



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Rafaela Batista Molás Mendes

**Investigação da proteína Anexina A1 em placentas humanas
infectadas por Zika vírus**

São José do Rio Preto
2019

Rafaela Batista Molás Mendes

**Investigação da proteína Anexina A1 em placentas humanas
infectadas por Zika vírus**

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

Financiadora: FAPESP – Processos
2017/09136-3 e 2018/07895-7 (BEPE)

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sonia Maria Olini
Coorientadora: Jusciele Brogin Moreli

São José do Rio Preto
2019

M538i	Mendes, Rafaela Batista Molás Investigação da proteína Anexina A1 em placentas humanas infectadas por Zika vírus / Rafaela Batista Molás Mendes. -- São José do Rio Preto, 2019 69 f. : tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto Orientadora: Profa Dra Sonia Maria Olini Coorientadora: Profa Dra Jusciele Brogin Moreli 1. Inflamação. 2. Anexina A1. 3. Doenças causadas por Flavivírus. 4. Citocinas. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Rafaela Batista Molás Mendes

Investigação da proteína Anexina A1 em placentas humanas infectadas por Zika vírus

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

Financiadora: FAPESP – Processos 2017/09136-3 e 2018/07895-7 (BEPE)

Comissão Examinadora

Prof^a. Dra. Sonia Maria Olini
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientadora

Prof. Dra. Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua
USP – São Paulo

Prof. Dra. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
03 de Abril de 2019

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Imunomorfologia (LIM), do Depto de Biologia, Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), SP, Brasil, sob orientação da Profa. Dra. Sonia Maria Oliani, com apoio financeiro em forma de bolsa de estudos fornecida pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processos nº 2017/09136-3 e BEPE 2018/07895-7) e Auxílio à Pesquisa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processo nº 308144/2014-7) e da FAPESP (Processo nº 2016/02012-4).

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Vera e Leonildo, pelo amor, pelos ensinamentos de união e família, e as minhas irmãs, Ana Heloisa e Larissa, por serem as razões para que eu continue tentando ser uma pessoa melhor,

Ao meu esposo e melhor amigo Allan, pelo companheirismo, apoio e compreensão, e por sempre acreditar na minha capacidade,

Dedico esta tese.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof. Dra. Sonia Maria Oliani

*Primeiramente por ter me recebido como aluna de Iniciação Científica e depois
pela confiança em me aceitar como aluna de pós-graduação;*

*Pela orientação, paciência, dedicação, ensinamentos e incentivo durante todos
esses anos;*

Por ser exemplo e inspiração de cientista e professora;

Por todos os tipos de ensinamento,

Muito obrigada!

À minha co-orientadora Prof. Dra. Jusciele Brogin Moreli

*Pela coorientação desse trabalho de Mestrado, pela paciência e ensinamentos
ao longo dos últimos três anos.*

Por ser um exemplo de pesquisadora e amiga.

Muito obrigada!

À Deus, pelas oportunidades concedidas em meu caminho, e por me fazer aprender em cada momento da minha vida.

Ao IBILCE, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas por ter sido minha segunda casa nesses últimos sete anos, onde tive muitos momentos de alegria e realização.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP), por possibilitar a realização desse trabalho.

À Coordenadora do Programa do Programa de Pós-Graduação em Biociências do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP), Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos, pelo apoio nos momentos de necessidade.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelas Bolsas de Estudo e Estágio de Pesquisa no Exterior (FAPESP, processo nº 2017/09136-3 e 2018/07895-7).

Aos Professores Drs Denise Mos Vaz Oliani e Antonio Hélio Oliani, pela coleta das amostras de placentas.

Ao Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira e Dra. Milene Rocha Ribeiro pela realização dos PCR em Tempo Real Multiplex (Fourplex) para detecção do vírus Zika e expressão da ANXA1.

À Dra Suchita Nadkarni, supervisora do estágio *na Queen Mary University of London – UK*, pelos ensinamentos e convívio.

Aos meus queridos companheiros do Laboratório de Imunomorfologia, com os quais compartilhei experiências, trabalhos e cafés, Jusciele, Mab, Mayk, Monielle, Thaís, Juliana, Julliene, Janesly, Raquel. Diariamente trocando experiências que somaram ao meu aprendizado.

À minha segunda família, Silvana, Miguel e Gustavo, por terem acompanhado de perto essa longa jornada e conquistas desde meu primeiro dia na universidade.

Aos meus amigos e familiares, especialmente à minha avó Rita, pelo apoio e incentivo.

Aos meus amigos da graduação, com os quais compartilhei momentos de alegria, angústias e reflexões.

*“A verdadeira motivação vem de realização, desenvolvimento pessoal,
satisfação no trabalho e reconhecimento.”*

(Herzberg, Mausner, & Snyderman, 1993)

RESUMO

Introdução: A associação da infecção por Zika vírus (ZIKV) com malformação congênita e sequelas neurológicas trouxe uma preocupação global significativa. Estudos recentes têm mostrado que a infecção viral induz altos níveis de inflamação nas vilosidades placentárias. Neste contexto, a proteína anti-inflamatória anexina 1 (ANXA1) tem sido avaliada especialmente em células de defesa e associada com atividades antiparasitárias em explantes placentários infectados. Embora esses efeitos tenham sido explorados em diversas investigações, suas atividades ainda não estão completamente esclarecidas em placentas infectadas com ZIKV. **Objetivos:** Avaliar o envolvimento da proteína ANXA1 em placentas de mães infectadas pelo ZIKV. **Materiais e métodos:** Com o sangue materno e placentas, usando a técnica PCR em tempo real, foi possível classificar três grupos de estudo: (i) Neg/Neg (mãe e placenta negativas para o vírus), (ii) Pos/Neg (mãe infectada com vírus e placenta negativa) e (iii) Pos/Pos (mãe e placenta infectadas com vírus). Os fragmentos placentários foram fixados, incluídos em parafina e analisados para presença do ZIKV (anti-flavivirus 4g2), estruturalmente e para imunomarcações de células trofoblásticas (citoqueratina), mesenquimais e endoteliais (vimentina) e vasos (α -sma). As células inflamatórias foram analisadas por imunofluorescência e os níveis das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , IL-8 pelo analisador Multiplex Magpix. A expressão da ANXA1 foi avaliada por imunohistoquímica, *Western blott* e PCR em tempo real. **Resultados:** A presença do vírus ZIKV no grupo Pos/Pos mostra placentas com alterações estruturais, incluindo descolamento e desorganização do sinciciotrofoblástico. A infecção materna por ZIKV desencadeou resposta inflamatória na placenta, observada pelo recrutamento de células inflamatórias e aumento dos níveis de citocinas. Esses dados podem ser relacionados com a diminuição da idade gestacional e peso dos recém-nascidos. A ANXA1 foi altamente expressa no sinciciotrofoblasto nos grupos estudados, com diminuição na expressão gênica e proteica nos grupos infectados. Esses resultados apontam um mecanismo de defesa para evitar a infecção placentária. **Conclusões:** Em conjunto, nossos resultados mostram que a infecção materna por ZIKV é suficiente para desenvolver uma resposta inflamatória placentária, possivelmente modulando a

ANXA1. Esses dados são inovadores e podem abrir um novo caminho para exploração futura dos mecanismos de ação dessa proteína no processo gestacional.

Palavras-chave: Placenta humana; Sinciciotrofoblasto; Inflamação; Neutrófilos; Citocinas; Anexina A1;

ABSTRACT

Introduction: The association of Zika virus infection (ZIKV) with congenital malformation and neurological sequelae brought a significant global concern. Recent studies have shown that maternal viral infection induces inflammation in the placental tissue. In this context, the antiinflammatory protein annexin 1 (ANXA1) has been specially related to resolution of inflammation through multiple mechanisms and associated with antiparasitic activity in infected placental explants. Although these effects have been explored in several investigations, its activities have not yet been fully elucidated in placentas infected with ZIKV. **Objectives:** This study was conducted to evaluate the involvement of ANXA1 in placentas of ZIKV-infected mothers. **Methods:** With maternal blood and placenta, using the rt-PCR technique, It was classified three study groups: Neg/Neg (mother and placenta negative for the virus), Pos/Neg (infected mother, but no virus detected in placenta) and Pos/Pos (mother and placenta infected with ZIKV). Placental fragments were fixed, embedded in paraffin and analyzed for the presence of ZIKV (anti-flavivirus 4g2), structurally, and immunohistochemistry for trophoblast (cytokeratin), mesenchymal and endothelial cells (vimentin) and arterial vessels (α -sma). Inflammatory cells were analyzed by immunofluorescence (CD-3, CD-15 and CD45 positive cells) and levels of the cytokines IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , IL-8 by the Magpix Multiplex analyzer. ANXA1 expression was assessed by immunohistochemistry, Western blot and real-time PCR. **Results:** The presence of ZIKV in the Pos/Pos group shows placentas with structural alterations, including detachment and disorganization of the syncytiotrophoblast. Maternal infection by ZIKV triggered an placental inflammatory response, observed by recruitment of inflammatory cells and increased levels of cytokines. In the syncytiotrophoblast, ANXA1 was expressed in nuclei and cytoplasm, and its expression was decreased in mother/placenta infected specimens. These results points to a mechanism of placental defense to avoid infection. In summary, our results show that maternal infection with ZIKV is able to develop a placental inflammatory response, which might be related to the ANXA1 modulation. These data are innovative and might open a

new path of future exploration of this protein mechanism of action in the gestational process.

