltransferase activity in dengue virus. **Virology**, v. 402, n. 1, p. 52-60, Jun 2010. ISSN 1096-0341. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20350738> >.

CHIANG, P. Y.; WU, H. N. The role of surface basic amino acids of dengue virus NS3 helicase in viral RNA replication and enzyme activities. **FEBS Lett**, v. 590, n. 14, p. 2307-20, 07 2016. ISSN 1873-3468. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27273003> >.

CUGOLA, F. R. et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, v. 534, n. 7606, p. 267-71, 06 2016. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27279226> >.

CRUZ-OLIVEIRA, C. et al. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. **FEMS Microbiol Rev**, v. 39, n. 2, p. 155-70, Mar 2015. ISSN 1574-6976. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25725010> >.

DARBELLAY, J. et al. Neonatal pigs are susceptible to experimental Zika virus infection. **Emerg Microbes Infect**, v. 6, n. 2, p. e6, Feb 2017. ISSN 2222-1751. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28196970> >.

DUFFY, M. R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **N Engl J Med**, v. 360, n. 24, p. 2536-43, Jun 2009. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19516034> >.

DUDLEY, D. M. et al. A rhesus macaque model of Asian-lineage Zika virus infection. **Nat Commun**, v. 7, p. 12204, Jun 2016. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27352279> >.

EL COSTA, H. et al. ZIKA virus reveals broad tissue and cell tropism during the first trimester of pregnancy. **Sci Rep**, v. 6, p. 35296, Oct 2016. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27759009> >.

ENFISSI, A. et al. Zika virus genome from the Americas. **Lancet**, v. 387, n. 10015, p. 227-8, Jan 2016. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26775124> >.

FAGBAMI, A. H. Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. **J Hyg (Lond)**, v. 83, n. 2, p. 213-9, Oct 1979. ISSN 0022-1724. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/489960> >

FARIA, N. R. et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**, v. 352, n. 6283, p. 345-349, Apr 2016. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27013429> >.

FAUCI, A. S.; MORENS, D. M. Zika Virus in the Americas--Yet Another Arbovirus Threat. **N Engl J Med**, v. 374, n. 7, p. 601-4, Feb 2016. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26761185> >.

FRANK, C. et al. Sexual transmission of Zika virus in Germany, April 2016. **Euro Surveill**, v. 21, n. 23, Jun 2016. ISSN 1560-7917. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27311329> >.

FERNANDEZ-GARCIA, M. D. et al. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. **Cell Host Microbe**, v. 5, n. 4, p. 318-28, Apr 2009. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19380111> >.

FOY, B. D. et al. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. **Emerg Infect Dis**, v. 17, n. 5, p. 880-2, May 2011. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21529401> >.

GARDNER, C. L.; RYMAN, K. D. Yellow fever: a reemerging threat. **Clin Lab Med**, v. 30, n. 1, p. 237-60, Mar 2010. ISSN 1557-9832. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20513550> >.

GOKHALE, N. S. et al. N6-Methyladenosine in Flaviviridae Viral RNA Genomes Regulates Infection. **Cell Host Microbe**, v. 20, n. 5, p. 654-665, Nov 2016. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27773535> >.

GÖERTZ, G. P. et al. Functional RNA during Zika virus infection. **Virus Res**, Aug 2017. ISSN 1872-7492. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28864425> >.

GOVERO, J. et al. Zika virus infection damages the testes in mice. **Nature**, v. 540, n. 7633, p. 438-442, 12 2016. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27798603> >.

GOO, L. et al. Zika Virus Is Not Uniquely Stable at Physiological Temperatures Compared to Other Flaviviruses. **MBio**, v. 7, n. 5, 09 2016. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27601578> >.

GOODFELLOW, F. T. et al. Zika Virus Induced Mortality and Microcephaly in Chicken Embryos. **Stem Cells Dev**, v. 25, n. 22, p. 1691-1697, 11 2016. ISSN 1557-8534. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27627457> >.

GROVE, J.; MARSH, M. The cell biology of receptor-mediated virus entry. **J Cell Biol**, v. 195, n. 7, p. 1071-82, Dec 2011. ISSN 1540-8140. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22123832> >.

HADDOW, A. D. et al. Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 2, p. e1477, 2012. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22389730> >.

HENNESSEY, M. J. et al. Zika Virus Disease in Travelers Returning to the United States, 2010-2014. **Am J Trop Med Hyg**, v. 95, n. 1, p. 212-5, Jul 2016. ISSN 1476-1645. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27139440> >.

HIDARI, K. I.; SUZUKI, T. Dengue virus receptor. **Trop Med Health**, v. 39, n. 4 Suppl, p. 37-43, Dec 2011. ISSN 1349-4147. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22500135> >.

JAGGER, B. W. et al. Gestational Stage and IFN- λ Signaling Regulate ZIKV Infection In Utero. **Cell Host Microbe**, v. 22, n. 3, p. 366-376.e3, Sep 2017. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28910635> >

KAUFMANN, B.; ROSSMANN, M. G. Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry. **Microbes Infect**, v. 13, n. 1, p. 1-9, Jan 2011. ISSN 1769-714X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20869460> >.

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. **Virology**, v. 14, n. 1, p. 82, Apr 2017. ISSN 1743-422X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28420392> >.

KLEMA, V. J.; PADMANABHAN, R.; CHOI, K. H. Flaviviral Replication Complex: Coordination between RNA Synthesis and 5'-RNA Capping. **Viruses**, v. 7, n. 8, p. 4640-56, Aug 2015. ISSN 1999-4915. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26287232> >.

KIM, J. K. et al. Profiling of viral proteins expressed from the genomic RNA of Japanese encephalitis virus using a panel of 15 region-specific polyclonal rabbit antisera: implications for viral gene expression. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0124318, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25915765> >.

KOSTYUCHENKO, V. A. et al. Structure of the thermally stable Zika virus. **Nature**, v. 533, n. 7603, p. 425-8, 05 2016. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27093288> >.

KUMAR, A. et al. Human Sertoli cells support high levels of Zika virus replication and persistence. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 5477, Apr 2018. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29615760> >.

LANCIOTTI, R. S. et al. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. **Emerg Infect Dis**, v. 13, n. 5, p. 764-7, May 2007. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17553261> >.

LAZEAR, H. M. et al. A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. **Cell Host Microbe**, v. 19, n. 5, p. 720-30, May 2016. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27066744> >.

LEVY, D. E.; MARIÉ, I. J.; DURBIN, J. E. Induction and function of type I and III interferon in response to viral infection. **Curr Opin Virol**, v. 1, n. 6, p. 476-86, Dec 2011. ISSN 1879-6265. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22323926> >.

LICHINCHI, G. et al. Dynamics of Human and Viral RNA Methylation during Zika Virus Infection. **Cell Host Microbe**, v. 20, n. 5, p. 666-673, Nov 2016. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27773536> >.

Lindenbach BD, Murray CL, Theil H-J, Rice CM. In: Field's Virology: Flaviviridae. 6 ed. Knipe D, Howley P, editors. Lippincott Williams & Wilkins; 2013. pp. 712-46.
LUO, D.; VASUDEVAN, S. G.; LESCAR, J. The flavivirus NS2B-NS3 protease-helicase as a target for antiviral drug development. **Antiviral Res**, v. 118, p. 148-58, Jun 2015. ISSN 1872-9096. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25842996> >.

LUCEY, D.; CUMMINS, H.; SHOLTS, S. Congenital Zika Syndrome in 2017. **JAMA**, v. 317, n. 13, p. 1368-1369, 04 2017. ISSN 1538-3598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28384812> >.

MALKKI, H. CNS infections: Mouse studies confirm the link between Zika virus infection and microcephaly. **Nat Rev Neurol**, v. 12, n. 7, p. 369, Jul 2016. ISSN 1759-4766. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27231186> >.

MACNAMARA, F. N. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 48, n. 2, p. 139-45, Mar 1954. ISSN 0035-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13157159> >.

MARCONDES, C. B.; XIMENES, M. E. F. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by Aedes (Stegomyia) mosquitoes. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 49, n. 1, p. 4-10, Feb 2016. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26689277> >.

MEERTENS, L. et al. Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. **Cell Rep**, v. 18, n. 2, p. 324-333, 01 2017. ISSN 2211-1247. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28076778> >.

MINER, J. J. et al. Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. **Cell**, v. 165, n. 5, p. 1081-1091, May 2016. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27180225> >.

_____. Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. **Cell**, v. 165, n. 5, p. 1081-1091, May 2016b. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27180225> >

MIORIN, L. et al. Antagonism of type I interferon by flaviviruses. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 492, n. 4, p. 587-596, 10 2017. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28576494> >.

MIRANDA-FILHO, D. E. B. et al. Initial Description of the Presumed Congenital Zika Syndrome. **Am J Public Health**, v. 106, n. 4, p. 598-600, Apr 2016. ISSN 1541-0048. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26959258> >.

MOLLER-TANK, S.; MAURY, W. Phosphatidylserine receptors: enhancers of enveloped virus entry and infection. **Virology**, v. 468-470, p. 565-580, Nov 2014. ISSN 1096-0341. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25277499> >.

MULLER, D. A.; YOUNG, P. R. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. **Antiviral Res**, v. 98, n. 2, p. 192-208, May 2013. ISSN 1872-9096. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23523765> >.

MUSSO, D.; CAO-LORMEAU, V. M.; GUBLER, D. J. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? **Lancet**, v. 386, n. 9990, p. 243-4, Jul 2015. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26194519> >.

MUSSO, D.; NILLES, E. J.; CAO-LORMEAU, V. M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clin Microbiol Infect**, v. 20, n. 10, p. O595-6, Oct 2014. ISSN 1469-0691. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24909208> >.

MUÑOZ-JORDÁN, J. L.; FREDERICKSEN, B. L. How flaviviruses activate and suppress the interferon response. **Viruses**, v. 2, n. 2, p. 676-91, Feb 2010. ISSN 1999-4915. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21994652> >.

NAYAK, S. et al. Pathogenesis and Molecular Mechanisms of Zika Virus. **Semin Reprod Med**, v. 34, n. 5, p. 266-272, 09 2016. ISSN 1526-4564. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27612156> >.

NOWAKOWSKI, T. J. et al. Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Neural Stem Cells. **Cell Stem Cell**, v. 18, n. 5, p. 591-6, 05 2016. ISSN 1875-9777. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27038591> >.

NG, W. C. et al. The 5' and 3' Untranslated Regions of the Flaviviral Genome. **Viruses**, v. 9, n. 6, 06 2017. ISSN 1999-4915. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28587300> >.

ODENDALL, C.; KAGAN, J. C. The unique regulation and functions of type III interferons in antiviral immunity. **Curr Opin Virol**, v. 12, p. 47-52, Jun 2015. ISSN 1879-6265. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25771505> >.

PAHO/WHO PAHOWHO. Zika Suspected and Confirmed Cases Reported by Countries and Territories in the Americas Cumulative Cases, 2015-2018. (2018). Available from: www.paho.org. Updated as of 04 January 2018.

PAPA, M. P. et al. Zika Virus Infects, Activates, and Crosses Brain Microvascular Endothelial Cells, without Barrier Disruption. **Front Microbiol**, v. 8, p. 2557, 2017. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29312238> >.

PANCHAUD, A. et al. Emerging Role of Zika Virus in Adverse Fetal and Neonatal Outcomes. **Clin Microbiol Rev**, v. 29, n. 3, p. 659-94, Jul 2016. ISSN 1098-6618. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27281741> >.

PIJLMAN, G. P. Flavivirus RNAi suppression: decoding non-coding RNA. **Curr Opin Virol**, v. 7, p. 55-60, Aug 2014. ISSN 1879-6265. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24793201> >.

POLI, L. et al. [Materno-fetal dengue. Apropos of 5 cases observed during the epidemic in Tahiti (1989)]. **Bull Soc Pathol Exot**, v. 84, n. 5 Pt 5, p. 513-21, 1991. ISSN 0037-9085. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1819401> >.

PONPUAK, M. et al. Secretory autophagy. **Curr Opin Cell Biol**, v. 35, p. 106-16, Aug 2015. ISSN 1879-0410. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25988755> >.

REY, F. A.; STIASNY, K.; HEINZ, F. X. Flavivirus structural heterogeneity: implications for cell entry. **Curr Opin Virol**, v. 24, p. 132-139, 06 2017. ISSN 1879-6265. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28683393> >.

ROSSI, S. L. et al. Characterization of a Novel Murine Model to Study Zika Virus. **Am J Trop Med Hyg**, v. 94, n. 6, p. 1362-9, Jun 2016. ISSN 1476-1645. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27022155> >.

ROBY, J. A., FUNK, A., KHROMYKH, A. A. (2011). *Flavivirus replication and assembly*. Molecular virology and control of flaviviruses. edited by Pei-Yong Shi. Norfolk, United Kingdom: Caister Academic Press.21-49.

RUSSO, F. B.; JUNGSMANN, P.; BELTRÃO-BRAGA, P. C. B. Zika infection and the development of neurological defects. **Cell Microbiol**, v. 19, n. 6, Jun 2017. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28370966> >.

SAVIDIS, G. et al. The IFITMs Inhibit Zika Virus Replication. **Cell Rep**, v. 15, n. 11, p. 2323-30, 06 2016. ISSN 2211-1247. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27268505> >.

SAIZ, J. C. et al. Zika Virus: the Latest Newcomer. **Front Microbiol**, v. 7, p. 496, 2016. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27148186> >.

SAMPATH, A.; PADMANABHAN, R. Molecular targets for flavivirus drug discovery. **Antiviral Res**, v. 81, n. 1, p. 6-15, Jan 2009. ISSN 1872-9096. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18796313> >.

SLAVOV, S. N. et al. Overview of Zika virus (ZIKV) infection in regards to the Brazilian epidemic. **Braz J Med Biol Res**, v. 49, n. 5, p. e5420, 2016. ISSN 1414-431X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27143174> >.

SIROHI, D. et al. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. **Science**, v. 352, n. 6284, p. 467-70, Apr 2016. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27033547> >.

SOTELO, J. R. et al. Persistence of Zika Virus in Breast Milk after Infection in Late Stage of Pregnancy. **Emerg Infect Dis**, v. 23, n. 5, p. 856-857, May 2017. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28192072> >.

SCHNAIDER, Taylor Brandão e SOUZA, Cláudio de. Aspectos éticos da experimentação animal. *Rev. Bras. Anestesiol.* [online]. 2003, vol.53, n.2, pp.278-285. ISSN 0034-7094. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-70942003000200014>.

TABATA, T. et al. Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. **Cell Host Microbe**, v. 20, n. 2, p. 155-66, Aug 2016. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27443522> >.