Keywords: Human placenta; Syncytiotrophoblast; Inflammation; Neutrophils; Cytokines; Annexin A1;

Lista de ilustrações

Figura 1. Esquema de uma secção transversal de placenta a termo.....	23
Figura 2. Estrutura do vírus Zika e seu genoma.....	24
Figura 3. Rotas usadas por patógenos para superar a membrana placentária.....	26
Figura 4. Representação esquemática da ANXA1.....	27
Figura 5. Diversas ações biológicas da ANXA1.....	28

Lista de tabelas do manuscrito

Tabela 1: Maternal clinical background and perinatal results.....	49
--	----

Lista de figuras do manuscrito

Figure 1. Immunolocalization of ZIKV envelope protein positive cells.....	49
Figure 2. Histopathological analysis and cellular characterization of placental tissue.....	50
Figure 3. Immunohistochemical and quantitative analysis of terminal villi and vessels.....	51
Figure 4. Immunofluorescence and quantification of inflammatory cells in placental fragments.....	52
Figure 5. Cytokine analysis in the placental homogenate.....	53
Figure 6. Immunolocalization and expression of ANXA1 mRNA and protein in infected placental tissue.....	53

Lista de abreviações

ANXA1	Annexina A1
A-sma	Alfa smooth muscle actin
B-actin	Beta actina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DAB	Diaminobenzidina
FGF-2	Fibroblast growth factor 2
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IL-1B	Interleucina 1-beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleuxina 8
IL-10	Interleucina 10
IUGR	Intra uterine growth restriction
IHC	Imunohistoquímica
IF	Imunofluorescência
Neg/Neg	Negativo/Negativo
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Polimerase chain reaction
Pos/Neg	Positivo Negativo
Pos/Pos	Positivo/Positivo
RT-PCR	Real time polimerase chain reaction
RNA	Ácido ribonucleico
TBS	Tris-buffered saline
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha
ZIKV	Zika virus

Apresentação

Alguns fundamentos do papel da proteína anxeína A1 (AnxA1) foram relatados nessa investigação. Os resultados dessa dissertação de Mestrado originaram o manuscrito intitulado “The involvement of Annexin A1 human placental response to maternal infection of Zika virus” (**CAPÍTULO 1**).

Paralelamente ao trabalho de Mestrado, outro artigo relacionado com a proteína Anexina A1 e angiogênese, intitulado “*Ac2-26 peptide and serine protease of Bothrops atrox similarly induces angiogenesis without triggering local and systemic inflammation in a murine model of dorsal skinfold chamber*”, foi publicado na revista *Toxicon* (**ANEXO A**).

Sumário

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 A placenta humana	21
1.2 Zika vírus	23
1.3 Proteína Anexina A1	26
2 OBJETIVOS.....	30
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
3 CAPÍTULO 1	32
Abstract	34
3.1 Introduction	35
3.2 Material and Methods	36
3.2.1 Study design, subjects and placental samples.....	36
3.2.2 Diagnosis for zikv and separation of study groups	36
3.2.3 Histopathological analyzes	36
3.2.4 Immunohistochemical detection of 4g2, vimentin, cytokeratin 7, α -sma and anxa1	36
3.2.5 Immunofluorescence analysis for immune cells	37
3.2.6 Capillarization index of placental villi	37
3.2.7 Placental homogenate.....	37
3.2.8 Cytokine profile	38
3.2.9 Anxa1 protein expression by Western blot	38
3.2.10 Rna extraction, cdna synthesis and expression of anxa1 messenger RNA.....	38
3.2.11 Statistical analysis.....	39
3.3 Results	39
3.3.1 Maternal clinical background and perinatal outcomes evaluation	39
3.3.2 Localization of zikv in placental fragments.....	39
3.3.3 Histopathological analysis	39
3.3.4 Analysis of inflammatory cells in zikv infected villi.....	40
3.3.6 Maternal zikv infection modulated anxa1 expression in placenta	40
3.4 Discussion	40
3.5 Conflict of interest	43
3.6 Acknowledgements	43
3.7 Author contributions	43
3.8 List of abbreviations	43
3.9 Ethics	44
3.10 References.....	44

3.11 Tables.....	49
3.12 Figures.....	49
4 DISCUSSÃO.....	55
5 CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS	61
ANEXOS	67
Anexo A – Artigo publicado durante o mestrado.....	68
Anexo B - Aprovação do comitê de ética do CEP/CONEP.....	69

1 INTRODUÇÃO



1.1 A Placenta Humana

A placenta é um órgão complexo formado por estruturas de diferentes origens, morfologia e funções: o cório frondoso (porção fetal) e a decídua basal (porção materna). Esse órgão desempenha atividades funcionais na maioria dos órgãos fetais desde o início até o momento do parto (BENIRSCHKE; KAUFMANN; BAERGEN, 2006). Dentre as muitas atividades desempenhadas pela placenta, se destacam as trocas gasosas, absorção molecular, excreção, produção de hormônios e proteínas regulatórias, hematopoese e regulação imunológica (BENIRSCHKE; KAUFMANN; BAERGEN, 2006). Esse complexo controle das funções placentárias é fundamental para o desenvolvimento do embrião, e inclui muitas vias de sinalização, proteínas regulatórias, hormônios e fatores de crescimento (BENIRSCHKE et al., 2012).

No início da gestação, processos críticos como proliferação e diferenciação predominam no trofoblasto, e culminam com a formação das vilosidades e estruturas extravilosas (BENIRSCHKE; KAUFMANN; BAERGEN, 2006). Esses processos estão relacionados a fatores secretados por diferentes tipos celulares fetais e endometriais, dentre os quais se destacam os fatores de crescimento epidérmico, de crescimento endotelial vascular e ainda, várias citocinas que regulam a funcionalidade placentária e o consequente crescimento embrionário/fetal durante toda a gestação (BURTON; JAUNIAUX; CHARNOCK-JONES, 2007; PIETRO et al., 2010).

O processo de angiogênese é essencial para o sucesso gestacional. O estabelecimento de uma vascularização adequada na decídua placentária é crucial para atender às demandas fetais durante toda a gestação. A adaptação vascular na decídua inclui angiogênese e remodelação vascular, processos necessários para as trocas moleculares metabólicas e gasosas na interface materno-fetal, por sua vez o cório cresce para formar as vilosidades coriônicas, caracterizadas por um crescimento e diferenciação da mesenquima vascularizado e do trofoblasto (BENIRSCHKE et al., 2012).

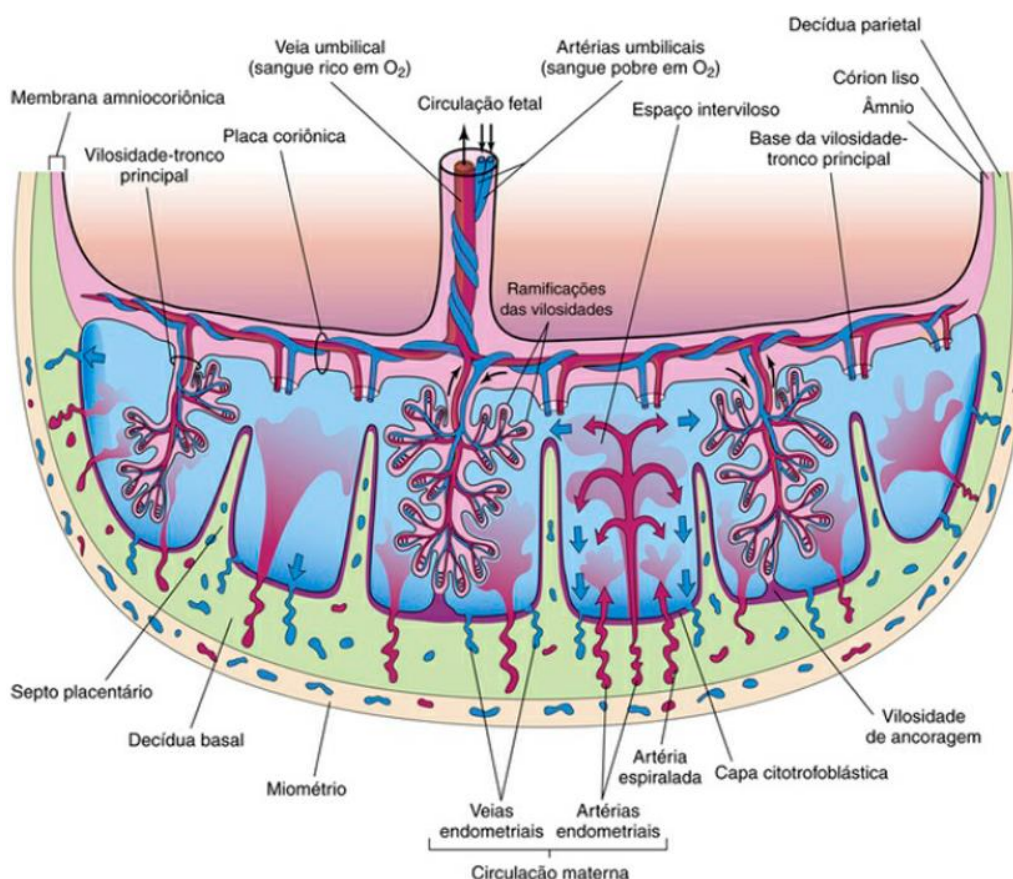
A formação da placenta tem início com a diferenciação do trofoblasto em citotrofoblasto e sinciotrofoblasto. As células do citotrofoblasto possuem alta atividade proliferativa e dão origem ao sinciotrofoblasto. Este é responsável pela síntese e secreção do hormônio gonadotrofina coriônica humana e mantém contato direto com o tecido materno, sendo assim, um componente-chave no estabelecimento da interface materno-fetal (HUPPERTZ; GHOSH; SENGUPTA, 2014).