TERZIAN, A. C. B. et al. Long-Term Viruria in Zika Virus-Infected Pregnant Women, Brazil, 2016. **Emerg Infect Dis**, v. 23, n. 11, p. 1891-1893, Nov 2017. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29048293> >.

TIAN, Y. S. et al. Dengue Virus and Its Inhibitors: A Brief Review. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 66, n. 3, p. 191-206, 2018. ISSN 1347-5223. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29491253> >.

UÇAR, I. et al. The potential teratogenic effects of interferon beta-1a and interferon beta-1b on in vitro embryonic development. **Folia Morphol (Warsz)**, v. 75, n. 2, p. 257-263, 2016. ISSN 0015-5659. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26711647> >.

VOROU, R. Zika virus, vectors, reservoirs, amplifying hosts, and their potential to spread worldwide: what we know and what we should investigate urgently. **Int J Infect Dis**, v. 48, p. 85-90, Jul 2016. ISSN 1878-3511. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27208633> >.

WEAVER, S. C.; LECUIT, M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. **N Engl J Med**, v. 372, n. 13, p. 1231-9, Mar 2015. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25806915> >.

WIKAN, N.; SMITH, D. R. Zika virus: history of a newly emerging arbovirus. **Lancet Infect Dis**, v. 16, n. 7, p. e119-e126, Jul 2016. ISSN 1474-4457. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27282424> >.

WINKLER, C. W. et al. Sexual and Vertical Transmission of Zika Virus in anti-interferon receptor-treated Rag1-deficient mice. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 7176, Aug 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28775298> >.

WU, K. Y. et al. Vertical transmission of Zika virus targeting the radial glial cells affects cortex development of offspring mice. **Cell Res**, v. 26, n. 6, p. 645-54, Jun 2016. ISSN 1748-7838. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27174054> >.

WU, R. H. et al. Mutagenesis of Dengue Virus Protein NS2A Revealed a Novel Domain Responsible for Virus-Induced Cytopathic Effect and Interactions between NS2A and NS2B Transmembrane Segments. **J Virol**, v. 91, n. 12, 06 2017. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28381578> >.

WHO, 2016. Prevenção da transmissão do vírus Zika por via sexual. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204421/WHO_ZIKV_MOC_16.1_por.pdf;jsessionid=18BB56C9AF0B156043906F18A27A1E91?sequence=5> Acesso em: 23 março de 2018.

XIE, X. et al. Targeting dengue virus NS4B protein for drug discovery. **Antiviral Res**, v. 118, p. 39-45, Jun 2015. ISSN 1872-9096. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25796970> >.

YE, J. et al. Japanese Encephalitis Virus NS5 Inhibits Type I Interferon (IFN) Production by Blocking the Nuclear Translocation of IFN Regulatory Factor 3 and NF- κ B. **J Virol**, v. 91, n. 8, 04 2017. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28179530> >.

YOCKEY, L. J. et al. Type I interferons instigate fetal demise after Zika virus infection. **Sci Immunol**, v. 3, n. 19, Jan 2018. ISSN 2470-9468. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29305462> >.

YUI, J. et al. Cytotoxicity of tumour necrosis factor-alpha and gamma-interferon against primary human placental trophoblasts. **Placenta**, v. 15, n. 8, p. 819-35, Dec 1994. ISSN 0143-4004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7886023> >.

YUN, S. I.; LEE, Y. M. Zika virus: An emerging flavivirus. **J Microbiol**, v. 55, n. 3, p. 204-219, Mar 2017. ISSN 1976-3794. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28243937> >.

ZHANG, H. L. et al. West Nile Virus NS1 Antagonizes Interferon Beta Production by Targeting RIG-I and MDA5. **J Virol**, v. 91, n. 18, 09 2017. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28659477> >.

ZHANG, L. et al. Interferon gamma is involved in apoptosis of trophoblast cells at the maternal-fetal interface following Toxoplasma gondii infection. **Int J Infect Dis**, v. 30, p. 10-6, Jan 2015. ISSN 1878-3511. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25462175> >.

ZHU, Z. et al. Comparative genomic analysis of pre-epidemic and epidemic Zika virus strains for virological factors potentially associated with the rapidly expanding epidemic. **Emerg Microbes Infect**, v. 5, p. e22, Mar 2016. ISSN 2222-1751. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26980239> >.

Capítulo II

Artigo Científico (Archives Virology)

Zika Virus-Infected Human Full-Term Placental Explants Display Pro-Inflammatory Responses and Undergo Apoptosis

Milene Rocha Ribeiro,^{1,6} Jusciele Brogin Moreli,² Rafael Elias Marques,³ Michelle Premazzi Papa,⁴ Lana Monteiro Meuren,⁴ Paula Rahal,¹ Luciana Barros de Arruda,⁴ Antonio Helio Oliani,⁶ Denise Cristina Mós Vaz Oliani,⁶ Sonia Maria Oliani,¹ Aarthi Narayanan,⁵ Maurício Lacerda Nogueira.⁶

¹Departament of Biology, School of Biosciences, Humanities, and the Exact Sciences; São Paulo State University (UNESP), São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

²Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo, São Paulo, Brazil.

³Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), National Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Campinas, São Paulo, Brazil.

⁴Paulo de Góes Department of Microbiology, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ).

⁵George Mason University, Virginia, United States of America.

⁶Virology Research Laboratory, São José do Rio Preto School of Medicine (FAMERP), São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

Running title: Zika Virus Infection of Human Placental Explants

Corresponding Author:

Dr. Maurício Lacerda Nogueira

Virology Research Laboratory

Department of Dermatological, Infectious, and Parasitic Diseases

São José do Rio Preto School of Medicine (FAMERP)

+55

(17)

3201-5731

mnoqueira@famerp.br

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) is a flavivirus that has been highly correlated with the development of neurological issues and other malformations in newborns and stillborn fetuses after congenital infection. This association is supported by the presence of ZIKV in the fetal brain and amniotic fluid, suggesting that infection of the placental barrier is a critical step for infection of the fetus with ZIKV *in utero*. Therefore, relevant models to investigate the interaction between ZIKV and placental tissues are essential for understanding the pathogenesis of Zika syndrome. In this report, we demonstrate that explant tissue from full-term human placentas sustains a productive ZIKV infection, though the results depend on the strain. Viral infection was associated with the expression of pro-inflammatory cytokines and apoptosis of the infected tissue, findings which confirm that placental explants are targets of ZIKV replication. In conclusion, we propose that human placental explants are as a useful model for studying ZIKV infection *ex vivo*.

Keywords

Zika virus; Placental explant tissue; productive infection; cytokine expression; TUNEL assay; apoptosis.

INTRODUCTION

Zika Virus (ZIKV), a member of the Flaviviridae family, is an enveloped, single-strand RNA virus that has been the causative agent of major outbreaks in the Americas (2015) (Wikan e Smith, 2016; Rabaan *et al.*, 2017). The viral genome has a typical flavivirus architecture, with approximately 11 kb in length. The virus was first isolated from a Rhesus Macaque in 1947 in the Zika forest in Uganda; however, the infection was poorly investigated until recently, when numerous infections were reported in more than 60 countries and territories around the world. Major outbreaks have been recorded on the Yap Islands (2007), in French Polynesia (2013), and in Brazil (2015).

The virus is primarily transmitted by *Aedes aegypti* mosquitoes, and humans are considered to be amplification hosts, whereas nonhuman primates may be involved in maintenance of the virus in Africa (Vorou, 2016). In addition, the virus is unique in relation to other flaviviruses such as Dengue Virus (DENV): it may be transmitted non-traditionally, including sexual and maternal-to-fetal routes (Frank *et al.*, 2016; Fréour *et al.*, 2016; Turmel *et al.*, 2016; Winkler *et al.*, 2017).

Most of the cases associated with ZIKV infection are either asymptomatic or present mild symptoms such as fever, rash, joint pain, and conjunctivitis. Myalgia and headaches have also been reported. However, in the recent outbreaks, ZIKV infection was highly correlated with neurological

manifestations, particularly in developing fetuses upon congenital infection (Beckham *et al.*, 2016; Carteaux *et al.*, 2016; Melo *et al.*, 2016). In fact, infection of pregnant woman has been associated with miscarriage, fetal abnormalities, microcephaly, and other neurological diseases in newborns (Malkki, 2016; Panchaud *et al.*, 2016). The virus has been isolated from multiple bodily fluids from infected individuals, including serum, urine, saliva, and semen (Musso e Gubler, 2016). Importantly, the virus has also been detected in amniotic fluid and in the brains of microcephalic newborns and fetuses in cases of stillbirth (Calvet *et al.*, 2016a; Mlakar *et al.*, 2016), demonstrating that ZIKV crosses the placenta through an unknown mechanism of action.

Recent studies using experimental mouse models have also indicated that the virus might cross the placental barrier, leading to congenital ZIKV transmission. Systemic infection of pregnant mice resulted in abnormal brain development and microcephaly in the offspring, which were attributed to viral neurotropism (Cugola *et al.*, 2016; Miner *et al.*, 2016b; Wu *et al.*, 2016). Infection of trophoblasts and endothelial cells in the placentas of ZIKV-infected mice and nonhuman primates have also been reported (Adams Waldorf *et al.*, 2016; Miner *et al.*, 2016b; Pantoja *et al.*, 2017).

However, most animal models used to study ZIKV infection are deficient in the expression of type I or type I and type II interferon receptors (A129 and AG129, respectively) (Aliota *et al.*, 2016; Miner *et al.*, 2016b; Rossi *et al.*, 2016). Mice that lack components of innate immune responses, including *Mavs*^{-/-}, *Irf3*^{-/-}, *Irf3*^{-/-} *Irf5*^{-/-} *Irf7*^{-/-}, have also shown susceptibility to ZIKV infection (Lazear

et al., 2016). Although these models are useful for evaluating the efficacy of vaccine candidates and therapeutics, they may not represent the actual effects associated with trans-placental transmission of the virus in immunocompetent individuals, or the conditions in the placenta that favor viral multiplication, including possible local inflammation.

A critical unmet need is a model that can be used to quickly, quantitatively, and effectively screen for functionally relevant countermeasures that may protect the fetus from intrauterine transmission of ZIKV. In this report, we demonstrate that placental explants, obtained from full-term placental tissue, both support and are affected by ZIKV infection. This tissue may be useful model for such experimentation and for the development of treatments against ZIKV infections.

MATERIALS AND METHODS

Cell Lines and Viruses

Vero cells were cultivated in Eagle's minimum essential medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 units/mL of penicillin, and 100 µg/mL of streptomycin at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. ZIKV-BR (Genbank accession number KU497555; kindly provided by Pedro Vasconcelos, Evandro Chagas Institute, FIOCRUZ, Pará, Brazil) was isolated from a mild case of ZIKV in the state of Paraíba, Brazil, and it was distributed as part of the Zika FAPESP Network after four passages in C6/36 cells (Faria *et al.*, 2016). The DENV-2 strain used was New Guinea C (NGC) (GenBank accession number AF038403). The viruses were propagated and titrated using

the Vero cells. Viral stock was aliquoted from 100 uL and stored at -80°C. Titers were determined and titrated using standard TCID₅₀ assay.

Infections in Human Placental Explant Cultures

Normal human placenta tissues were obtained from full-term elective cesarean deliveries in cases of non-labor after 38 to 40 weeks of gestation, (n=10) from the Children's and Maternity Hospital of São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil after approval from local research ethics committee. Placentas were processed within 15 min of delivery. Chorionic villi were dissected into 5 mm sections, and tissues were washed extensively with PBS (1x). Explants were cultured on traditional tissue culture plates in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Cultiab) combined with Ham's F-12 Nutrient Mixture (HAMF-12; Thermo Fisher) and supplemented with 10% FBS, GIBCO, 1% penicillin-streptomycin, and 100 mg/mL gentamycin. Cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Twenty-four hours after plating, samples were infected with 1×10^4 TCD₅₀ with ZIKV-BR and DENV2. The culture was incubated for 4 hours to allow for virus adsorption. The explants were then washed three times with PBS (1X) for complete removal of the inoculum. The explants were then maintained in DMEM/HAMF-12 with 2% FBS. Culture supernatants from infected and non-infected explants were collected at 0, 3, 6, 12, 24, 72 and 120 hours post infection (hpi) without the addition of fresh media or washings. Explants were then collected to determine total RNA and were fixed in 4% paraformaldehyde for histology and immunohistochemistry.

The culture media were collected to perform plaque assays and to quantify β -hCG through the use of electrochemiluminescence (Roche Hitachi, Cobas® e 411). Some sample tissues that had been cultured for 24 hours also were treated with neutralizing anti-TNF RII/TNFRSF1B antibody (100 ng/mL, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) or TLR-3 ligand polyinosinic:polycytidylic acid (poly (I:C)) (50 μ g/mL; Sigma-Aldrich) for 24 hours.

Viral Quantification

ZIKV RNA quantification from culture supernatants was performed using a TaqMan-based qRT-PCR assay (GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System, REF AG120), as described previously (Lanciotti *et al.*, 2008). Analysis of DENV2 RNA was performed using a Super Script III Platinum Syber Green One Step RT-qPCR Kit (REF 1136-059) and the primers described by Chutinimitkul and colleagues (Chutinimitkul *et al.*, 2005). The primer and probe sequences are described in supplementary Table A1.

Plaque Assay

Vero cells were plated at a density of 5×10^5 cells per well in a 6-well plate and cultured for 24 hours at 37°C under 5% CO₂. Serial dilutions of supernatant from explant cultures (24 and 72 hpi) were added to each well for 1 hour of incubation. After the medium was removed, infected monolayers were covered with 1.5% carboxymethylcellulose (CMC)/MEM with 2% FSB using a 1:1 ratio.

Plaque foci were detected on five days after fixation with 10% formalin solution and staining with 2% crystal violet.

Histological Analyses

Infected placental tissue sections and their uninfected controls were fixed in 4% buffered formalin for 24 hours, dehydrated in graded ethanol, and embedded in paraffin for histopathological analysis. The samples were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and analyzed using a high-power objective (20x) on an Axioskop 2-Mot Plus Zeiss microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany). To quantify the nuclear fragmentation, ten random photos were taken of experiments performed in triplicate, and the amount of karyorrhexis was counted for each photo. Mean +/- standard deviation per field is shown.