Durante a formação dos vilos coriônicos, a unidade placentária de trocas entre mãe e feto, as células do citotrofoblasto proliferam ocupando áreas centrais nas placas de sinciotrofoblasto formando estruturas digitiformes, as vilosidades. Posteriormente, o

mesoderma extraembrionário (derivado da massa celular interna) também migra para áreas centrais ao citotrofoblasto, formando o cório (mesoderma extraembrionário + trofoblasto). O mesoderma extraembrionário forma o estroma dos vilos coriônicos, com células mesenquimais, fibroblastos e miofibroblastos. Outros componentes do estroma do vilos são as células de Hofbauer (macrófagos placentários) e os vasos fetais (BENIRSCHKE; KAUFMANN; BAERGEN, 2006; HUPPERTZ; GHOSH; SENGUPTA, 2014). As vilosidades continuam seu desenvolvimento, ramificam e formam diferentes segmentos durante toda a gestação, atingindo seu grau máximo ao final da gestação (BENIRSCHKE; KAUFMANN; BAERGEN, 2006).

A membrana placentária é uma estrutura que consiste em tecidos que separam o sangue materno do fetal. Ao longo do desenvolvimento embrionário, células citotrofoblásticas desaparecem em muitas áreas das vilosidades, e a membrana torna-se marcadamente mais delgada e atenuada, deixando somente a camada do sinciotrofoblasto. Com isso, a membrana placentária consiste na maioria dos locais em três camadas: sinciotrofoblasto, tecido conjuntivo das vilosidades e endotélio dos capilares fetais (MOORE, 2016). A grande área de superfície desta membrana permite que o transporte de substâncias entre sangue fetal e o materno seja facilitado. Esta membrana atua como barreira e, sabe-se que, muitas drogas, substâncias do sangue materno e mesmo agentes infecciosos são capazes de atravessar a membrana placentária (MOORE et al, 2016, COYNE AND LAZEAR 2016; SANTOS et al, 2019;). A Figura 1 mostra um esquema de uma secção transversal de placenta a termo, onde é possível observar a parte fetal (cório viloso) e materna (decídua basal), além da circulação placentária e vilosidades.

Figura 1: Esquema da secção transversal de placenta a termo. Relação do cório frondoso (parte fetal da placenta) com a decídua basal (parte materna da placenta). É possível observar a circulação placentária fetal e materna, onde o sangue materno flui das artérias espiraladas para os espaços intervilosos. Observe as artérias umbilicais transportam sangue fetal pobremente oxigenado (mostrado em azul) para a placenta e veia umbilical transporta sangue oxigenado (mostrado em vermelho) para o feto. Os septos placentários, projeções da decídua basal formam os cotilédones que consistem em duas ou mais vilosidades-tronco principais e várias ramificações das vilosidades. (Adaptado de MOORE, 2016).



Estudos que permitem a compreensão dos mecanismos que atuam na fisiopatologia placentária são de extrema relevância e podem auxiliar na compreensão das muitas complicações que comprometem a gestação e a saúde fetal. Fatores conhecidos que podem comprometer o desenvolvimento da placenta e, consequentemente, do feto incluem: carência de nutrientes, distúrbios glicêmicos, infecções virais e bacterianas, desordens hipertensivas, tabagismo, alcoolismo e doenças autoimunes entre outros (BENIRSCHKE; KAUFMANN; BAERGEN, 2006).

Evidências recentes mostram que essas intercorrências na interface materno-fetal estão associadas com resultados perinatais adversos e consequências na vida adulta (TEDNER; ÖRTQVIST; ALMQVIST, 2012; VO; HARDY, 2012), o que reforça a importância de estudos envolvendo a resposta placentária frente aos insultos que podem acompanhar a gestação como a infecção pelo vírus Zika.

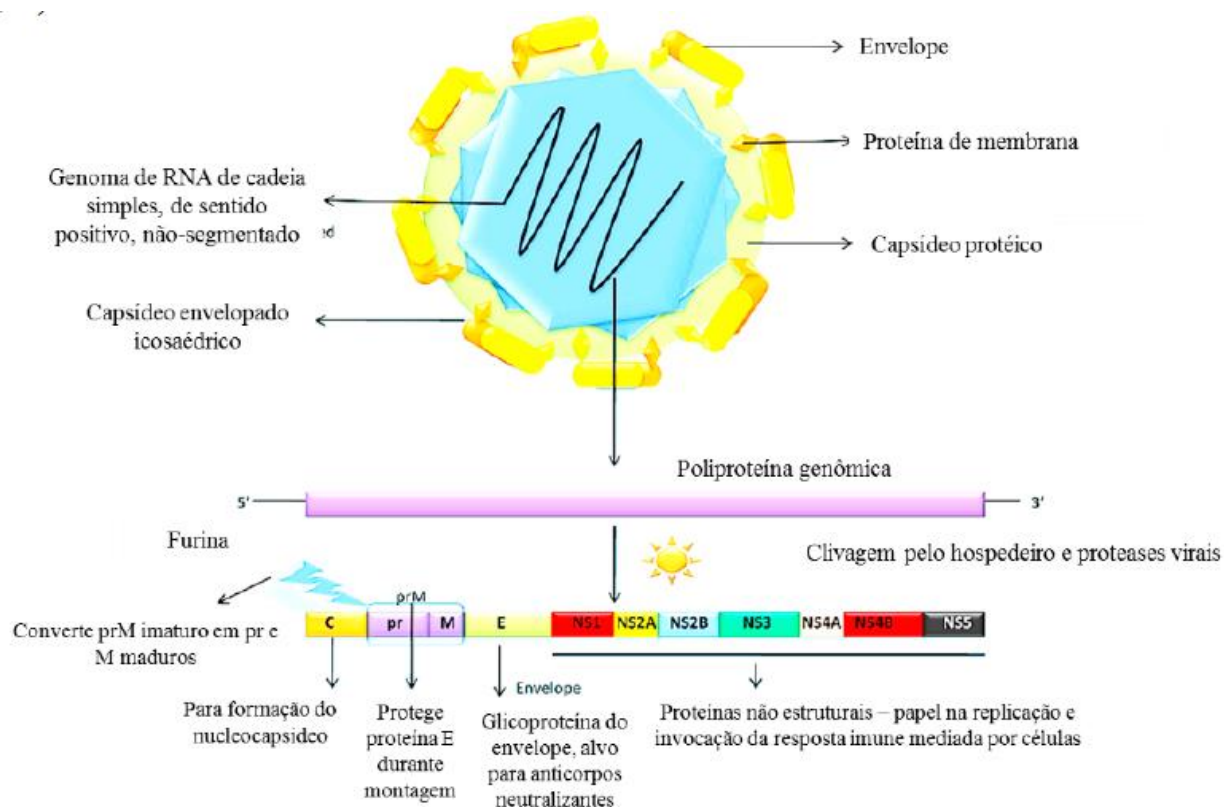
1.2 Zika Vírus

O Zika vírus (ZIKV) foi isolado, pela primeira vez, em 1947, em macaco Rhesus na Floresta de Zika, em Uganda, no continente africano. Este vírus tem sido um problema proeminente, com inúmeras infecções relatadas em diversas partes do mundo, com grandes surtos registrados nas ilhas Yap (2007), Polinésia Francesa (2013), e especialmente, no Brasil (2015) (LAZEAR; DIAMOND, 2016). O ZIKV trata-se de um

membro da família Flaviviridae, do gênero *Flavivirus*. É um arbovírus, e sua transmissão ocorre principalmente por mosquitos hematófagos do gênero *Aedes*. No entanto, diferente dos demais flavivírus, a transmissão também ocorre por vias não-tradicionais, isto é, transmissão sexual e vertical (FRANK et al., 2016; FRÉOUR et al., 2016).

O ZIKV possui um genoma de RNA, fita simples, traduzido em uma única poliproteína de 3423 aminoácidos. Quando clivada, da origem a três proteínas estruturais: envelope (E), pré-membrana (prM) e capsídeo (C), as quais compõem a partícula viral, empacotando o genoma do vírus e participando da interação do vírus com a célula hospedeira. Ainda, origina sete proteínas não estruturais requeridas em sua morfogênese e etapas de replicação (Cunha et al., 2016; White et al., 2016; Blitvich e Firth, 2015). A Figura 2 mostra a estrutura do vírus Zika, incluindo suas proteínas estruturais, não estruturais, e seu genoma.

Figura 2. Estrutura do vírus Zika e seu genoma. O vírus Zika apresenta sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) e três estruturais (C, prM, E). Adaptado. (SINGH et al., 2016).