Immunohistochemistry

ZIKV infection and caspase3 activation were analyzed in the placental explants using immunohistochemistry. Sections of infected placental tissue and the uninfected controls were collected 72 and 120 hpi. Some samples were also treated with neutralizing anti- TNF RII/TNFRSF1B antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN) and harvested at 72 hpi. Serial 3 μ m-thick tissue sections were deparaffinized and rehydrated prior to antigen retrieval in citrate buffer at a pH of 6.0. Endogenous peroxide activity was blocked with 3% hydrogen peroxide for 30 minutes, followed by blocking with 10% bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich, Missouri, USA) in tris buffer saline (TBS) for 2 hours. The

slides were incubated with primary mouse antibody against flavivirus E-protein (4G2) at 1:100 or anti-caspase 3 (Abcam, cat number ab2302) at 1:200 or anti-cytokeratin 7 (Dako) at 1:250 or anti-vimentin (Dako) at 1:150 in 10% TBS-BSA for 1 hour at 37°C, which were applied in independent trials. After the washing step, sections were incubated with a secondary antibody (HRP-conjugated anti-mouse or anti-rabbit antibody; Abcan). Positive staining was detected using 3,3'-diaminobenzidine (DAB substrate; Invitrogen, USA). Finally, sections were counterstained with H&E (hematoxylin from InlabConfiança and eosin from AnalytiCals). A negative reaction control was run in the absence of primary antibodies. Analysis was performed using an Axioskop 2-Mot Plus Microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany), using AxioVision software for densitometric and quantitative analysis. The experiments were performed with samples from tree individual donors, each in triplicate, and ten fields were quantified in each section. Densitometric analysis was used to determine caspase 3 and 4G2 intensity in sections of placental tissue (40x) on an arbitrary scale from 0 to 255, and the data were expressed as mean \pm standard deviation (Brey *et al.*, 2003).

Cytokine Gene Expression Analysis

RNA from virus-infected explants and uninfected controls was extracted using Trizol according to the manufacturer's instructions (Life Technologies). Likewise, RNA from explanted samples were treated in the absence or presence of 50 μ g/m of viral dsRNA analog known as poly (I:C), for 24 hours. Cytokine gene expression analyses were performed using a Super Script III

Platinum Syber Green One Step qRT-PCR Kit (Invitrogen) (REF 1136-059). The primer sequences for the IL-6, IL-10, IL-1 β , TNF- α , INF- β , INF- γ , INF- λ 1 and INF- λ 4 cytokines are listed in the supplementary Table A2. A comparative CT method was used to quantify gene expression levels based on GAPDH Ct values for normalization.

TUNEL Assay

Detection of nuclear DNA fragmentation as a morphological marker of the apoptosis process in histological sections was performed using the TUNEL assay. The assay was performed using the In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red. After 3 days of infection, 3 mm infected tissue sections and uninfected controls were deparaffinized, hydrated, and rinsed with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), followed by blocking with 3% BSA and 20% FBS. TUNEL reaction mixture (TdT enzyme fluorescein-labeled nucleotide mix) was added, and the sections were incubated for 60 minutes at 37 $^{\circ}$ C. For the positive reaction control, the sections were treated with 3u/mL DNase I for 10 minutes at room temperature. Quantitative analyses were performed using the Image-Pro $^{\circledR}$ Plus image analysis software, and fluorescent images of TUNEL-positive cells were captured using an Olympus BX53 microscope system at 40x in red channel detection in the range of 570 to 620 nm. Tests were performed in duplicate, and images of three random fields were acquired from each slide to calculate mean +/- standard deviation.

Data Analysis

Data were analyzed using the GraphPad Prism software (Version 6; GraphPad, CA). Results are expressed as mean +/- standard deviation. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by the non-parametric Kruskal-Wallis test (unpaired data) or the Bonferroni correction. Data from a minimum of three independent experiments are presented. Significance was established as $p < 0,05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Placental explants support ZIKV infection

Our goal was to investigate whether explants of human placental tissue are a valuable model for studying ZIKV infection *ex vivo*. To that end, normal full-term placental tissues were obtained following cesarean section. Chorionic villi were dissected, and the explants (5 mm) were infected with ZIKV-BR or Dengue Virus 2 (DENV2) for comparison. Immunostaining of the tissues 72 hpi with the anti-flavivirus antibody 4G2 demonstrated that the tissues were infected by both viruses (Figures 1a-d). To further confirm that placental explants would support a progressive ZIKV infection, culture supernatants from these infected explants were obtained at 0, 3, 6, 12, 24, 72 and 120 hpi, and virus RNA levels were analyzed by RT-qPCR (Figure 1e). We observed a progressive increase in ZIKV RNA load as early as 12 hpi, with a peak at 72 hpi. DENV 2 RNA was also detected in placental supernatants until 24 hpi, but RNA levels did not increase at the subsequent time points. Culture supernatants from infected tissues

collected at 0 hpi exhibited viral load $<10^1$ and this value was subtracted from subsequent times. While uninfected tissues exhibited no viral loads when measured by RT-qPCR.

The release of infectious virus particles at different time points after infection was also evaluated by plaque assay. Accordingly, we observed increased levels of ZIKV plaque-forming units (PFU) in the supernatants of explanted tissues, whereas DENV2 PFU levels decreased at later time points (Figure 1f).

H&E staining and histological analysis demonstrated that placental tissues infected with ZIKV-BR present signs of cellular injury, in contrast to uninfected ones (Figure 2a-c; additional images in supplementary information and figure A3). The presence of trophoblasts in these sections was confirmed by the high expression of the cytokeratin-7 epithelial cell marker (Figure 2d-f), as well as by the absence of vimentin expression (mesenchymal cell marker) (Figures g-i). In addition, the quantification of nuclear fragmentation revealed a higher amount of karyorrhexis in ZIKV-BR infection than in uninfected and DENV-infected tissues, a finding which suggests that viral replication may, indeed, be associated with tissue damage (Figure 2j).

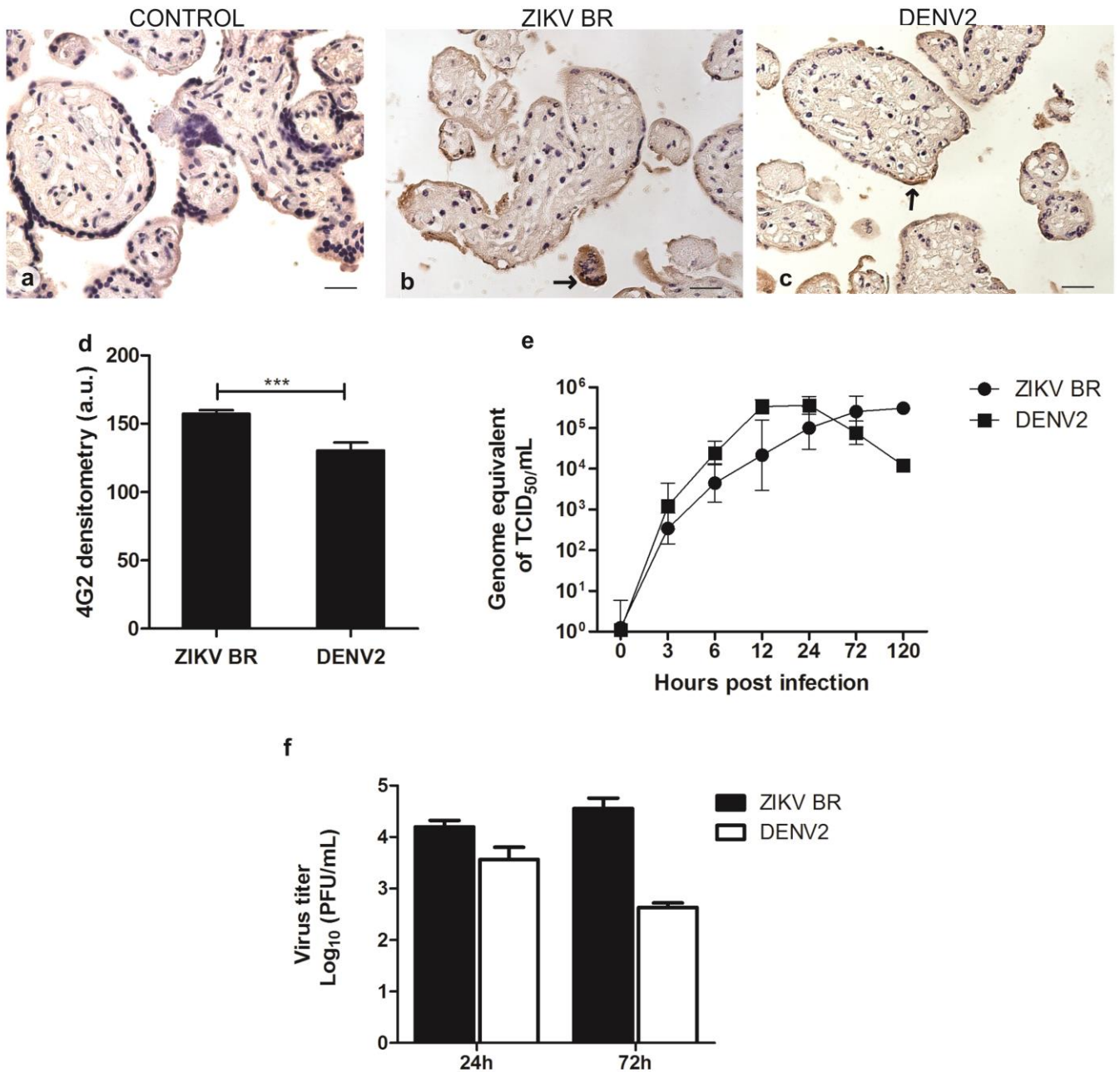


Fig.1 ZIKV productively infects human placental tissue explants. Placental explants were left uninfected (control), panel (a) or infected with ZIKV (b) or DENV (c) at 1×10^4 TCID₅₀. After 72 hpi, immunohistochemistry staining was

performed using the anti-flavivirus 4G2 antibody. Black insets show the details of immunohistochemistry staining. Quantification of 4G2 staining using densitometry in arbitrary units (a.u) was performed using an Axioskop 2-Mot Plus Microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany). The AxioVision software was used for qualitative analysis. Densitometry analysis of the reaction negative control and of the uninfected samples consistently showed undetectable values. The data were analyzed using one-way ANOVA followed by the Kruskal-Wallis test; *** $p < 0.001$, panel (d). Full-term placental explants were left uninfected (controls) or were infected with ZIKV-BR or DENV2 viruses (1×10^4 TCID₅₀), and the supernatants were harvested at the time points indicated. RNA extraction and qRT-PCR were performed using specific ZIKV and DENV primers, as described in the Materials and Methods section (e). The titers of infectious particles in the supernatants were evaluated by plaque assay in Vero cells (f). All of the data were obtained from experiments performed in triplicate and are represented as mean +/- standard deviation. Scale bar: 10 μ m

Other studies have demonstrated that placental explant cultures secrete hCG during the process of explant re-epithelization (Kurman *et al.*, 1984; Vićovac *et al.*, 1995; Helige *et al.*, 2008; Moser *et al.*, 2010). We evaluated whether ZIKV infection would affect the secretion of b-hCG, a marker of syncytiotrophoblast (SCT) renewal and viability (Figure 2d-i,k) (Itinteang *et al.*, 2011). ZIKV-infected tissues exhibited lower b-hCG secretion in the culture than the uninfected control (Figure 2k), a result which suggests lower SCT recovery

upon ZIKV infection. Meanwhile, DENV-infected tissues exhibited lower b-hCG secretion after 48 h, thus reducing SCT viability. However, SCTs were found to increase secretion of b-hCG 72h after infection, suggesting improved SCT recovery. These findings are in accordance with previous studies on experimental mouse models, the results of which have demonstrated the infection of fetal and maternal placental tissues (Miner *et al.*, 2016b). These and other experimental models have also demonstrated that ZIKV infects various primary human placental cell types and chorionic villus explants, suggesting placental and paraplacental virus transmission routes (Quicke *et al.*, 2016; Tabata *et al.*, 2016). Previous studies have suggested that both cytotrophoblasts (CTBs) and SCTs from chorionic villi exhibited E-protein expression upon ZIKV infection; however, only CTBs expressed nonstructural proteins (NS3) (Tabata *et al.*, 2016).

In addition, trophoblasts' resistance to ZIKV replication has been proposed in a study showing that different trophoblast-derived cell lines were permissive to ZIKV, but human primary trophoblasts exhibited low viral RNA levels when compared to other cell types (Bayer *et al.*, 2016). On the other hand, both macrophages and CTBs obtained from the same tissues were found to be susceptible to ZIKV (Quicke *et al.*, 2016).

An experimental model involving pregnant rhesus monkeys revealed prolonged viremia compared to non-pregnant animals, results which provide important data on ZIKV infection in the first and third trimesters.

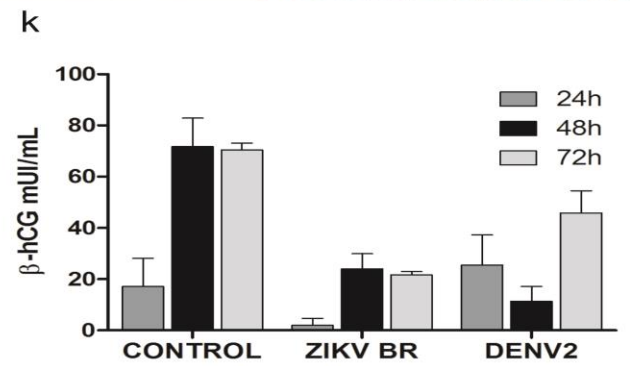
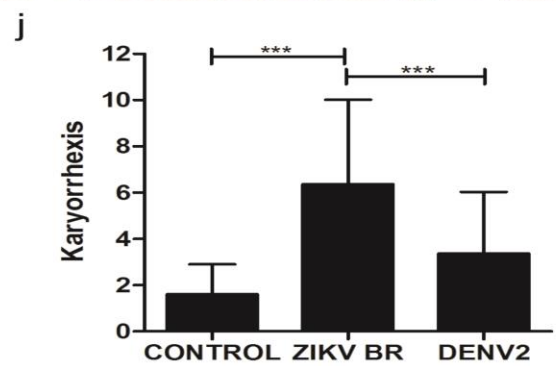
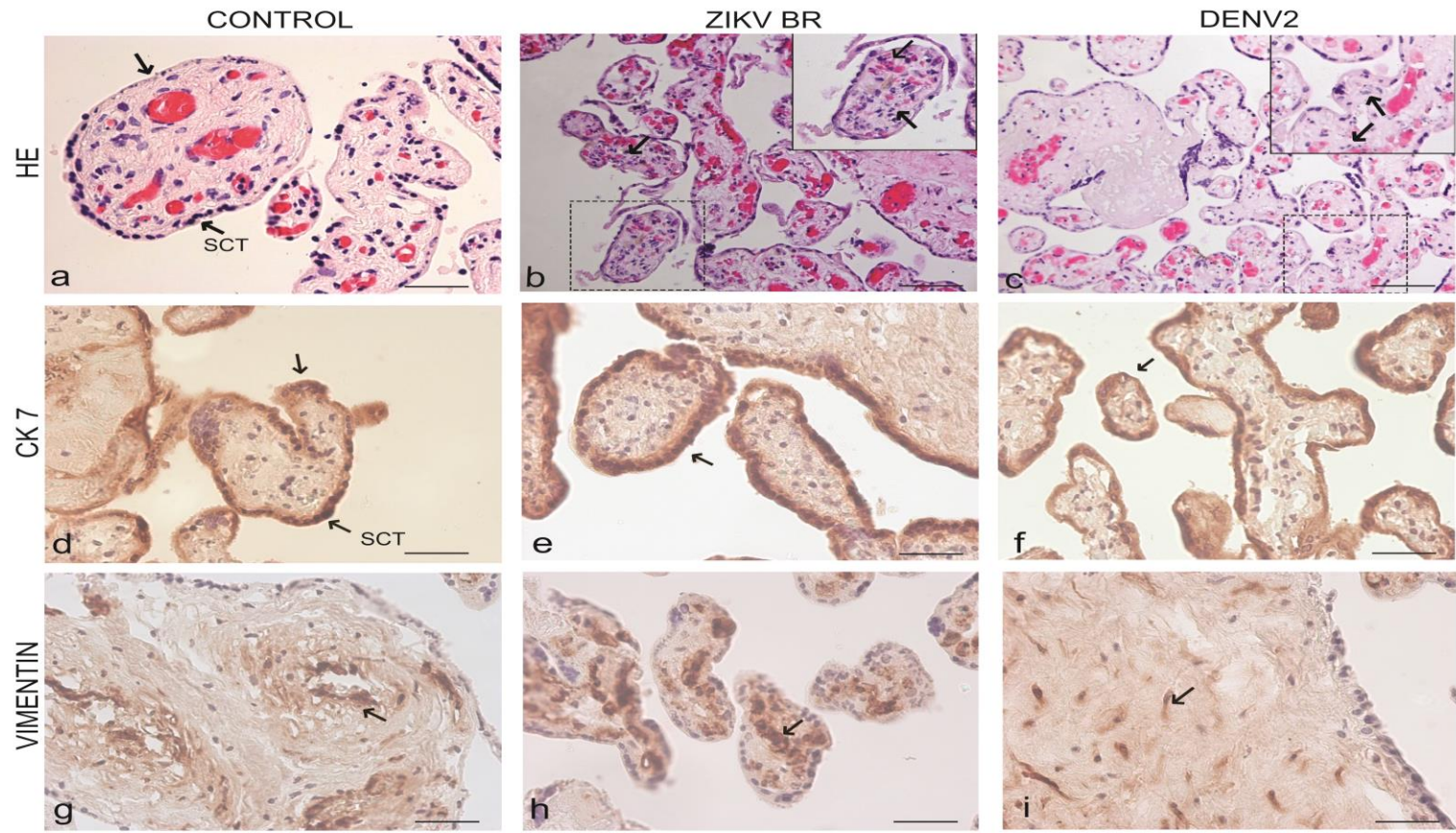


Fig.2 Histological analysis of infected placental explants. Human placental explants were left uninfected (control) or were infected with ZIKV or DENV. After 72 hpi, immunohistochemistry analyses were performed. The tissues were stained with hematoxylin and eosin (H&E). Black arrows indicate karyorrhexis, and red arrows point to stromal injury. SCT: syncytiotrophoblasts; panel **(a-c)**. Immunohistochemistry analysis of the placental tissues stained with anti-cytokeratin (CK7), black arrows indicate stained with anti-cytokeratin (CK7); panel **(d-f)**. Immunohistochemistry analysis of the placental tissues stained with anti-vimentin (mesenchymal cells), black arrows indicate stained with anti-vimentin; panel **(g-i)**. The graph represents the mean \pm standard deviation of the number of cells/field with karyorrhexis detected in ten random photos taken from experiments performed in triplicate in the H&E analysis **(j)**. The data were analyzed using one-way ANOVA followed by the Bonferroni correction; $***p < 0.001$. β -hCG was quantified to determine SCT viability, the results of which are shown in panel **(k)**. Scale bar: 10 μ m

These data show that placentas from late-stage pregnancies are still vulnerable to ZIKV. Therefore, models of infection in full-term explants can be used to recapitulate the second half of pregnancy. Furthermore, full-term explants have the advantage of being easy to obtain after delivery (Coyne e Lazear, 2016; Pantoja *et al.*, 2017).

Our data clearly demonstrate that full-term human placenta explants are permissive to ZIKV and DENV2 infections, which are associated with cell injury.

The reported divergences among different studies may be attributed to the time of explant obtainment and to the ZIKV strain used. It is important to note that immunohistochemistry staining and progressive RNA release from cultures indicate that this model can be used to study the dynamics of infection and of host-virus interaction.

ZIKV infection induces cytokine expression in the placental explants

Placental damage and dysfunction caused by viral infection may be a consequence of viral cytopathic effect or host-mediated pathology (Hamilton *et al.*, 2012). Such conditions alter placental development, restrict fetal growth (Mcewan *et al.*, 2009), and may result in neuroinflammation (Vermillion *et al.*, 2017). To determine whether antiviral or inflammatory responses to infection are related to placental dysfunction, we evaluated the expression of interferons (IFNs) and pro-inflammatory cytokines in ZIKV-infected placenta explants.

ZIKV infections in other experimental models have been associated with increased expression of innate immune sensors and interferon-stimulated genes (Hamel *et al.*, 2015). Also, studies have found purified primary human trophoblasts and trophoblast-derived cell lines to be resistant to ZIKV infection due to the production of type III IFNs (IFN- λ 1 and λ 2) (Bayer *et al.*, 2016). Our experimental model supports ZIKV replication, so we investigated whether and how the expression of type I (IFN- β), type II (IFN- γ), and type III (IFN- λ 1 and λ 4) IFNs would take place in infected placental explants. As a positive control of IFN expression, we cultured explants with poly (I:C) and observed an increase

in IFN- β , IFN- λ 1, IFN- λ 4 and IFN- γ expression at 24 hpi relative to untreated cultures (Figure 3a). Notably, IFN- λ 4 and IFN- γ reached higher levels of expression than IFN- β and IFN- λ 1. Placental explants were also infected with ZIKV or DENV or left uninfected (UI), and IFN expression was evaluated after 24 and 72 hpi. ZIKV and DENV infections induced a mild increase in IFN- λ 1 and IFN- λ 4 expression at 24 hpi; the exception was IFN- λ 4 in the case of DENV infection, which did not increase (Figure 3b). At 72 hpi, IFN- λ 1 and IFN- λ 4 expression in infected explants increased as much as 10-fold in the cases of both viral infections. Type III IFNs include IFN- λ 1, λ 2/ λ 3, and λ 4, which seem to induce a similar antiviral response pattern mediated by IFNLR1/IL-10R2 engagement and activation of JAK-STAT signaling pathway, leading to ISG expression (Kotenko *et al.*, 2003; Meager *et al.*, 2005; Hamming *et al.*, 2013). Several studies with different infectious models have demonstrated that IFN- λ 1 and IFN- λ 2/ λ 3 are similarly regulated by IRF-3 and IRF-7 activation and usually IFN- λ 2 closely follow IFN- λ 1 secretion (Onoguchi *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2014). This was also demonstrated after infection of trophoblast cell lines and primary human trophoblasts with ZIKV (Bayer *et al.*, 2016; Corry *et al.*, 2017), although the secretion of IFN- λ 1 showed to be more prominent in the latter case (Bayer, *et al.*, 2016).

IFN- λ 4 was discovered more recently, and evidences demonstrated that its expression is regulated by a similar transduction signaling pathway as the others (Pacanowski *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2014).

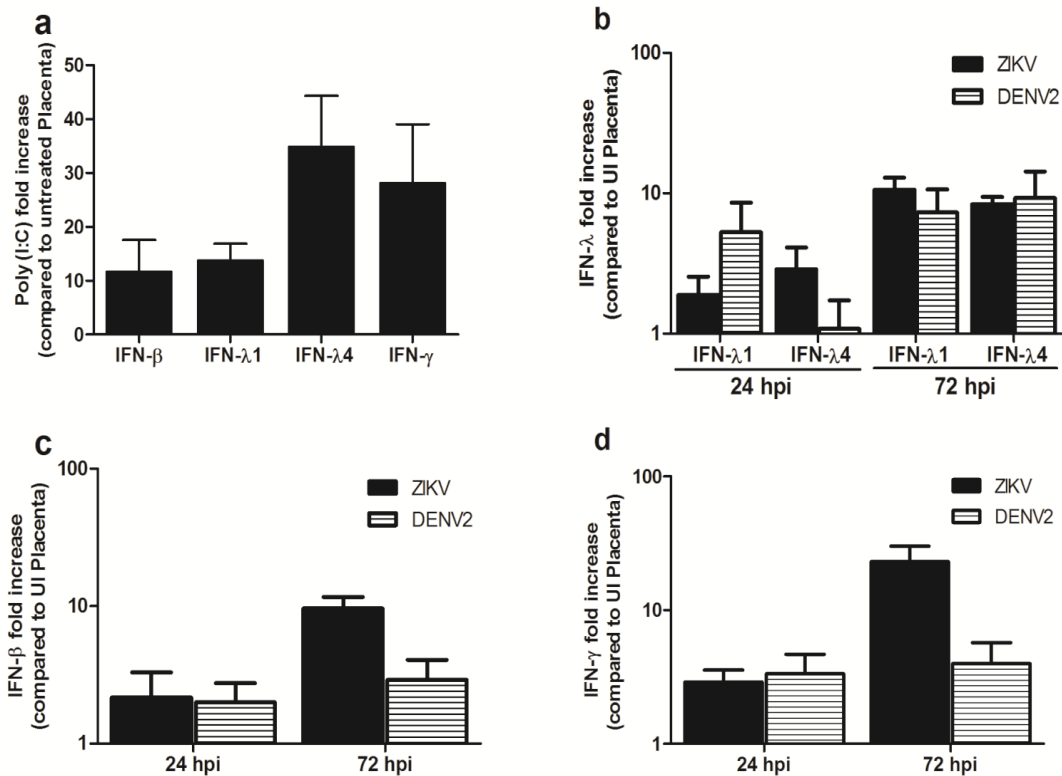


Fig.3 IFN expression in infected placental tissue explants. Explants were cultured with poly (I:C) for 24 hours. RNA was extracted, and the IFN mRNA levels indicated were analyzed by quantitative RT-PCR and normalized by the housekeeping gene (GAPDH) (a). Explants were cultured with ZIKV or DENV for 24 or 72 hpi. Net, RNA was extracted and mRNA levels of IFN- λ 1 and INF- λ 4 (b), IFN- β (c), and IFN- γ (d) were analyzed by quantitative RT-qPCR and normalized by GAPDH. Results are shown as fold change relative to controls (uninfected tissues and unstimulated poly (I:C)). The data shown are representative of at least three independent experiments and are presented as mean +/- standard deviation.

Our data demonstrated that type III IFNs are produced in the placental explant model and increase over the time points evaluated, corroborating with the previous data obtained with other placental culture models (Bayer *et al.*, 2016; Corry *et al.*, 2017). The activation of type III IFN inducing pathway was further demonstrated by the increased levels of IFN- λ 4 mRNA, which expression had never been evaluated during ZIKV infection before. Any discrepancies between our results and those in the literature could be attributed to factors such as the use of different ZIKV strains and the use of a placental explant instead of a single epithelial cell type from the placenta.

ZIKV and DENV2 also induced mild increases in IFN- β expression at 24 hpi, followed by a significant increase in IFN β expression at 72 hpi only in the ZIKV-infected explants (Figure 3c). Interestingly, our results on IFN- γ expression showed a similar pattern, in which only ZIKV infection caused an increase in IFN expression at 72hpi (Figure 3d). IFN- γ may induce apoptosis of human primary trophoblast, mediate proliferation and migration of extravillous cytotrophoblasts (EVCT) and, in excess, be harmful to pregnancy and to fetal growth (Wilczyński *et al.*, 2003; Lash *et al.*, 2006; Vargas-Rojas *et al.*, 2016). ZIKV NS5 has been found to destabilize STAT2 and suppresses the signaling mediated by type I and type III IFN (Quicke *et al.*, 2016; Bowen *et al.*, 2017; Chaudhary *et al.*, 2017). Therefore, increased levels of IFNs produced to restrict ZIKV infection may be counteracted by the virus while inducing inflammation and other host responses that could lead to deleterious effects on pregnancy.

To investigate other aspects of the immune response to ZIKV in placental explants, we assessed the expression of IL-1 β , IL-6, IL-10, and TNF- α in ZIKV-infected tissues (Figure 4). Tissues were either stimulated with poly (I:C) or infected with ZIKV or DENV. All groups exhibited increased expression of all the cytokines evaluated (IL-1 β , IL-10, IL-6, and TNF- α) upon infection/stimulation relative to uninfected controls. One day post infection (dpi), ZIKV-infected explants presented a significant increase in the expression of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in comparison to DENV2-infected explants (Figure 4a, b, and d). The expression of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, and TNF- α alters the intra-amniotic milieu and is a marker of fetal inflammatory response syndromes. Increased Th1 cytokines have been associated with spontaneous preterm labor and with disruption of fetal tolerance (Elovitz *et al.*, 2006; Raghupathy e Kalinka, 2008; Garcia-Ruíz *et al.*, 2015). IL-1 β has also been associated with the expression of metalloproteinases and CTB invasion during pregnancy (Librach *et al.*, 1994; Pontillo *et al.*, 2013).