A infecção por ZIKV está fortemente associada com a ocorrência de microcefalia em recém-nascidos de mães infectadas com esse vírus (SILVA DE OLIVEIRA; FERNANDO DA COSTA VASCONCELOS, 2016). A associação desta infecção com malformação congênita e sequelas neurológicas trouxe uma preocupação global

significativa. Recente estudo retrospectivo, envolvendo gestantes brasileiras infectadas com ZIKV, demonstrou que 29% dos fetos apresentaram resultados adversos como microcefalia, restrição de crescimento intra-uterino e morte fetal (BRASIL et al., 2016). Resumidamente, os achados de estudos envolvendo modelos animais confirmam a hipótese que a infecção durante a gestação causa injúria placentária, e que o ZIKV é propagado para o cérebro fetal destruindo células neuronais progenitoras (CARTEAUX et al., 2016; CUGOLA et al., 2016; MLAKAR et al., 2016; SARNO et al., 2016). Esse fato provavelmente contribui para microcefalia e as demais malformações observadas nos neonatos de gestações humanas.

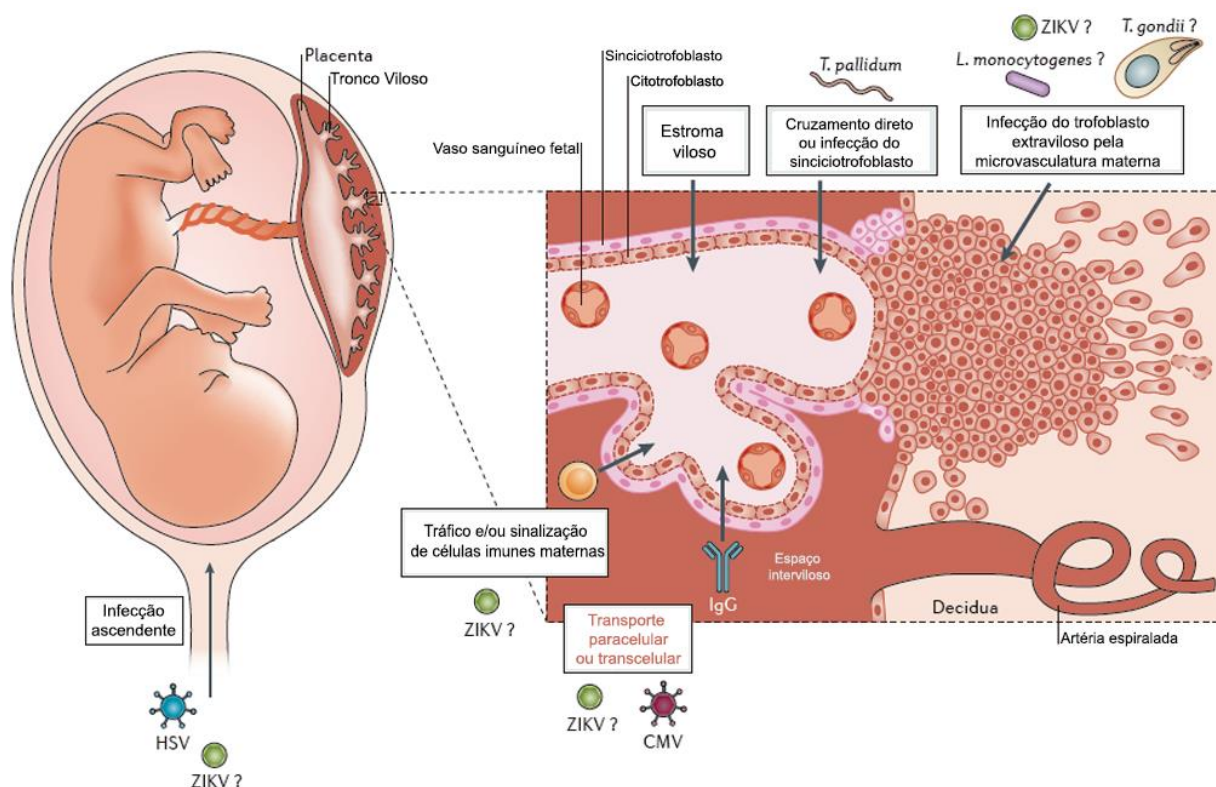
Segundo Coyne & Lazear (2016), a transmissão vertical de patógenos da mãe para o feto pode ocorrer por várias vias, incluindo: (i) infecção de células endoteliais maternas e propagação por meio do trofoblasto extraviloso (células que ancoram as vilosidades na parede uterina); (ii) tráfico de células imunes maternas infectadas através da membrana placentária; (iii) transporte celular; (iv) sangue materno infectado que ultrapassa as vilosidades chegando aos capilares fetais; (v) danos estruturais nas vilosidades como fissuras na camada de sinciciotrofoblasto e (vi) infecção ascendente ou transvaginal.

Neste contexto é importante considerar que, para alcançar as células do sistema nervoso fetal, alguns microrganismos devem ultrapassar a membrana placentária, que geralmente é eficaz na prevenção da passagem de microrganismos da circulação materna para o embrião. As consequências de erros nessa prevenção são as doenças congênitas, dentre elas *Toxoplasma gondii*, *Listeria monocytogenes*, *Treponema pallidum* e, ainda, os vírus da imunodeficiência humana (HIV), rubéola, citomegalovírus, varicela zoster, influenza A e ZIKV (COYNE; LAZEAR, 2016; LIEBERMAN et al., 2011). Quando a infecção viral materna ocorre, pode ocasionar a replicação viral produtiva na placenta e a uma resposta inflamatória fetal que pode ter resultados deletérios, mesmo que o vírus nem sempre seja detectado no feto (HIRSCH et al., 2018a).

A figura 3 mostra possíveis rotas usadas por patógenos para ultrapassar a membrana placentária, incluindo tráfico de células imunes maternas, infecção direta da camada do sinciciotrofoblasto, infecção do trofoblasto pela microvasculatura e/ou infecção intravaginal ascendente.

Figura 3: Rotas usadas por patógenos para superar a membrana placentária. Há várias rotas pelas quais o Zika vírus e outros patógenos conhecidos como TORCH (*Toxoplasma gondii*, outros, rubéola virus, cytomegalovirus (CMV) e herpes simplex virus (HSV)) podem ser transmitidos verticalmente, o que varia de acordo com a idade gestacional. Algumas potenciais rotas incluem: tráfico de células imune maternas; infecção direta da camada do sinciciotrofoblasto; Infecção do

trofoblasto extraviloso pela microvasculatura materna; e/ou infecção intravaginal ascendente. IgG, imunoglobulina G (Adaptado de COYNE; LAZEAR, 2016).



Estudos que envolvem a transmissão vertical durante a gravidez são extremamente importantes. Algumas terapias antivirais que reduzem a carga viral materna podem diminuir o risco da transmissão vertical, como no caso de HIV (LIOTTA et al., 2015; STEVENS; LYALL, 2014). Novas estratégias terapêuticas estão em desenvolvimento para prevenção da transmissão vertical do ZIKV e outros patógenos. No entanto, esses estudos necessitam de melhor compreensão dos mecanismos usados pelos microrganismos para atravessar a membrana placentária e causar doença fetal (LIOTTA et al., 2015; STEVENS; LYALL, 2014).

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem investigado diversos papéis que a proteína anexina A1 (ANXA1) desempenha, em diferentes modelos de inflamação (OLIANI et al, 2001; GASTARTELO et al, 2009), angiogênese (LACERDA et al, 2018) e, mais recentemente, demonstrou que essa proteína está relacionada com a proliferação do *Toxoplasma gondii* em vilos placentários (DE OLIVEIRA CARDOSO et al., 2018a).

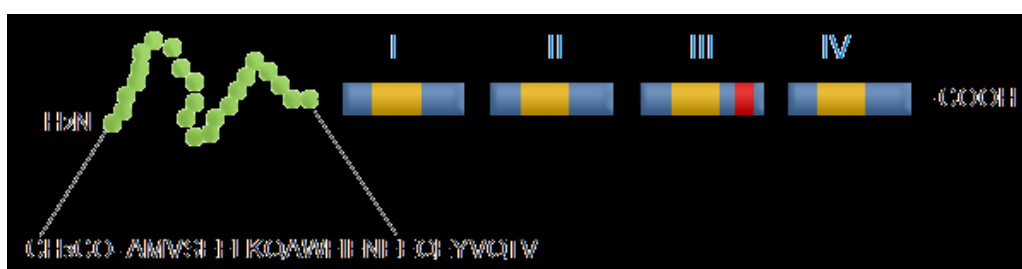
1.3 Proteína Anexina A1

A anexina A1 foi o primeiro membro caracterizado da superfamília das anexinas que se ligam aos fosfolipídios de uma forma dependente de cálcio. Inicialmente essa

proteína foi denominada lipocortina 1 pelo fato de mimetizar a ação anti-inflamatória dos glicocorticóides, afetando muitos componentes da via inflamatória. Classicamente, a ANXA1 é considerada um potente inibidor da síntese dos eicosanóides e da atividade da enzima fosfolipase A2 induzidas pelos glicocorticóides (FLOWER, 1988; GASTARDELO et al., 2009; OLIANI; DAMAZO; PERRETTI, 2002). O gene da ANXA1 humana está localizado no cromossomo 9 (9q12-21.2) e codifica uma proteína de 37 kDa.

Estruturalmente, as anexinas compreendem dois domínios: uma pequena região N-terminal (região funcional) que pode variar em comprimento e composição e um domínio central, formada por quatro a oito dobras de uma sequência de 70 a 80 aminoácidos, altamente conservada (LIM; PERVAIZ, 2007; LIZARBE et al., 2013; MUNN; MUES, 1986).