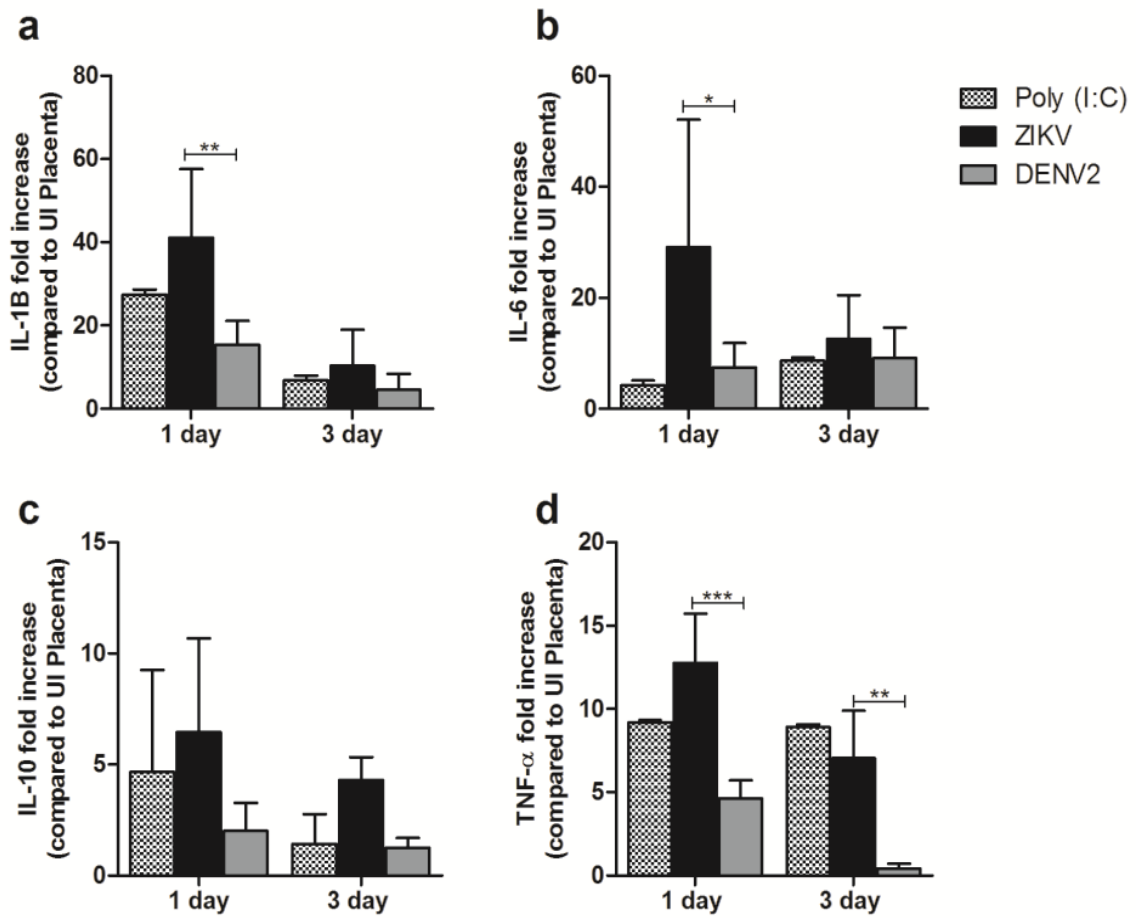


Fig.4 Cytokine expression profiles in placental tissue explants. ZIKV-BR- and DENV2-infected explants were analyzed for cytokine gene expression using RT-qPCR. Uninfected explants (UI) and poly (I:C) -stimulated tissues were analyzed as negative and positive controls, respectively. Unstimulated poly (I:C) and uninfected tissues were used to compared fold increase. Total RNA was extracted from the explants on Days 1 and 3 posts infection. The RNA levels for IL-1 β (a), IL-6 (b), IL-10 (c), and TNF- α (d) were quantified using gene-specific primers. The analysis was performed using samples obtained in triplicate. Data are represented as mean +/- standard deviation; one-way

ANOVA was performed, followed by the Bonferroni correction; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ were considered significant

In vitro treatment with IL-1RA impaired trophoblast fusion, viability, and hCG secretion, results which indicate that IL-1B plays an important role in placental dysfunction and adverse pregnancy outcomes (Girard *et al.*, 2014; Derricott *et al.*, 2017).

TNF- α may act directly upon early term placentas and cause placental pathology, fetal hypoxia, and neurodevelopmental defects in the fetal brain (Carpentier *et al.*, 2011). Also, TNF- α disturbs trophoblast function, leading to decreased cell fusion and reduced expression of hCG (Leisser *et al.*, 2006; Otun *et al.*, 2011). TNF- α may also be associated with cell death, as described in other models (Ghouzzi *et al.*, 2016). IL-10, on the other hand, is typically anti-inflammatory, which often results in tissue protection and is involved in fetal tolerance (Roth *et al.*, 1996; Roth e Fisher, 1999; Fettke *et al.*, 2016). Given the fact that ZIKV infection induced expression significant levels of pro-inflammatory cytokines but not of IL-10, this combination could result in pathology and may account for some of the deleterious effects of ZIKV infection during pregnancy.

DENV2 could not induce the expression of pro-inflammatory cytokines to the same levels as ZIKV, a difference which may be associated with lower replication efficiency and consequent lower stimulation of the immune system.

ZIKV-infected placental explants undergo apoptosis

To investigate whether ZIKV-induced replication, inflammation, and injury would result in cell death, we performed TUNEL assays 3 days after ZIKV infection to determine whether the explanted tissue underwent apoptosis (Figure 5). DNase treatment was used as a positive control (Figure 5a), while untreated, uninfected explants were used as negative control (Figure 5b). ZIKV-BR-infected samples demonstrated prominent TUNEL staining, which appeared to be quantitatively comparable to the positive control sample (Figures 5c). DENV infection resulted in lower TUNEL staining (Figure 5d), which corroborates previous H&E data indicating that DENV2 causes less placental damage in this model.

Apoptosis was further confirmed by immunohistochemistry with cleaved-caspase 3 antibodies. ZIKV-BR and DENV2 exhibited increased caspase 3 staining relative to the uninfected control, which is indicative of apoptotic cell death (Figure 6a-f). Caspase 3 expression was higher in ZIKV-infected cultures than in DENV-infected cultures. (Figure 6h).

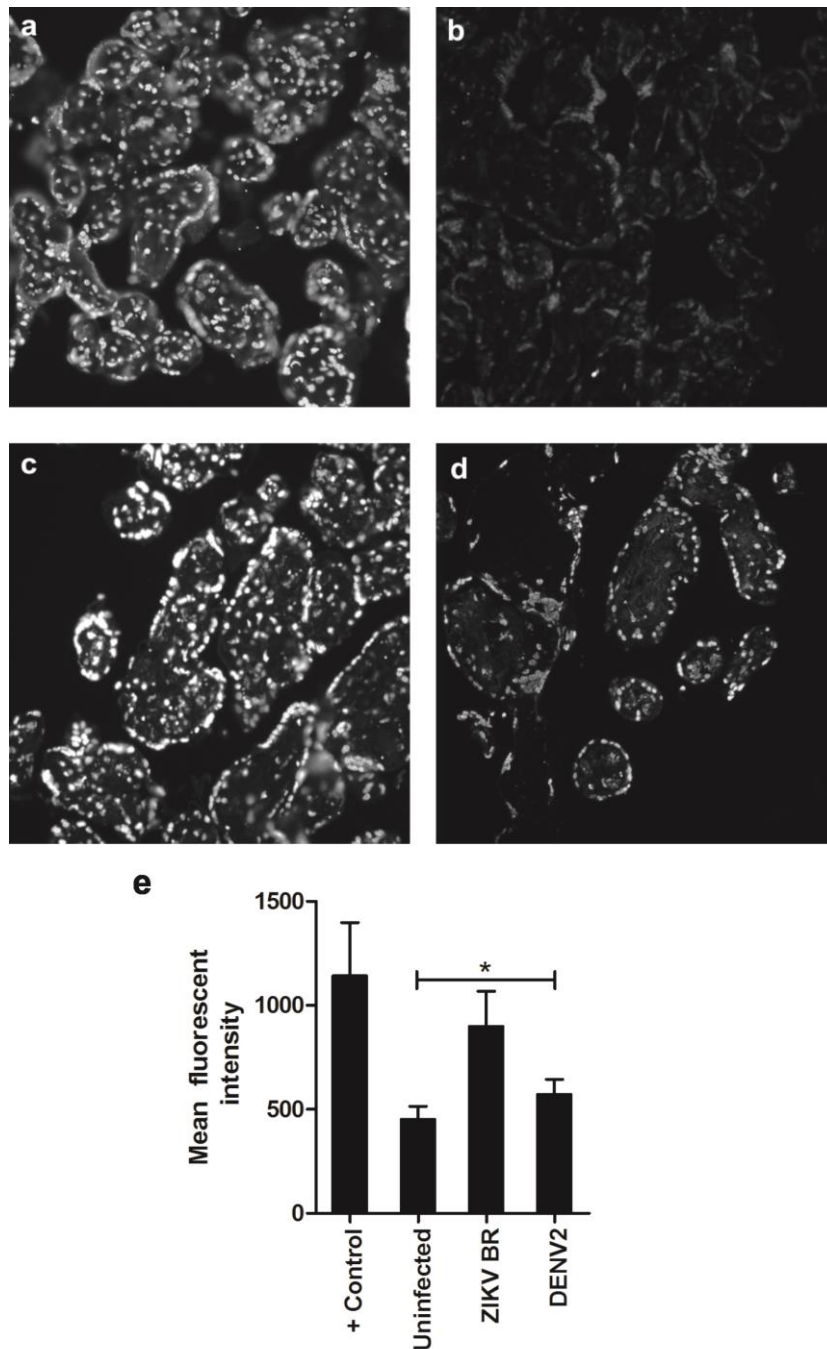


Fig.5 Evaluation of ZIKV-induced apoptosis in placental explants was measured by TUNEL assay. Infected explants on Day 3 posts infection and uninfected explants were analyzed by TUNEL assay. Panel (a) represents the DNase I-treated positive reaction control sample. Panel (b) represents the

uninfected sample (control). TUNEL staining of placenta villi sections of ZIKV-BR (c) and DENV2-infected (d) tissue are represented. The images of TUNEL-positive cells were obtained at a magnification of 40x using an Olympus BX53 microscope system. Quantification was performed by measuring image intensity in the Image-Pro® Plus software, version 7.0. One-way ANOVA and the Bonferroni correction were performed to determine statistical significance (* $p < 0.05$; confidence interval – 95%)

Immunostaining was observed covering chorionic villi, a result which suggests that SCTs from the placenta full-term may be susceptible to apoptosis via caspase 3 in ZIKV infections. SCTs cover chorionic villi and play a key role in the innate immune response and recruitment of NK cells (Giugliano *et al.*, 2015). Accordingly, previous studies that have investigated ZIKV tropism in several placental cell types have found ZIKV replication to be associated with abnormal tissue architecture, which might lead to the rupture of the placental barrier (El Costa *et al.*, 2016).

Caspase-mediated apoptosis may result from enhanced inflammatory response, such as the TNF- α -TNFR signaling pathway. Since we detected an increased expression of TNF- α in placental explants infected with ZIKV, we decided to investigate whether the observed apoptosis could be mediated by this cytokine. ZIKV-infected explants were treated with anti-TNF RII/TNFRSF1B neutralizing antibody, and caspase 3 activation was evaluated by IHC. Indeed, the anti-TNFR treatment significantly reduced caspase 3 staining, indicating that

TNF- α -mediated apoptosis plays a significant role in tissue damage (Figure 6d-f). TNFR neutralization also diminished caspase 3 staining in DENV-infected cultures, suggesting that both viruses are able to induce apoptosis, although lesion extension was found to be more severe when the tissues were infected with ZIKV. Some levels of cell death were still observed after anti-TNFR treatment, suggesting that other mechanisms may also be involved in ZIKV-induced tissue damage. Previous studies have demonstrated that ZIKV infection in human neural progenitors (hNPCs) promotes increased caspase 3 expression, even in the presence of low levels of viral antigens (Ghouzzi *et al.*, 2016). These findings suggest that this pathway may be induced by ZIKV in different cell types and may be a relevant mechanism associated with congenital abnormalities.

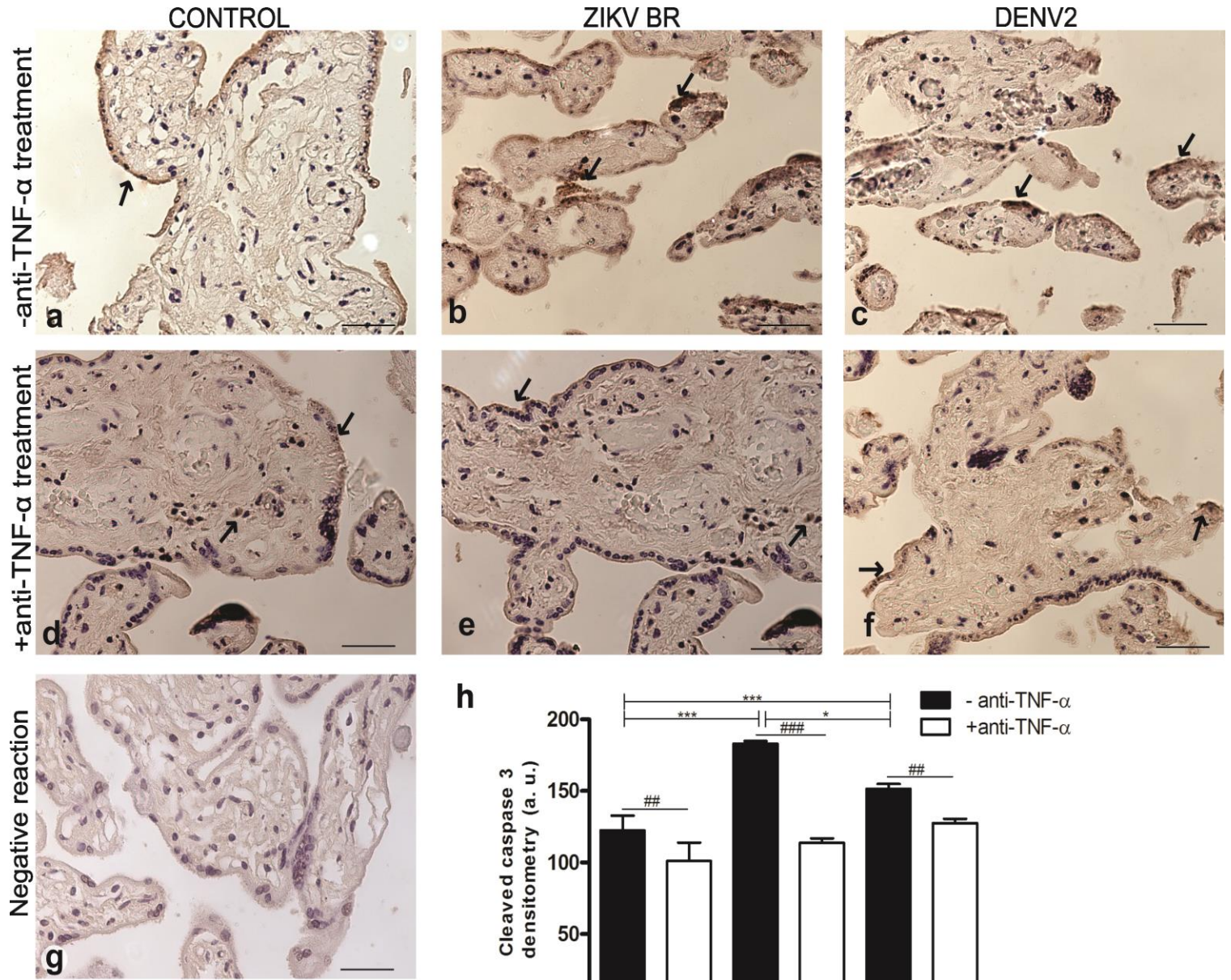


Fig.6 ZIKV and DENV2 induces caspase 3 activation. Sections were stained with anti-caspase 3, panel (a-f), indicated by black arrows. Sections of uninfected samples (control), panel (a), ZIKV-infected tissues (b) and of DENV2-infected (c). Panel (d-f) represents sections of uninfected samples (d) and ZIKV or DENV2-infected explants treated with the anti-TNF- α antibody, panel (e) and (f) respectively; (g) represents negative reaction controls with the absence of primary antibodies. Panel (k) shows the quantification densitometry analysis of caspase 3, which was performed using an Axioskop 2-Mot Plus Microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany). The AxioVision software was used for the qualitative analysis. One-Way ANOVA was performed to compare untreated groups (controls) to infected groups (* $p < 0,05$, *** $p < 0.001$). Two-way ANOVA was performed to compare treated groups to untreated groups with anti-TNF- α antibody (### $p < 0.001$). Scale bar: 10 μm

We conclude that our placental tissue explant model is a valuable tool for the study of ZIKV interaction with the human placenta. We observed that placental explants are permissive to and support ZIKV and DENV2 infections for up to 120 hours. Infected placental explants are amenable to different types of analysis, which confirms that ZIKV is pathogenic to the human placenta. Importantly, this model recapitulates some critical observations made regarding ZIKV infection in other model systems and in patients (Miner *et al.*, 2016b; Noronha *et al.*, 2016). Due to the use of human placentas, this model should provide crucial information to be applied to the clinical management of ZIKV

infection, as well as to the development of preventive or therapeutic strategies against the deleterious effects of ZIKV on human embryos.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the Brazilian National Institute of Science and Technology for Dengue Studies (INCT em Dengue), the São Paulo Research Foundation (FAPESP; Grant No. 2013/21719-3 to MLN) and the Brazilian National Research Council (CAPES) for their financial support. MLN is a CNPq research fellow.