Figura 4: Representação esquemática da ANXA1. Estrutura primária da proteína anti-inflamatória, com destaque do sítio ativo anti-inflamatório (peptídeo Ac2-26) (RESCHER et al., 2004).

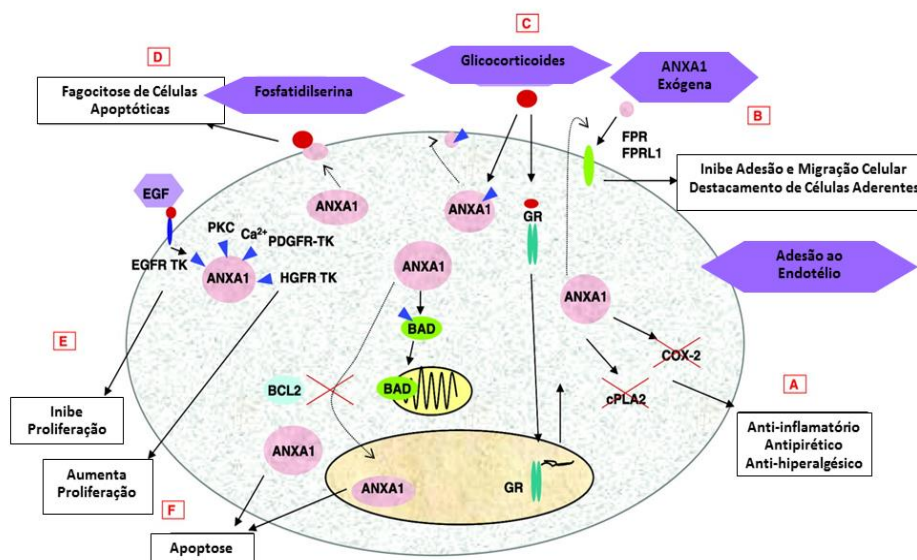


A ANXA1 é constitutiva e não é uma proteína órgão-específica, todavia não são todos os tipos celulares que a expressam em abundância, tendo como principais fontes as células que constituem a defesa do organismo, seja física como no caso das células epiteliais, imunológica como os leucócitos e células inflamatórias do tecido conjuntivo (PRIULI, 2012). No processo inflamatório, várias células expressam essa proteína: neutrófilos (OLIANI et al., 2000, 2001), mastócitos (OLIANI et al., 2000, 2008), eosinófilos (OLIANI; DAMAZO; PERRETTI, 2002), monócitos (SOLITO et al., 2000) e linfócitos (D'ACQUISTO; PERRETTI; FLOWER, 2008). Na placenta a ANXA1 foi primeiramente imunolocalizada no sinciotrofoblasto (SUN; LIU; GIBB, 1996) e, posteriormente, no citotrofoblasto (DE OLIVEIRA CARDOSO et al., 2018).

Várias investigações tem mostrado que a região N-terminal da ANXA1 é a responsável pela ação anti-inflamatória e anti-proliferativa desta proteína, o que foi confirmado pelos resultados experimentais com os peptídeo-miméticos (sequências curtas de 1,5 a 3,5 KDa da região N-terminal), tais como o peptídeo Ac2-26

((D'ACQUISTO; PERRETTI; FLOWER, 2008; TEIXEIRA et al., 2016). Além do envolvimento da ANXA1 com os processos inflamatórios, outras funções foram atribuídas a essa proteína como fagocitose, aumento e/ou redução da proliferação e apoptose, como demonstrado na figura 5 (LIM & PERVAIZ, 2007).

Figura 5. Diversas ações biológicas da ANXA1. **A)** Inibição da atividade da fosfolipase A2 citosólica (cPLA2) e ciclooxigenase 2 (COX-2) com consequente efeito anti-inflamatório, antipirético e anti-hiperalgésico. **B)** ANXA1 exógena atua sobre seu receptor de formil peptídeo (FPR) e lipoxina A4 (FPRL1), para inibir a adesão, migração celular e desprendimento de células aderentes. **C)** Aumento da expressão de ANXA1 com o tratamento de glicocorticoides e ação por meio receptor de glicocorticoide (GR), fato que contribui para a sua atividade anti-inflamatória. Glicocorticoides podem também induzir a fosforilação rápida e translocação da ANXA1 para membrana celular. **D)** ANXA1 é recrutada para a superfície celular, liga-se a PS e intercede no engolfamento de células apoptóticas. **E)** ANXA1 pode ser fosforilada por uma série de quinases para aumentar ou diminuir a proliferação. **F)** A ANXA1 pode induzir a apoptose por meio da indução da desfosforilação de BAD, permitindo que BAD transloque para as mitocôndrias. Outra forma é a translocação da ANXA1 para o núcleo, que pode ser inibida por BCL2. Figura adaptada de Lim e Pervaiz, 2007.



Estudo recente demonstrou que a ANXA1 possui atividade antiparasitária em explantes placentários infectados com *Toxoplasma gondii* e tratados com o peptídeo Ac2-26 (região funcional da ANXA1) (DE OLIVEIRA CARDOSO et al., 2018b). Por outro lado, camundongos knockout para ANXA1, infectados pelo vírus influenza A, exibem vantagem de sobrevivência relacionada em níveis mais baixos de vírus após infecção e aumento da infiltração de células inflamatórias (ARORA et al., 2016). No mesmo estudo também foi

demonstrado que: (i) ANXA1 aumenta a ligação do vírus à célula hospedeira e aumenta a endocitose do vírus; (ii) a replicação viral é em células que expressam ANXA1 e (iii) ANXA1 intensifica a apoptose e consequente replicação viral. Os autores concluíram que a ANXA1 desempenha um papel importante na replicação do vírus da gripe e propagação por meio de vários mecanismos e consideram que a regulação da expressão ANXA1, durante essa infecção, pode ser uma estratégia para combater o vírus (ARORA et al., 2016).

Ressaltando a importância desses achados e as diversas atividades biológicas descritas para ANXA1, investigar o papel dessa molécula na placenta infectada por ZIKV é de extrema relevância para a compreensão dos mecanismos envolvidos nessa infecção e, principalmente, pode ser uma estratégia de tratamento.

2 OBJETIVOS



2.1 Objetivo Geral

O objetivo do estudo foi caracterizar e avaliar a função da proteína ANXA1 no trofoblasto infectado pelo ZIKV, podendo revelar novos alvos para desenvolvimento de estratégias de controle dessa infecção.

2.2 Objetivos específicos

Investigar em placentas controles e infectadas por ZIKV:

- x Histopatologia;
- x Imunolocalização do 4G2 (marcador da proteína E de flavivírus), vimentina (marcador de células decíduais e endoteliais), citoqueratina7 (marcador de trofoblasto), α -SMA (marcador de células endoteliais) e ANXA1;
- x Análise morfométrica de vilos e vasos
- x Análise de Imunofluorescência para investigar infiltração de leucócitos na placenta (CD45) e marcadores específicos de neutrófilos (CD15) e linfócitos (CD3).
- x Perfil de citocinas no homogenato placentário (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , IL-8) por ensaio Multiplex.
- x Expressão Proteica da ANXA1 (*Western blot*);
- x Expressão do RNA mensageiro da ANXA1 (PCR em tempo real);

Manuscrito será submetido à revista *Antiviral Research*.

Publisher: Elsevier

ISSN: 0166-3542

Impact Factor: 4.307

The involvement of Annexin A1 in human placental response to maternal Zika virus infection

Rafaela Batista Molás^a, Milene Rocha Ribeiro^a, Denise Vaz Oliani^b, Antonio Hélio Oliani^b, Suchita Nadkarni^c, Maurício Lacerda Nogueira^d, Jusciele Brogin Moreli^e Sonia Maria Oliani^{a*}.

^a Departament of Biology, School of Biosciences, Humanities and Exact Sciences, São Paulo State University (UNESP), São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

^b Department of Gynecology and Obstetrics, São José do Rio Preto School of Medicine (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brazil.

^c The William Harvey Research Institute, Barts and the London School of Medicine, Queen Mary University of London, London, United Kingdom;

^d Department of Dermatological, Infectious, and Parasitic Diseases, São José do Rio Preto School of Medicine (FAMERP), São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

^e Post-graduation in Structural and Functional Biology, Federal University of São Paulo (UNIFESP), SP, Brazil and Faceres School of Medicine, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

***Corresponding author.** Sonia Maria Oliani.

Departmente of Biology, School of Biosciences, Humanities and Exact Sciences, São Paulo State University (UNESP), São José do Rio Preto, Rus Cristovão Colombo, 2265, CEP 15054, São Paulo, Brazil. **E-mail:** sonia.oliani@unesp.br

Abstract

The association of Zika virus infection (ZIKV) with congenital malformation and neurological sequelae brought a significant global concern. Recent studies have shown that maternal viral infection induces inflammation in the placental tissue. In this context, the antiinflammatory protein annexin 1 (ANXA1) has been specially related to resolution of inflammation through multiple mechanisms and associated with antiparasitic activity in infected placental explants. Although these effects have been explored in several investigations, its activities have not yet been fully elucidated in placentas infected with ZIKV. This study was conducted to evaluate the histopathology, inflammatory process and the involvement of ANXA1 in placentas of ZIKV-infected mothers. It was classified three study groups: Neg/Neg (mother and placenta negative for the virus), Pos/Neg (infected mother, but no virus detected in placenta) and Pos/Pos (mother and placenta infected with ZIKV). The presence of ZIKV in the Pos/Pos group shows placentas with structural alterations, including detachment and disorganization of the trophoblastic epithelium. Maternal infection by ZIKV (regardless of placenta infection) triggered an inflammatory response, observed by recruitment of inflammatory cells and increased levels of cytokines in placenta. In the syncytiotrophoblast cells, ANXA1 was expressed in nuclei and cytoplasm of all studied groups, and its expression was decreased after maternal infection. In summary, our results show that maternal infection with ZIKV is sufficient to develop a placental inflammatory response which might be related to ANXA1 modulation. Nevertheless, structural alterations in villous was observed only after placental infection. We envisage that ANXA1 can be harnessed as a therapeutic strategy in gestational process and ZIKV infection.

Key words: Human Placenta; Syncytiotrophoblast; Inflammation; Neutrophils; Annexin A1

3.1 Introduction

Zika virus (ZIKV) infection is strongly associated with adverse perinatal outcomes when mothers are infected. The route of this virus to damage fetal nervous system include placental barrier, which is generally effective in preventing the passage of microorganisms from the maternal circulation to the embryo / fetus (ALDO et al., 2016). According to Coyne & Lazear (2016), those are: (i) infection of maternal endothelial cells and propagation through the extravillous trophoblast; (ii) trafficking of infected maternal immune cells through the placental barrier; (iii) infected maternal blood that passes the villi reaching the fetal capillaries; (iv) ascending or transvaginal infection. Despite placental protection mechanisms, some microorganisms may overcome the membrane and cause congenital diseases, including *Toxoplasma gondii*, *Treponema pallidum*, human immunodeficiency virus (HIV), rubella, cytomegalovirus, influenza A and ZIKV (COYNE; LAZEAR, 2016; LIEBERMAN et al., 2011).

Currently, few treatments are effective in preventing vertical transmission during pregnancy. New therapeutic strategies are under development to prevent ZIKV and other pathogens transmissions during pregnancy. However, these studies require a better understanding of the mechanisms used by microorganisms to cross the placental barrier and cause fetal disease (LIOTTA et al., 2015; STEVENS; LYALL, 2014).

In the past years, our research group has investigated several roles that the protein annexin A1 (ANXA1) plays in different models of inflammation and, more recently, in prevention of placental infection by *Toxoplasma gondii* (DE OLIVEIRA CARDOSO et al., 2018a; STUQUI et al., 2015). ANXA1 is a glucocorticoid-induced protein initially reported as an inhibitor of inflammation (FLOWER, 1988). In the placenta ANXA1 location was first described on syncytiotrophoblast surfaces (SUN; LIU; GIBB, 1996) and later in the cytotrophoblast (DE OLIVEIRA CARDOSO et al., 2018a). Therefore, our group has investigated the expression of ANXA1 in decidual cells, trophoblast, and stroma in partial and complete hydatidiform moles, showing its expression mainly in cytotrophoblast and syncytial knots (DE OLIVEIRA CARDOSO et al., 2018a). In virus infections, ANXA1 plays an important role in the replication of influenza virus and spread through various mechanisms. It has been considered that the regulation of ANXA1 expression during this infection may be a strategy to combat the virus (ARORA et al., 2016).

Highlighting the importance of these findings, we hypothesized that ZIKV infection can induce placental inflammation, ANXA1 modulation and tissue disrupt with consequent placental dysfunction. Considering the important role of ANXA1 in the inflammatory

response, the endogenous expression of this protein was evaluated in term placentas of mothers infected with ZIKV.

3.2 Material and methods

3.2.1 Study design, subjects and placental samples.

This cross-sectional study included placental fragments of pregnant women with suspected Zika virus infection collected at the Children's and Maternity Hospital of São José do Rio Preto (SP). The placental fragments were collected after elective cesarean section deliveries. Placenta samples from pregnant women with others infections, positive serology for HIV and syphilis were excluded. Placental tissues were washed in ice-cold sterile PBS (pH 7.2) and aseptically dissected using a microscope to remove endometrial tissue and fetal membranes up to 1h after collection. We collected a total of 10 control and 12 infected fragments, in a total of 22 placental samples.

3.2.2 Diagnosis for ZIKV and separation of study groups

The detection of ZIKV RNA from maternal blood and placental fragments was performed using a RT-PCR assay with TaqMan technology (1-step RT-qPCR system, GoTaq® probe, REF AG120) according to Centers for Disease Control and Prevention protocol (CDC, USA). According to PCR results samples were classified in the following studies groups: mother and placenta negative (Neg/Neg - control group), positive mother and negative placenta (Pos/Neg) and both mother and placenta infected (Pos/Pos). Still, data as maternal age, gestational age at delivery, pathologies associated, smoke habits, newborns weight and malformation presence were collected from the records of these mothers.

3.2.3 Histopathological analyzes

Fragments of each placental sample were fixed in 4% buffered paraformaldehyde for 24 hours, dehydrated in graded ethanol, and embedded in paraffin (Merck, Darmstadt, Germany). Sections of 3µm were stained with Hematoxylin-Eosin and analysed using a high-power objective (40x) on an Axioskop 2-Mot plus microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany).

3.2.4 Immunohistochemical detection of 4G2, vimentin, cytokeratin 7, α-sma and ANXA1

Placental fragments were incubated in sodium citrate buffer for antigenic recovery and after peroxidase blockade, fragments were incubated in Bovine Serum Albumin (BSA-

Sigma, Missouri, USA), 10% for blocking and stained for 4G2 monoclonal antibody (1:100, kindly given by Professor Mauro Teixeira, from Federal University of Minas Gerais), Vimentin and α -SMA (1:250, 1:150 respectively, Dako, Cambridge, UK), Cytokeratin 7 (1:250, Abcam, Massachusetts, USA), Annexin A1 (1:3000, Invitrogen, California, USA) at 4°C overnight followed by staining with anti-rabbit/mouse secondary antibody (1:500, Abcam, Massachusetts, USA) for 1 h at room temperature. Slides were washed and incubated on diaminobenzidine substrate (DAB) for 3 min at room temperature in the dark (Kit DAB + CHROMOGEN DAKO), stained with Hematoxylin and mounted on slides with Entelan (Merck, Darmstadt, Germany). All fragments were analyzed on an Axioskop 2-Mot plus microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). Image analysis was performed using Image J (NIH, Maryland, USA).

3.2.5 Immunofluorescence analysis for immune cells

Antigen retrieval was carried out using sodium citrate buffer. Placental sections were stained for cells CD15⁺ (neutrophils), CD3⁺ (T lymphocytes), CD45⁺ (leukocytes); (AbD Serotec; clone ER-MP12) at 4 °C overnight, followed by staining with secondary antibodies mouse Alexa Fluor 555 and mouse Alexa Fluor 488 along with nuclear stain DAPI (Life Technologies, California, USA). The slides were assembled in Vectashield (Vector Laboratories, California, USA), and stored in the dark. Immunofluorescence images were acquired on a Leica Ariol System at 20× magnification. Image analysis was performed using Image J. (NIH, Maryland, USA).

3.2.6 Capillarization index of placental villi

After immunostaining of α -sma, photomicrograph of terminal villi and vessels were taken in 20 x magnification. It was analyzed a total of five images/slide. The total and mean area of villi, the number and area of vessels and capillarization index (%) was accessed according to CALDERON, et. al, 2007. The mean area of villi and vessels was analyzed using Image J software (NIH, Maryland, USA).

3.2.7 Placental homogenate

Fragments of frozen placental tissue were transferred to propylene tubes containing lysis buffer (Merck, Darmstadt, Germany) and a cocktail of protease inhibitors (Complete Mini, EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets, Roche, Switzerland). The placenta samples were homogenized using an electric homogenizer on ice. After, the homogenates were centrifuged at 12.000rpm for 15min at 4°C. The protein concentration in the supernatant was measured using a BCA protein assay (Pierce TM BCA Protein Assay Kit, Thermo

Scientific, USA) and then stored in -80°C freezer for quantification of cytokines and ANXA1 by Western Blot.

3.2.8 Cytokine profile

The placental homogenates were used to quantify the IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α and IL-8 cytokines levels using the MILLIPLEX MAP Kit. The same amount of protein was used for analysis. Standards, control solutions and samples were prepared following the manufacturer's instructions (Merck, Darmstadt, Germany) and added on the test plate with magnetic beads coated with specific antibodies. After overnight incubation at 4°C, the biotin-bound detection antibody was added and, one hour later, phycoerythrin conjugated to streptavidin was also added. The reading was performed by LUMINEX xMAP MAGPIX (Merck, Darmstadt, Germany). The concentration of the analytes was determined by the MAGPIX xPONENT software (Millipore Corporation, Massachusetts, USA).