Author Contributions

Performed the experiments: MRR, JBM. Analyzed the data: MRR, JBM, REM, PR, LBA, AN, SMO, MLN. Contributed reagents/materials/analysis tools: MPP, LMM, SMO LBA. Wrote the paper: MRR, REM, LBA, SMO, AN, MLN. Planned the experiments: PR, LBA, AHO, DMVO, SMO, AN, MLN.

REFERÊNCIAS

ADAMS WALDORF, K. M. et al. Fetal brain lesions after subcutaneous inoculation of Zika virus in a pregnant nonhuman primate. **Nat Med**, v. 22, n. 11, p. 1256-1259, Nov 2016. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27618651> >.

AKIYAMA, B. M. et al. Zika virus produces noncoding RNAs using a multi-pseudoknot structure that confounds a cellular exonuclease. **Science**, v. 354, n. 6316, p. 1148-1152, 12 2016. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27934765> >.

ALIOTA, M. T. et al. Correction: Characterization of Lethal Zika Virus Infection in AG129 Mice. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 5, p. e0004750, May 2016. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27214379> >.

ALPERT, S. G.; FERGERSON, J.; NOËL, L. P. Intrauterine West Nile virus: ocular and systemic findings. **Am J Ophthalmol**, v. 136, n. 4, p. 733-5, Oct 2003. ISSN 0002-9394. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14516816> >.

APTE-SENGUPTA, S.; SIROHI, D.; KUHN, R. J. Coupling of replication and assembly in flaviviruses. **Curr Opin Virol**, v. 9, p. 134-42, Dec 2014. ISSN 1879-6265. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25462445> >.

ATKINSON, B. et al. Detection of Zika Virus in Semen. **Emerg Infect Dis**, v. 22, n. 5, p. 940, May 2016. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27088817> >.

BAYER, A. et al. Type III Interferons Produced by Human Placental Trophoblasts Confer Protection against Zika Virus Infection. **Cell Host Microbe**, v. 19, n. 5, p. 705-12, May 2016. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27066743> >.

BECKHAM, J. D. et al. Zika Virus as an Emerging Global Pathogen: Neurological Complications of Zika Virus. **JAMA Neurol**, v. 73, n. 7, p. 875-9, Jul 2016. ISSN 2168-6157. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27183312> >.

BHATTACHARYA, D. et al. Phosphorylation of yellow fever virus NS5 alters methyltransferase activity. **Virology**, v. 380, n. 2, p. 276-84, Oct 2008. ISSN 1096-0341. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18757072> >.

BIDET, K.; DADLANI, D.; GARCIA-BLANCO, M. A. G3BP1, G3BP2 and CAPRIN1 are required for translation of interferon stimulated mRNAs and are targeted by a dengue virus non-coding RNA. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 7, p. e1004242, Jul 2014. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24992036> >.

BOWEN, J. R. et al. Zika Virus Antagonizes Type I Interferon Responses during Infection of Human Dendritic Cells. **PLoS Pathog**, v. 13, n. 2, p. e1006164, Feb 2017. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28152048> >.

BRADLEY, M. P.; NAGAMINE, C. M. Animal Models of Zika Virus. **Comp Med**, v. 67, n. 3, p. 242-252, Jun 2017. ISSN 1532-0820. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28662753> >.

BREY, E. M. et al. Automated selection of DAB-labeled tissue for immunohistochemical quantification. **J Histochem Cytochem**, v. 51, n. 5, p. 575-84, May 2003. ISSN 0022-1554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12704205> >.

CALVET, G. et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **Lancet Infect Dis**, v. 16, n. 6, p. 653-60, Jun 2016a. ISSN 1474-4457. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26897108> >.

_____. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **Lancet Infect Dis**, v. 16, n. 6, p. 653-660, Jun 2016b. ISSN 1474-4457. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26897108> >.

CAO-LORMEAU, V. M. et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1531-1539, Apr 2016. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26948433> >.

CARPENTIER, P. A.; DINGMAN, A. L.; PALMER, T. D. Placental TNF- α signaling in illness-induced complications of pregnancy. **Am J Pathol**, v. 178, n. 6, p. 2802-10, Jun 2011. ISSN 1525-2191. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21641402> >.

CARTEAUX, G. et al. Zika Virus Associated with Meningoencephalitis. **N Engl J Med**, v. 374, n. 16, p. 1595-6, Apr 2016. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26958738> >.

CHARLEY, P. A.; WILUSZ, J. Standing your ground to exoribonucleases: Function of Flavivirus long non-coding RNAs. **Virus Res**, v. 212, p. 70-7, Jan 2016. ISSN 1872-7492. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26368052> >.

CHATURVEDI, U. C. et al. Transplacental infection with Japanese encephalitis virus. **J Infect Dis**, v. 141, n. 6, p. 712-5, Jun 1980. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6248601> >.

CHAUDHARY, V. et al. Selective Activation of Type II Interferon Signaling by Zika Virus NS5 Protein. **J Virol**, v. 91, n. 14, Jul 2017. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28468880> >.

CHEN, J. et al. AXL promotes Zika virus infection in astrocytes by antagonizing type I interferon signalling. **Nat Microbiol**, v. 3, n. 3, p. 302-309, Mar 2018. ISSN 2058-5276. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29379210> >.

CHIANG, P. Y.; WU, H. N. The role of surface basic amino acids of dengue virus NS3 helicase in viral RNA replication and enzyme activities. **FEBS Lett**, v. 590, n. 14, p. 2307-20, 07 2016. ISSN 1873-3468. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27273003> >.

CHUNG, K. Y. et al. Higher catalytic efficiency of N-7-methylation is responsible for processive N-7 and 2'-O methyltransferase activity in dengue virus. **Virology**, v. 402, n. 1, p. 52-60, Jun 2010. ISSN 1096-0341. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20350738> >.

CHUTINIMITKUL, S. et al. Dengue typing assay based on real-time PCR using SYBR Green I. **J Virol Methods**, v. 129, n. 1, p. 8-15, Oct 2005. ISSN 0166-0934 (Print) 0166-0934 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15941596> >.

COMBA, C. et al. Role of inflammatory mediators in patients with recurrent pregnancy loss. **Fertil Steril**, v. 104, n. 6, p. 1467-74.e1, Dec 2015. ISSN 1556-5653. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26368793> >.

CORRY, J. et al. Organotypic models of type III interferon-mediated protection from Zika virus infections at the maternal-fetal interface. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 114, n. 35, p. 9433-9438, Aug 2017. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28784796> >.

COYNE, C. B.; LAZEAR, H. M. Zika virus - reigniting the TORCH. **Nat Rev Microbiol**, v. 14, n. 11, p. 707-715, 11 2016. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27573577> >.

CRUZ-OLIVEIRA, C. et al. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. **FEMS Microbiol Rev**, v. 39, n. 2, p. 155-70, Mar 2015. ISSN 1574-6976. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25725010> >.

CUGOLA, F. R. et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, v. 534, n. 7606, p. 267-71, 06 2016. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27279226> >.

DARBELLAY, J. et al. Neonatal pigs are susceptible to experimental Zika virus infection. **Emerg Microbes Infect**, v. 6, n. 2, p. e6, Feb 2017. ISSN 2222-1751. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28196970> >.

DERRICOTT, H. et al. A novel in vitro model of villitis of unknown etiology demonstrates altered placental hormone and cytokine profile. **Am J Reprod Immunol**, Jul 2017. ISSN 1600-0897. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28681959> >.

DUDLEY, D. M. et al. A rhesus macaque model of Asian-lineage Zika virus infection. **Nat Commun**, v. 7, p. 12204, Jun 2016. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27352279> >.

DUFFY, M. R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **N Engl J Med**, v. 360, n. 24, p. 2536-43, Jun 2009. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19516034> >.

EL COSTA, H. et al. ZIKA virus reveals broad tissue and cell tropism during the first trimester of pregnancy. **Sci Rep**, v. 6, p. 35296, Oct 2016. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27759009> >.

ELOVITZ, M. A.; MRINALINI, C.; SAMMEL, M. D. Elucidating the early signal transduction pathways leading to fetal brain injury in preterm birth. **Pediatr Res**, v. 59, n. 1, p. 50-5, Jan 2006. ISSN 0031-3998. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16327009> >.

ENFISSI, A. et al. Zika virus genome from the Americas. **Lancet**, v. 387, n. 10015, p. 227-8, Jan 2016. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26775124> >.

FARIA, N. R. et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**, v. 352, n. 6283, p. 345-349, Apr 2016. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27013429> >.

FERNANDEZ-GARCIA, M. D. et al. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. **Cell Host Microbe**, v. 5, n. 4, p. 318-28, Apr 2009. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19380111> >.

FETTKE, F. et al. Maternal and Fetal Mechanisms of B Cell Regulation during Pregnancy: Human Chorionic Gonadotropin Stimulates B Cells to Produce IL-10 While Alpha-Fetoprotein Drives Them into Apoptosis. **Front Immunol**, v. 7, p. 495, 2016. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28008329> >.

FOY, B. D. et al. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. **Emerg Infect Dis**, v. 17, n. 5, p. 880-2, May 2011. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21529401> >.

FRANK, C. et al. Sexual transmission of Zika virus in Germany, April 2016. **Euro Surveill**, v. 21, n. 23, Jun 2016. ISSN 1560-7917. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27311329> >.

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**, v. 21, n. 23, Jun 2016. ISSN 1560-7917. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27311680> >.

GARCIA-RUÍZ, G. et al. In vitro progesterone modulation on bacterial endotoxin-induced production of IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8, IL-10, MIP-1 α , and MMP-9 in pre-labor human term placenta. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 13, p. 115, Oct 2015. ISSN 1477-7827. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26446923> >.

GHOZZI, V. E. et al. ZIKA virus elicits P53 activation and genotoxic stress in human neural progenitors similar to mutations involved in severe forms of genetic microcephaly and p53. **Cell Death Dis**, v. 7, n. 10, p. e2440, Oct 2016. ISSN 2041-4889. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27787521> >.

GIRARD, S. et al. Circulating cytokines and alarmins associated with placental inflammation in high-risk pregnancies. **Am J Reprod Immunol**, v. 72, n. 4, p. 422-34, Oct 2014. ISSN 1600-0897. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24867252> >.

GIUGLIANO, S. et al. Hepatitis C Virus Sensing by Human Trophoblasts Induces Innate Immune Responses and Recruitment of Maternal NK Cells: Potential Implications for Limiting Vertical Transmission. **J Immunol**, v. 195, n. 8, p. 3737-47, Oct 2015. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26342030> >.

GOKHALE, N. S. et al. N6-Methyladenosine in Flaviviridae Viral RNA Genomes Regulates Infection. **Cell Host Microbe**, v. 20, n. 5, p. 654-665, Nov 2016. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27773535> >.

GOODFELLOW, F. T. et al. Zika Virus Induced Mortality and Microcephaly in Chicken Embryos. **Stem Cells Dev**, v. 25, n. 22, p. 1691-1697, 11 2016. ISSN 1557-8534. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27627457> >.

GOVERO, J. et al. Zika virus infection damages the testes in mice. **Nature**, v. 540, n. 7633, p. 438-442, 12 2016. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27798603> >.

GROVE, J.; MARSH, M. The cell biology of receptor-mediated virus entry. **J Cell Biol**, v. 195, n. 7, p. 1071-82, Dec 2011. ISSN 1540-8140. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22123832> >.

GÖERTZ, G. P. et al. Functional RNA during Zika virus infection. **Virus Res**, Aug 2017. ISSN 1872-7492. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28864425> >.

HADDOW, A. D. et al. Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 2, p. e1477, 2012. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22389730> >.

HAMEL, R. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **J Virol**, v. 89, n. 17, p. 8880-96, Sep 2015. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26085147> >.

HAMILTON, S. T. et al. Human cytomegalovirus-induces cytokine changes in the placenta with implications for adverse pregnancy outcomes. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52899, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23300810> >.

HAMMING, O. J. et al. Interferon lambda 4 signals via the IFN λ receptor to regulate antiviral activity against HCV and coronaviruses. **EMBO J**, v. 32, n. 23, p. 3055-65, Nov 2013. ISSN 1460-2075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24169568> >.

HELIGE, C. et al. Trophoblastic invasion in vitro and in vivo: similarities and differences. **Hum Reprod**, v. 23, n. 10, p. 2282-91, Oct 2008. ISSN 1460-2350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18621754> >.

HENNESSEY, M. J. et al. Zika Virus Disease in Travelers Returning to the United States, 2010-2014. **Am J Trop Med Hyg**, v. 95, n. 1, p. 212-5, Jul 2016. ISSN 1476-1645. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27139440> >.

HIDARI, K. I.; SUZUKI, T. Dengue virus receptor. **Trop Med Health**, v. 39, n. 4 Suppl, p. 37-43, Dec 2011. ISSN 1349-4147. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22500135> >.