3.2.9 ANXA1 protein expression by Western Blot

The same amount of total protein was used in all groups. Proteins were separated electrophoretically using 15% SDS-PAGE before being transferred to a 0.45 μ m to nitrocellulose membrane (Millipore, Massachusetts, USA). Transfer was confirmed by staining the membranes with a 10% Ponceau S solution (Sigma Aldrich, Missouri, USA). The blotted membranes were blocked with TBS-T-milk 3% for 1 h and washed 3 times with TBS buffer before being incubated at 4°C with anti- β actin (1:2000; Novus Biologicals, Centennial, USA) and anti-ANXA1 (1:5000; Invitrogen, California, USA) in TBS-T-milk 3% overnight and washed 3 times with TBS buffer. The membranes were exposed to horseradish peroxidase-conjugated antibody (1:1000, Abcam, Cambridge, UK) in TBS-T-milk 3% for 1 h and washed 3 times with TBS buffer. Immunoreactive bands (peroxidase activity) were detected by the Enhanced chemiluminescence method (ECL). The quantitative analysis of ANXA1 was measured by densitometry using Image J software (NIH, Maryland, USA). β -actin was used as the loading control.

3.2.10 RNA extraction, cDNA synthesis and expression of ANXA1 messenger RNA

Placental fragments were frozen with RNAlater® (Ambion, California, USA) and used for subsequent extraction of RNA by TRIzol, according to the manufacturer's instruction (Invitrogen, California, USA). RNA quantification was performed using the Nano Drop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA).

For complementary DNA (cDNA) synthesis, the enzyme reverse transcriptase M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus, Sigma, Missouri, USA) was used. Briefly, oligo (dT)

primer, 1µl of RNA, 1µl of 10mM dNTP mixture and nuclease free water (total volume of 10µl) were mixed. The samples were incubated at 70°C for 5 min and then placed on ice. In the remaining components, 2µl of the 10X enzyme buffer, 1µl of M-MLV reverse transcriptase, 0.5µl of the RNase inhibitors and 6.5µl of nuclease-free water were added. Samples were incubated at 37°C for 50 min and then heated at 94°C for 10 min to denature the M-MLV reverse transcriptase..

The cDNA samples were quantified in Nano Drop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) and amplified by the real-time PCR technique with ANXA1 specific probes by TaqMan® assay (TaqMan® Universal Master Mix II, Applied Biosystems, California, USA). For all experiments, the endogenous GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) gene was also amplified. The $2^{-\Delta\Delta CT}$ analysis method was used with the GAPDH gene for normalization.

3.2.11 Statistical analysis

Data were analyzed using GraphPad software version 7.00. The Kolmogorov-Smirnov test was applied to determine the normality of the data. Analysis of variance (ANOVA) was performed for samples with normal distribution, followed by Bonferroni post-test. In the case of non-normal distribution, the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test was applied. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3.3 Results

3.3.1 Maternal clinical background and perinatal outcomes evaluation

Pregnancies of Neg/Neg and Pos/Pos groups were older. The gestational age at delivery was lower in the Pos/Pos group and their newborns had the lowest weight. Nevertheless, no malformations were observed (Table 1).

3.3.2 Localization of ZIKV in placental fragments

Immunodetection (Figure 1A-C) of ZIKV envelop protein E in placental fragments confirmed the presence of ZIKV in Pos/Pos group. ZIKV was located in perinuclear region of stromal cells (Figure 1C).

3.3.3 Histopathological analysis

Hematoxylin and eosin (Figure 2 A-C), vimentin (Figure 2 D-G) and cytokeratin 7 (Figure 2 H-K) were performed to evaluate the cellular characterization and structural integrity of

villi in infected or non-infected placental fragments (Figure 2). The syncytiotrophoblast and stroma rich in fetal blood vessels were observed. In ZIKV infected fragments (Pos/Pos) (Figure 2 C,F,J), changes such as detachment and disorganization of syncytiotrophoblast were observed. These structural alterations were not observed in the Neg/Neg group (Figure 2 A,D,H) or Pos/Neg (Figure 2 B,E,I).

The total area of terminal villi, mean area and terminal villi number was similar in infected groups and control. The ZIKV infection did not change capillarization index among the groups (Figure 3).

3.3.4 Analysis of inflammatory cells in ZIKV infected villi

Quantification of neutrophils (CD15⁺ cells) on placental fragments revealed an increase in Pos/Neg (Figure 4 B,D,E) and Pos/Pos (Figure 4 C,D,E) groups in relation to Neg/Neg (Figure 4 A,D,E), while lymphocytes (CD3⁺ cells) recruitment presented no significant difference between groups (Figure 4 F-I).

3.3.5 Cytokines profile in the placental homogenate

The expression pattern of IL-1 β , IL-10 and TNF- α was increased in Pos/Neg group in relation to Neg/Neg and Pos/Pos groups (Figure 5 A-C). In addition, levels of IL-8 increased in Pos/Neg when compared to Neg/Neg (Figure 5 D). However, IL-6 levels were similar among all experimental conditions (Figure 5 E).

3.3.6 Maternal ZIKV infection modulated ANXA1 expression in placenta

The expression of ANXA1 was investigated in chorionic villous fragments. Strong ANXA1 immunoreactivity was mainly seen in the syncytiotrophoblast cytoplasm and nuclei and syncytial knots (Figure 6 A-C). A decrease in placental ANXA1 expression (mRNA and protein) was observed in Pos/Neg and Pos/Pos groups compared to Neg/Neg group (Figure 6 E-G).

3.4 Discussion

Studies that allow the understanding of the mechanisms that act in placental pathophysiology are extremely relevant and may help in understanding the many complications that compromise pregnancy and fetal health. There are many factors that can compromise placental and fetal development, including viral infections (BRASIL et al., 2016). Our results showed that placentas with ZIKV infection presented structural alterations, including detachment and disorganization of the trophoblast. Regardless the

presence of the virus in the placenta, maternal infection triggered an inflammatory response, observed by recruitment of inflammatory cells and increased levels of cytokines in placenta. The exacerbated inflammation in these placentas may be related to decrease of ANXA1 expression observed.

The placenta provides a protective barrier for the vertical transmission of viral particles in most cases (COYNE; LAZEAR, 2016). The presence of the virus in placental tissue was confirmed by staining of ZIKV envelope protein that was located in perinuclear region of stromal cells of villi. As demonstrated by Cortese et al. (2017), the replication of this flavivirus occurs on the surface of the endoplasmic reticulum in cytoplasmic viral plants corroborating with our findings.

There are emerging evidences linking histopathological changes and ZIKV infection (NORONHA et al, 2016; SANTOS et al., 2019). We observed structural damages in placental villi as syncytiotrophoblast lesions and disorganization, as well as destruction of the fetal connective tissue in the Pos/Pos group. Trophoblastic cells are important components of the placental barrier, involved in the mechanism of protection and architectural changes observed in our results are reported in the literature (EL COSTA et al., 2016; SANTOS et al., 2019). Chronic placentitis with chronic villous inflammation was observed in human placenta infected by ZIKV when compared to normal villous tissue (NORONHA et al., 2016). Recently, SANTOS and colleagues (2019) described morphologic and molecular changes such as hyperplasia of Hofbauer cells and elevated expression of Bcl-2 (apoptosis inhibitor) in chorionic villi after ZIKV vertical transmission.

The angiogenesis process is essential for gestational success (PIETRO et al., 2010). Zika virus can disrupt placental vascularization, and that this damage in blood vessels may disrupt oxygen transport to the fetus, which can restrict its growth and lead to stillbirth, among other conditions (HIRSCH et al., 2018). Differently, no statistical difference was observed in capillarization index between infected and control groups, however, the fetal weight was lower in Pos/Pos group, which may be related with structural damage observed.

Our study determined that maternal infection of ZIKV is sufficient to induce placental inflammatory response. The inflammation was confirmed by neutrophil infiltration, increased inflammatory cytokines as well as tissue damage. Neutrophils are typically known as short-lived cells that act as the first line of defense to pathogens and highly responsive to flavivirus infection (NADKARNI et al., 2016). In addition, studies in Rhesus Monkeys have shown that innate immune cells, including those of neutrophil origin can be

infected with ZIKV (HIRSCH, 2017). Neutrophils also express a large repertoire of G-protein-coupled receptors that recognize endogenous molecules released during inflammation, such as cytokines (MAYADAS; CULLERE; LOWELL, 2014). Cytokine production is a significant part of the immune response during pregnancy (BROGIN MORELI et al., 2012). Quantification of cytokines in placental homogenate revealed increased expression of IL-1 β , IL-10, TNF- α , and IL-8 in the Pos/Neg group. Our findings suggest a mechanism of placental defense against the possible ZIKV infection in the Pos/Neg group, whereas Pos/Pos group response was not able to prevent ZIKV infection.

Several investigations indicate that the absence of response correlates with the lethal effect of ZIKV on the trophoblast (ALDO et al., 2016; BOWEN et al., 2017). Interestingly, in a murine study model, no virus was detected in the fetuses of mothers infected with Murine Herpes Virus (SILASI et al., 2015). However, although they were not detected, evidence of a fetal inflammatory response was observed, as demonstrated by elevated levels of IL-1, MCP-1, IFN- γ and TNF- α , corroborating our findings on the inflammatory response in the Pos/Neg group. Silasi and colleagues (2015) further suggest that this immune response of the fetal-placental unit during pregnancy may have far-reaching consequences, leading to adverse outcomes in postnatal development. The augmentation of inflammatory response in placental infection might have reduced fetal weight in our study group.