ITINTEANG, T. et al. A placental chorionic villous mesenchymal core cellular origin for infantile haemangioma. **J Clin Pathol**, v. 64, n. 10, p. 870-4, Oct 2011. ISSN 1472-4146. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21947300> >.

JAGGER, B. W. et al. Gestational Stage and IFN- λ Signaling Regulate ZIKV Infection In Utero. **Cell Host Microbe**, v. 22, n. 3, p. 366-376.e3, Sep 2017. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28910635> >.

KAUFMANN, B.; ROSSMANN, M. G. Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry. **Microbes Infect**, v. 13, n. 1, p. 1-9, Jan 2011. ISSN 1769-714X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20869460> >.

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. **Viol J**, v. 14, n. 1, p. 82, Apr 2017. ISSN 1743-422X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28420392> >.

KIECKBUSCH, J. et al. Disrupted PI3K p110 δ Signaling Dysregulates Maternal Immune Cells and Increases Fetal Mortality In Mice. **Cell Rep**, v. 13, n. 12, p. 2817-28, Dec 2015. ISSN 2211-1247. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26711346> >.

KIM, J. K. et al. Profiling of viral proteins expressed from the genomic RNA of Japanese encephalitis virus using a panel of 15 region-specific polyclonal rabbit antisera: implications for viral gene expression. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0124318, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25915765> >.

KLEMA, V. J.; PADMANABHAN, R.; CHOI, K. H. Flaviviral Replication Complex: Coordination between RNA Synthesis and 5'-RNA Capping. **Viruses**, v. 7, n. 8, p. 4640-56, Aug 2015. ISSN 1999-4915. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26287232> >.

KOTENKO, S. V. et al. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. **Nat Immunol**, v. 4, n. 1, p. 69-77, Jan 2003. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12483210> >.

KUMAR, A. et al. Human Sertoli cells support high levels of Zika virus replication and persistence. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 5477, Apr 2018. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29615760> >.

KURMAN, R. J. et al. Immunocytochemical localization of placental lactogen and chorionic gonadotropin in the normal placenta and trophoblastic tumors, with emphasis on intermediate trophoblast and the placental site trophoblastic tumor. **Int J Gynecol Pathol**, v. 3, n. 1, p. 101-21, 1984. ISSN 0277-1691. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6329973> >.

LANCIOTTI, R. S. et al. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. **Emerg Infect Dis**, v. 13, n. 5, p. 764-7, May 2007. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17553261> >.

_____. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerg Infect Dis**, v. 14, n. 8, p. 1232-9, Aug 2008. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18680646> >.

LASH, G. E. et al. Interferon-gamma inhibits extravillous trophoblast cell invasion by a mechanism that involves both changes in apoptosis and protease levels. **FASEB J**, v.

20, n. 14, p. 2512-8, Dec 2006. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17142800> >.

LAZEAR, H. M. et al. A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. **Cell Host Microbe**, v. 19, n. 5, p. 720-30, May 2016. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27066744> >.

LEE, H. C. et al. Transcriptional regulation of IFN- λ genes in hepatitis C virus-infected hepatocytes via IRF-3·IRF-7·NF- κ B complex. **J Biol Chem**, v. 289, n. 8, p. 5310-9, Feb 2014. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24385435> >.

LEISSER, C. et al. Tumour necrosis factor-alpha impairs chorionic gonadotrophin beta-subunit expression and cell fusion of human villous cytotrophoblast. **Mol Hum Reprod**, v. 12, n. 10, p. 601-9, Oct 2006. ISSN 1360-9947. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16896069> >.

LEVY, D. E.; MARIÉ, I. J.; DURBIN, J. E. Induction and function of type I and III interferon in response to viral infection. **Curr Opin Virol**, v. 1, n. 6, p. 476-86, Dec 2011. ISSN 1879-6265. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22323926> >.

LIBRACH, C. L. et al. Interleukin-1 beta regulates human cytotrophoblast metalloproteinase activity and invasion in vitro. **J Biol Chem**, v. 269, n. 25, p. 17125-31, Jun 1994. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8006017> >.

LICHINCHI, G. et al. Dynamics of Human and Viral RNA Methylation during Zika Virus Infection. **Cell Host Microbe**, v. 20, n. 5, p. 666-673, Nov 2016. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27773536> >.

LUCEY, D.; CUMMINS, H.; SHOLTS, S. Congenital Zika Syndrome in 2017. **JAMA**, v. 317, n. 13, p. 1368-1369, 04 2017. ISSN 1538-3598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28384812> >.

MALKKI, H. CNS infections: Mouse studies confirm the link between Zika virus infection and microcephaly. **Nat Rev Neurol**, v. 12, n. 7, p. 369, Jul 2016. ISSN 1759-4766. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27231186> >.

MANOKARAN, G. et al. Dengue subgenomic RNA binds TRIM25 to inhibit interferon expression for epidemiological fitness. **Science**, v. 350, n. 6257, p. 217-21, Oct 2015. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26138103> >.

MARCONDES, C. B.; XIMENES, M. E. F. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by Aedes (Stegomyia) mosquitoes. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 49, n. 1, p.

4-10, Feb 2016. ISSN 1678-9849. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26689277>>.

MCEWAN, M. et al. Cytokine regulation during the formation of the fetal-maternal interface: focus on cell-cell adhesion and remodelling of the extra-cellular matrix. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 20, n. 3, p. 241-9, Jun 2009. ISSN 1879-0305. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19487153>>.

MEAGER, A. et al. Biological activity of interleukins-28 and -29: comparison with type I interferons. **Cytokine**, v. 31, n. 2, p. 109-18, Jul 2005. ISSN 1043-4666. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15899585>>.

MEERTENS, L. et al. The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry. **Cell Host Microbe**, v. 12, n. 4, p. 544-57, Oct 2012. ISSN 1934-6069. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23084921>>.

_____. Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. **Cell Rep**, v. 18, n. 2, p. 324-333, 01 2017. ISSN 2211-1247. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28076778>>.

MELO, A. S. et al. Congenital Zika Virus Infection: Beyond Neonatal Microcephaly. **JAMA Neurol**, v. 73, n. 12, p. 1407-1416, Dec 2016. ISSN 2168-6157. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27695855>>.

MINER, J. J. et al. Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. **Cell**, v. 165, n. 5, p. 1081-1091, May 2016a. ISSN 1097-4172. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27180225>>.

_____. Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. **Cell**, v. 165, n. 5, p. 1081-91, May 2016b. ISSN 1097-4172. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27180225>>.

MIORIN, L. et al. Antagonism of type I interferon by flaviviruses. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 492, n. 4, p. 587-596, 10 2017. ISSN 1090-2104. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28576494>>.

MIRANDA-FILHO, D. E. B. et al. Initial Description of the Presumed Congenital Zika Syndrome. **Am J Public Health**, v. 106, n. 4, p. 598-600, Apr 2016. ISSN 1541-0048. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26959258>>.

MLAKAR, J. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. **N Engl J Med**, v. 374, n. 10, p. 951-8, Mar 2016. ISSN 1533-4406. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26862926>>.

MOLLER-TANK, S.; MAURY, W. Phosphatidylserine receptors: enhancers of enveloped virus entry and infection. **Virology**, v. 468-470, p. 565-580, Nov 2014. ISSN 1096-0341. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25277499> >.

MOSER, G. et al. Endoglandular trophoblast, an alternative route of trophoblast invasion? Analysis with novel confrontation co-culture models. **Hum Reprod**, v. 25, n. 5, p. 1127-36, May 2010. ISSN 1460-2350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20176592> >.

MULLER, D. A.; YOUNG, P. R. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. **Antiviral Res**, v. 98, n. 2, p. 192-208, May 2013. ISSN 1872-9096. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23523765> >.

MUSSO, D.; CAO-LORMEAU, V. M.; GUBLER, D. J. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? **Lancet**, v. 386, n. 9990, p. 243-4, Jul 2015. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26194519> >.

MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika Virus. **Clin Microbiol Rev**, v. 29, n. 3, p. 487-524, Jul 2016. ISSN 1098-6618. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27029595> >.

MUSSO, D.; NILLES, E. J.; CAO-LORMEAU, V. M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clin Microbiol Infect**, v. 20, n. 10, p. O595-6, Oct 2014. ISSN 1469-0691. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24909208> >.

MUÑOZ-JORDÁN, J. L.; FREDERICKSEN, B. L. How flaviviruses activate and suppress the interferon response. **Viruses**, v. 2, n. 2, p. 676-91, Feb 2010. ISSN 1999-4915. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21994652> >.

NAYAK, S. et al. Pathogenesis and Molecular Mechanisms of Zika Virus. **Semin Reprod Med**, v. 34, n. 5, p. 266-272, 09 2016. ISSN 1526-4564. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27612156> >.

NEWMAN, C.; FRIEDRICH, T. C.; O'CONNOR, D. H. Macaque monkeys in Zika virus research: 1947-present. **Curr Opin Virol**, v. 25, p. 34-40, 08 2017. ISSN 1879-6265. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28750247> >.

NG, W. C. et al. The 5' and 3' Untranslated Regions of the Flaviviral Genome. **Viruses**, v. 9, n. 6, 06 2017. ISSN 1999-4915. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28587300> >.

NORONHA, L. et al. Zika virus damages the human placental barrier and presents marked fetal neurotropism. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 5, p. 287-93, May 2016. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27143490> >.

NOWAKOWSKI, T. J. et al. Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Neural Stem Cells. **Cell Stem Cell**, v. 18, n. 5, p. 591-6, 05 2016. ISSN 1875-9777. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27038591> >.

ODENDALL, C.; KAGAN, J. C. The unique regulation and functions of type III interferons in antiviral immunity. **Curr Opin Virol**, v. 12, p. 47-52, Jun 2015. ISSN 1879-6265. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25771505> >.

ONOGUCHI, K. et al. Viral infections activate types I and III interferon genes through a common mechanism. **J Biol Chem**, v. 282, n. 10, p. 7576-81, Mar 2007. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17204473> >.

OTUN, H. A. et al. Effect of tumour necrosis factor- α in combination with interferon- γ on first trimester extravillous trophoblast invasion. **J Reprod Immunol**, v. 88, n. 1, p. 1-11, Jan 2011. ISSN 1872-7603. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21112094> >.

PACANOWSKI, M.; AMUR, S.; ZINEH, I. New genetic discoveries and treatment for hepatitis C. **JAMA**, v. 307, n. 18, p. 1921-2, May 2012. ISSN 1538-3598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22570460> >.

PANCHAUD, A. et al. Emerging Role of Zika Virus in Adverse Fetal and Neonatal Outcomes. **Clin Microbiol Rev**, v. 29, n. 3, p. 659-94, Jul 2016. ISSN 1098-6618. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27281741> >.

PANTOJA, P. et al. Zika virus pathogenesis in rhesus macaques is unaffected by pre-existing immunity to dengue virus. **Nat Commun**, v. 8, p. 15674, Jun 2017. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28643775> >.

PAPA, M. P. et al. Zika Virus Infects, Activates, and Crosses Brain Microvascular Endothelial Cells, without Barrier Disruption. **Front Microbiol**, v. 8, p. 2557, 2017. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29312238> >.

PIJLMAN, G. P. Flavivirus RNAi suppression: decoding non-coding RNA. **Curr Opin Virol**, v. 7, p. 55-60, Aug 2014. ISSN 1879-6265. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24793201> >.

PINTON, P. et al. Toxicity of deoxynivalenol and its acetylated derivatives on the intestine: differential effects on morphology, barrier function, tight junction proteins, and mitogen-activated protein kinases. **Toxicol Sci**, v. 130, n. 1, p. 180-90, Nov 2012. ISSN 1096-0929. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22859312> >.

PONPUAK, M. et al. Secretory autophagy. **Curr Opin Cell Biol**, v. 35, p. 106-16, Aug 2015. ISSN 1879-0410. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25988755> >.

PONTILLO, A. et al. Bacterial LPS differently modulates inflammasome gene expression and IL-1 β secretion in trophoblast cells, decidual stromal cells, and decidual endothelial cells. **Reprod Sci**, v. 20, n. 5, p. 563-6, May 2013. ISSN 1933-7205. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23184659> >.

QUICKE, K. M. et al. Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. **Cell Host Microbe**, v. 20, n. 1, p. 83-90, Jul 2016. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27247001> >.

RABAAN, A. A. et al. Overview of Zika infection, epidemiology, transmission and control measures. **J Infect Public Health**, v. 10, n. 2, p. 141-149, 2017 Mar - Apr 2017. ISSN 1876-035X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27283926> >.

RAGHUPATHY, R.; KALINKA, J. Cytokine imbalance in pregnancy complications and its modulation. **Front Biosci**, v. 13, p. 985-94, Jan 2008. ISSN 1093-9946. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17981605> >.

RANDALL, K. J.; TURTON, J.; FOSTER, J. R. Explant culture of gastrointestinal tissue: a review of methods and applications. **Cell Biol Toxicol**, v. 27, n. 4, p. 267-84, Aug 2011. ISSN 1573-6822. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21384137> >.

REY, F. A.; STIASNY, K.; HEINZ, F. X. Flavivirus structural heterogeneity: implications for cell entry. **Curr Opin Virol**, v. 24, p. 132-139, 06 2017. ISSN 1879-6265. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28683393> >.

ROSSI, S. L. et al. Characterization of a Novel Murine Model to Study Zika Virus. **Am J Trop Med Hyg**, v. 94, n. 6, p. 1362-9, Jun 2016. ISSN 1476-1645. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27022155> >.

ROTH, I. et al. Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. **J Exp Med**, v. 184, n. 2, p. 539-48, Aug 1996. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8760807> >.

ROTH, I.; FISHER, S. J. IL-10 is an autocrine inhibitor of human placental cytotrophoblast MMP-9 production and invasion. **Dev Biol**, v. 205, n. 1, p. 194-204, Jan 1999. ISSN 0012-1606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9882507> >.

RUSSO, F. B.; JUNGSMANN, P.; BELTRÃO-BRAGA, P. C. B. Zika infection and the development of neurological defects. **Cell Microbiol**, v. 19, n. 6, Jun 2017. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28370966> >.

SAMPATH, A.; PADMANABHAN, R. Molecular targets for flavivirus drug discovery. **Antiviral Res**, v. 81, n. 1, p. 6-15, Jan 2009. ISSN 1872-9096. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18796313> >.

SAVIDIS, G. et al. The IFITMs Inhibit Zika Virus Replication. **Cell Rep**, v. 15, n. 11, p. 2323-30, 06 2016. ISSN 2211-1247. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27268505> >.

SLAVOV, S. N. et al. Overview of Zika virus (ZIKV) infection in regards to the Brazilian epidemic. **Braz J Med Biol Res**, v. 49, n. 5, p. e5420, 2016. ISSN 1414-431X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27143174> >.

SUN, Q. H. et al. Effect on expression of RT1-A and RT1-DM molecules of treatment with interferon-gamma at the maternal--fetal interface of pregnant rats. **Hum Reprod**, v. 20, n. 9, p. 2639-47, Sep 2005. ISSN 0268-1161. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15946996> >.

TABATA, T. et al. Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. **Cell Host Microbe**, v. 20, n. 2, p. 155-66, Aug 2016. ISSN 1934-6069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27443522> >.

TIAN, Y. S. et al. Dengue Virus and Its Inhibitors: A Brief Review. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 66, n. 3, p. 191-206, 2018. ISSN 1347-5223. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29491253> >.

TURMEL, J. M. et al. Late sexual transmission of Zika virus related to persistence in the semen. **Lancet**, v. 387, n. 10037, p. 2501, Jun 2016. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27287833> >.

UÇAR, I. et al. The potential teratogenic effects of interferon beta-1a and interferon beta-1b on in vitro embryonic development. **Folia Morphol (Warsz)**, v. 75, n. 2, p. 257-263, 2016. ISSN 0015-5659. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26711647> >.

VAN POUCKE, S. G. et al. Replication of avian, human and swine influenza viruses in porcine respiratory explants and association with sialic acid distribution. **Virol J**, v. 7, p. 38, Feb 2010. ISSN 1743-422X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20158900> >.

VARGAS-ROJAS, M. I.; SOLLEIRO-VILLAVICENCIO, H.; SOTO-VEGA, E. Th1, Th2, Th17 and Treg levels in umbilical cord blood in preeclampsia. **J Matern Fetal**

Neonatal Med, v. 29, n. 10, p. 1642-5, 2016. ISSN 1476-4954. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26135758> >.

VERMILLION, M. S. et al. Intrauterine Zika virus infection of pregnant immunocompetent mice models transplacental transmission and adverse perinatal outcomes. **Nat Commun**, v. 8, p. 14575, Feb 2017. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28220786> >.

VIĆOVAC, L.; JONES, C. J.; APLIN, J. D. Trophoblast differentiation during formation of anchoring villi in a model of the early human placenta in vitro. **Placenta**, v. 16, n. 1, p. 41-56, Jan 1995. ISSN 0143-4004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7716127> >.

VOROU, R. Zika virus, vectors, reservoirs, amplifying hosts, and their potential to spread worldwide: what we know and what we should investigate urgently. **Int J Infect Dis**, v. 48, p. 85-90, Jul 2016. ISSN 1878-3511. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27208633> >.

WEAVER, S. C.; LECUIT, M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. **N Engl J Med**, v. 372, n. 13, p. 1231-9, Mar 2015. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25806915> >.

WIKAN, N.; SMITH, D. R. Zika virus: history of a newly emerging arbovirus. **Lancet Infect Dis**, v. 16, n. 7, p. e119-e126, Jul 2016. ISSN 1474-4457. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27282424> >.

WILCZYŃSKI, J. R. et al. Lymphocyte subset distribution and cytokine secretion in third trimester decidua in normal pregnancy and preeclampsia. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 109, n. 1, p. 8-15, Jul 2003. ISSN 0301-2115. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12818436> >.

WINKLER, C. W. et al. Sexual and Vertical Transmission of Zika Virus in anti-interferon receptor-treated Rag1-deficient mice. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 7176, Aug 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28775298> >.

WU, K. Y. et al. Vertical transmission of Zika virus targeting the radial glial cells affects cortex development of offspring mice. **Cell Res**, v. 26, n. 6, p. 645-54, Jun 2016. ISSN 1748-7838. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27174054> >.

WU, R. H. et al. Mutagenesis of Dengue Virus Protein NS2A Revealed a Novel Domain Responsible for Virus-Induced Cytopathic Effect and Interactions between NS2A and NS2B Transmembrane Segments. **J Virol**, v. 91, n. 12, 06 2017. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28381578> >.

XIE, X. et al. Targeting dengue virus NS4B protein for drug discovery. **Antiviral Res**, v. 118, p. 39-45, Jun 2015. ISSN 1872-9096. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25796970> >.

YE, J. et al. Japanese Encephalitis Virus NS5 Inhibits Type I Interferon (IFN) Production by Blocking the Nuclear Translocation of IFN Regulatory Factor 3 and NF- κ B. **J Virol**, v. 91, n. 8, 04 2017. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28179530> >.

YOCKEY, L. J. et al. Type I interferons instigate fetal demise after Zika virus infection. **Sci Immunol**, v. 3, n. 19, Jan 2018. ISSN 2470-9468. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29305462> >.

YUI, J. et al. Cytotoxicity of tumour necrosis factor-alpha and gamma-interferon against primary human placental trophoblasts. **Placenta**, v. 15, n. 8, p. 819-35, Dec 1994. ISSN 0143-4004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7886023> >.

YUN, S. I.; LEE, Y. M. Zika virus: An emerging flavivirus. **J Microbiol**, v. 55, n. 3, p. 204-219, Mar 2017. ISSN 1976-3794. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28243937> >.

ZHANG, H. L. et al. West Nile Virus NS1 Antagonizes Interferon Beta Production by Targeting RIG-I and MDA5. **J Virol**, v. 91, n. 18, 09 2017. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28659477> >.

ZHANG, L. et al. Interferon gamma is involved in apoptosis of trophoblast cells at the maternal-fetal interface following *Toxoplasma gondii* infection. **Int J Infect Dis**, v. 30, p. 10-6, Jan 2015. ISSN 1878-3511. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25462175> >.

ZHU, Z. et al. Comparative genomic analysis of pre-epidemic and epidemic Zika virus strains for virological factors potentially associated with the rapidly expanding epidemic. **Emerg Microbes Infect**, v. 5, p. e22, Mar 2016. ISSN 2222-1751. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26980239> >.

Capítulo III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ Os explantes de placenta humana a termo são permissivos à infecção por ZIKV, com cargas virais similares, embora Denv2 apresentou pico de carga viral em 24 h.p.i, mas decresceu nos pontos de tempo subsequentes.
- ✓ A cinética da replicação viral coincide com a expressão de citocinas pró-inflamatórias e o aumento de apoptose no tecido infectado. Infecção por Denv2 apresentou menor dano tecidual;
- ✓ Apoptose em tecidos infectados é parcialmente dependente de TNF- α , e o tratamento com anti-TNF- α diminuiu significativamente a ativação de caspase 3 mediada por infecção viral;
- ✓ Tecidos de explantes de placenta humana permaneceram viáveis em cultura durante infecção viral;
- ✓ Cumulativamente, este modelo demonstra que os tecidos placentários humanos são alvo de infecção por ZIKV e que essa infecção é patogênica para o tecido placentário.
- ✓ Neste relatório, demonstramos que o tecido de explante de placenta humana a termo pode ser um modelo útil para estudar a infecção por ZIKV *ex vivo*.

APÊNDICES

Apêndice A- Suplementar Information

Zika Virus infected human full-term placental explants displays inflammatory responses and undergoes apoptosis

Archives of Virology

Milene Rocha Ribeiro^{1,6}, Juscielle Brogin Moreli², Rafael Elias Marques³, Michelle Premazzi Papa⁴, Lana Monteiro Meuren⁴, Paula Rahal¹, Luciana Barros de Arruda⁴, Antonio Helio Oliani⁶, Denise Cristina Mós Vaz Oliani⁶, Sonia Maria Oliani¹, Aarthi Narayanan⁵, Mauricio Lacerda Nogueira⁶.

¹Departament of Biology, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas; São Paulo State University (UNESP), São José do Rio Preto, SP, Brazil.

²Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP, Brazil.

³Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), National Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Campinas, SP, Brazil.

⁴Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

⁵George Mason University, Virginia, United States of America.

⁶Laboratório de Pesquisas em Virologia, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Corresponding author: Dr. Maurício Lacerda Nogueira, mnoqueira@famerp.br
[/mauricio.nogueira@pq.cnpq.br](mailto:mauricio.nogueira@pq.cnpq.br)

Supplementary Fig.A3 **Histological analysis of the placenta**

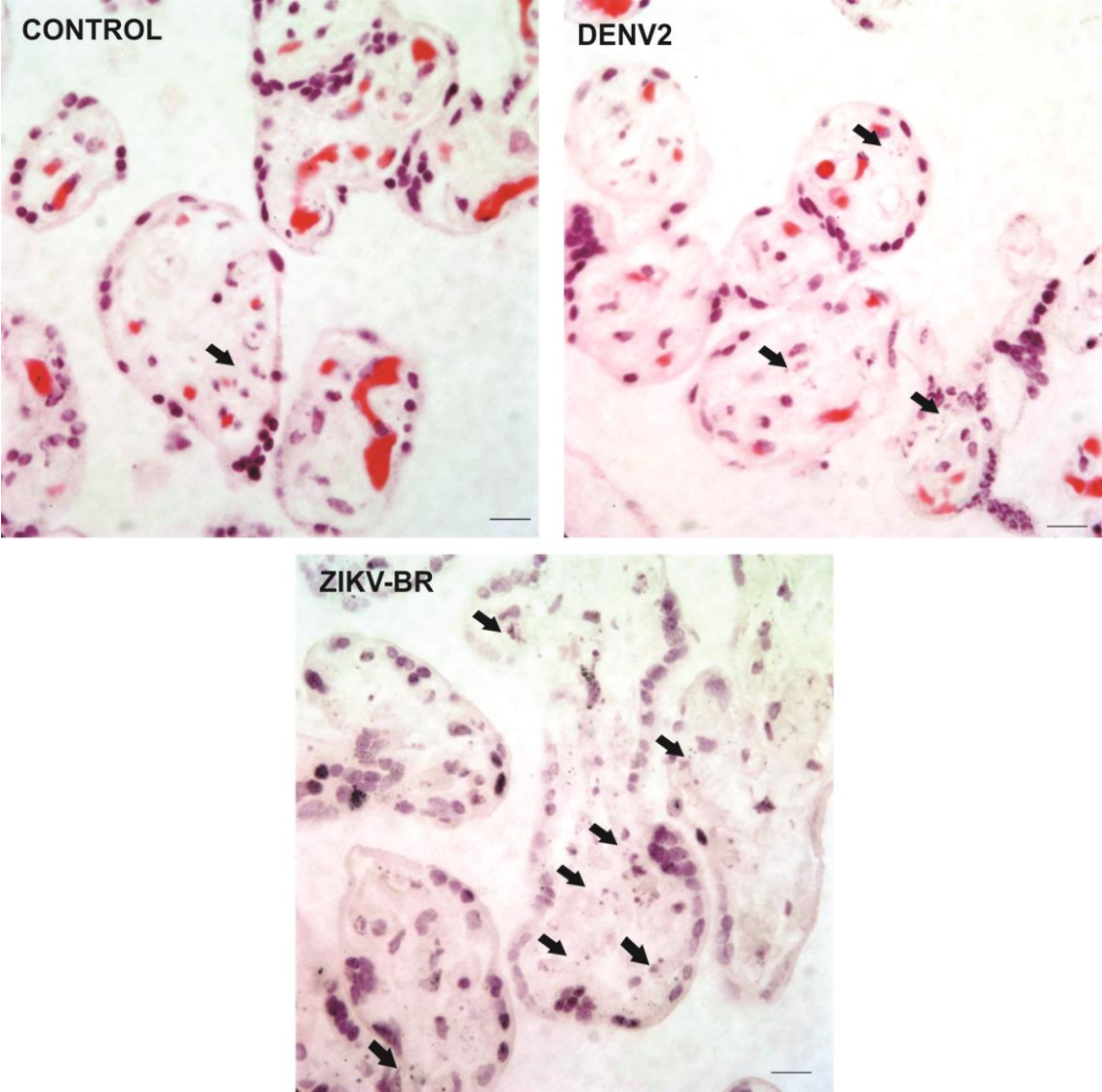


Fig.A3. Histological analysis of the placenta. Human placental explants were uninfected (Control) and infected with ZIKV or DENV after 72hpi. The tissues were stained with hematoxylin and eosin. Black arrows indicate karyorrhexis. Images captured at 100x magnification. Scale bar: 10 μ m

Supplementary Table A2. List of primers used in this study for RT-qPCR

TABLE A2 Primers used for differential gene expression

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
IL-6	5'- TGT GAA AGC AGC AAA GAG GCA CTG -3'	5'- ACA GCT CTG GCT TGT TCC TCA CTA -3'
IL-10	5'- AAT AAG GTT TCT CAA GGG GCT -3'	5'- AGA ACC AAG ACC CAG ACA TCA A -3'
IL-1 β	5'- GTC ATT CGC TCC CAC ATT CT -3'	5'- ACT TCT TGC CCC CTT TGA AT -3'
TNF- α	5'- CAG AGG GAA GAG TTC CCC AGG GAC C -3'	5'- CCT TGG TCT GGT AGG AGA CGG -3'
INF- β	5'- TAG CAC TGG CTG GAA TGA GA -3'	5'- TCC TTG GCC TTC AGG TAA TG -3'
INF- γ	5'-CCA ACG CAA AGC AAT ACA TGA -3'	5'- CCT TTT TCG CTT CCC TGT TTT A -3'
IFN- λ 1	5'- GGG AAG CAG TTG CGA TTT AG -3'	5'- GAT TTG AAC CTG CCA ATG TG -3'
INF- λ 4	5'- AGG GTC CTT AAC CGA CTG TG -3'	5'- AAA CAA CCA ATG CGA TCA AA -3'
GAPDH	5'-GTG GAC CTG ACC TGC CGT CT-3'	5'-GGA GGA GTG GGT GTC GCT GT-3'

Supplementary Table A1. List of primers used in this study for RT-qPCR viral replication

TABLE A1. Primers used for viral replication

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
ZIKV (BR)	5'- CCG CTG CCC AAC ACA AG -3'	5'- CCA CTA ACG TTC TTT TGC AGA CAT-3'
ZIKV-FAM (probe)	5'- AGC CTA CCT TGA CAA GCA GTC AGA CAC TCA A -3'	
DENV2	5'-TTAGAGGAGACCCCTCCC-3'	5'-GAGACAGCAGGATCTCTGG-3'

Apêndice B. Parecer Comitê de Ética

FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSE DO RIO PRETO FAMERP- SP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Pesquisador: Mauricio Lacerda Nogueira

Título da Pesquisa: Análise Proteômica e Avaliação da Replicação Viral em Explante de Tecido Placentário infectados por Zika Virus

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de São Jose do Rio Preto- FAMERP - SP

Versão: 1

CAAE: 55472216.7.0000.5415

Área Temática:

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Número do Parecer: 1.556.533