Inflammation is essential to protect the host from exogenous and endogenous dangers that ultimately lead to tissue injury (GOBBETTI; COORAY, 2016). In this context, ANXA1 has emerged as an anti-inflammatory protein and associated with antiparasitic activities in infected placental explants (DE OLIVEIRA CARDOSO, 2018). Although these effects have been explored in several investigations, its activities have not yet been fully elucidated in placentas infected with ZIKV. We observed that immunostaining of the ANXA1 antiinflammatory protein expressed in the nucleus and cytoplasm of the syncytiotrophoblast of placental fragments, as demonstrated previously (SUN; LIU; GIBB, 1996). We uncovered that its expression was reduced in placentas from mothers infected with ZIKV. These findings suggest that maternal ZIKV infection is enough to develop a placental inflammatory response, which might be related to ANXA1 modulation. Interestingly, study from Arora and colleagues (2016) demonstrates that ANXA1 plays an important role in influenza virus replication and suggest that the regulation of ANXA1 expression during IAV infection may be a viral strategy to enhance its infectivity. Our findings with ANXA1 have not been reported previously in association with human ZIKV

infection and opens new path for future exploration in the mechanisms of this protein in infected placenta.

In summary, our results envisage that maternal infection with ZIKV is sufficient to develop a placental inflammatory response by an increase in cytokines and inflammatory cells recruitment, possibly related to the modulation of ANXA1. Structural changes including detachment and disorganization of the syncytiotrophoblast are observed only after placental infection, leading to placental dysfunction and reduced fetal weight. Our study sheds additional light on the outcomes of ZIKV infection in trophoblast and in the involvement of ANXA1 in the placental biology.

3.5 Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

3.6 Acknowledgements

This work was supported by Grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2017/09136-3 and 2018/07895-7 to R.B.M and 2016/02012-4 to S.M.O) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Grants 308144/2014-7 to S.M.O.).

3.7 Author Contributions

R.B.M. designed and performed all experiments and wrote the manuscript. M.R.R. contributed with real time PCR analysis. D.V.O and A. H. O. provided the placenta fragments. S. N. contributed with immunofluorescence analysis. M.L.N. contributed with diagnosis of Zika virus and collection of infected placentas. J.B.M. contributed to the study, helped with the experiments and wrote the manuscript. S.M.O. conceived and coordinated the design of the study, obtained funding for the project, evaluated the results, contributed to drafting the manuscript and supervised the process.

3.8 List of abbreviations

ANXA1	Annexin A1
α-sma	Alfa-smooth muscle actin
β-actin	Beta actin
cDNA	Complementary eoxyribonucleic acid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DAB	Diaminobenzidin

GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
IL-1B	Interleukin 1-beta
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IL-10	Interleukin 10
IHC	Immunohistochemistry
IF	Immunofluorescence
Neg/Neg	Negative/Negative
PCR	Polimerase chain reaction
Pos/Neg	Positive/Negative
Pos/Pos	Positive/Positive
RT-PCR	Real time polimerase chain reaction
RNA	Ribonucleic acid
TBS	Tris-buffered salin
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alfa
ZIKV	Zika virus

3.9 Ethics

The placental collection was approved by the Ethical Research Board of the institution (CAAE: 58067719.9.0000.5415) (Anexo B). Written informed consent was obtained from all subjects according to the principles of the Declaration of Helsinki.

3.10 References

ALDO, P. et al. HSV-2 enhances ZIKV infection of the placenta and induces apoptosis in first-trimester trophoblast cells. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 76, n. 5, p. 348–357, nov. 2016.

ARORA, S. et al. Influenza A virus enhances its propagation through the modulation of Annexin-A1 dependent endosomal trafficking and apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, v. 23, n. 7, p. 1243–1256, 4 jul. 2016.

BENIRSCHKE, K.; KAUFMANN, P.; BAERGEN, R. N. **Pathology of the human placenta**. [s.l.] Springer, 2006.

BOWEN, J. R. et al. Zika Virus Antagonizes Type I Interferon Responses during Infection of Human Dendritic Cells. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 2, p. e1006164, 2 fev. 2017.

BRASIL, P. et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 24, p. 2321–2334, 15 dez. 2016.

BROGIN MORELI, J. et al. Interleukin 10 and tumor necrosis factor-alpha in pregnancy: aspects of interest in clinical obstetrics. **ISRN obstetrics and gynecology**, v. 2012, p. 230742, 2012.

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E.; CHARNOCK-JONES, D. S. Human early placental development: potential roles of the endometrial glands. **Placenta**, v. 28 Suppl A, p. S64-9, abr. 2007.

CARTEAUX, G. et al. Zika Virus Associated with Meningoencephalitis. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 16, p. 1595–1596, 21 abr. 2016.

COYNE, C. B.; LAZEAR, H. M. Zika virus — reigniting the TORCH. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 11, p. 707–715, 30 nov. 2016.

CUGOLA, F. R. et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, v. 534, n. 7606, p. 267–271, 9 jun. 2016.

D'ACQUISTO, F.; PERRETTI, M.; FLOWER, R. J. Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. **British journal of pharmacology**, v. 155, n. 2, p. 152–69, set. 2008.

DE OLIVEIRA CARDOSO, M. F. et al. Annexin A1 peptide is able to induce an anti-parasitic effect in human placental explants infected by *Toxoplasma gondii*. **Microbial Pathogenesis**, v. 123, p. 153–161, 1 out. 2018a.

DE OLIVEIRA CARDOSO, M. F. et al. Annexin A1 peptide is able to induce an anti-parasitic effect in human placental explants infected by *Toxoplasma gondii*. **Microbial Pathogenesis**, v. 123, p. 153–161, 9 out. 2018b.

EL COSTA, H. et al. ZIKA virus reveals broad tissue and cell tropism during the first trimester of pregnancy. **Scientific reports**, v. 6, p. 35296, 2016.

FLOWER, R. J. Eleventh Gaddum memorial lecture. Lipocortin and the mechanism of action of the glucocorticoids. **British journal of pharmacology**, v. 94, n. 4, p. 987–1015, ago. 1988.

FRANK, C. et al. Sexual transmission of Zika virus in Germany, April 2016. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 23, p. 30252, 9 jun. 2016.

FRÉOUR, T. et al. Sexual transmission of Zika virus in an entirely asymptomatic couple returning from a Zika epidemic area, France, April 2016. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 23, p. 30254, 9 jun. 2016.

GASTARDELO, T. S. et al. Functional and Ultrastructural Analysis of Annexin A1 and Its Receptor in Extravasating Neutrophils during Acute Inflammation. **The American Journal of Pathology**, v. 174, n. 1, p. 177–183, jan. 2009.

GOBBETTI, T.; COORAY, S. N. Annexin A1 and resolution of inflammation: tissue repairing properties and signalling signature. **Biological Chemistry**, v. 397, n. 10, 1 jan. 2016.

HIRSCH, A. J. et al. Zika virus infection in pregnant rhesus macaques causes placental dysfunction and immunopathology. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 263, 2018a.

HIRSCH, A. J. et al. Zika virus infection in pregnant rhesus macaques causes placental

dysfunction and immunopathology. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 263, 17 dez. 2018b.

HORN, L.-C.; RÖSE, I. Placental and Fetal Pathology in Intrauterine Viral Infections. **Intervirolgy**, v. 41, n. 4–5, p. 219–225, 1998.

HUPPERTZ, B.; GHOSH, D.; SENGUPTA, J. An integrative view on the physiology of human early placental villi. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 114, n. 1, p. 33–48, 1 jan. 2014.

LACERDA, J. Z. et al. Annexin A12-26 Treatment Improves Skin Heterologous Transplantation by Modulating Inflammation and Angiogenesis Processes. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 1015, 10 set. 2018.

LAZEAR, H. M.; DIAMOND, M. S. Zika Virus: New Clinical Syndromes and Its Emergence in the Western Hemisphere. **Journal of Virology**, v. 90, n. 10, p. 4864–4875, 15 maio 2016.

LIEBERMAN, R. W. et al. Seasonal influenza A (H1N1) infection in early pregnancy and second trimester fetal demise. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 1, p. 107–9, jan. 2011.

LIM, L. H. K.; PERVAIZ, S. Annexin 1: the new face of an old molecule. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 4, p. 968–975, abr. 2007.

LIOTTA, G. et al. Elimination of Mother-To-Child Transmission of HIV Infection: The Drug Resource Enhancement against AIDS and Malnutrition Model. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 12, n. 10, p. 13224–13239, 21 out. 2015.

LIZARBE, M. et al. Annexin-Phospholipid Interactions. Functional Implications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 2, p. 2652–2683, 28 jan. 2013.

MAYADAS, T. N.; CULLERE, X.; LOWELL, C. A. The Multifaceted Functions of Neutrophils. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 9, n. 1, p. 181–218, 24 jan. 2014.

MLAKAR, J. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 10, p. 951–958, 10 mar. 2016.

MOORE, K. L. **Embriologia Clínica**. 10 edition ed. [s.l.] Elsevier, 2016.

MUNN, T. Z.; MUES, G. I. Human lipocortin similar to ras gene products. **Nature**, v. 322, n. 6077, p. 314–315, 24 jul. 1986.

NADKARNI, S. et al. Neutrophils induce proangiogenic T cells with a regulatory phenotype in pregnancy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 52, p. E8415–E8424, 27 dez. 2016.

NORONHA, L. DE et al. Zika virus damages the human placental barrier and presents marked fetal neurotropism. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 5, p. 287–93, maio 2016.

OLIANI, S. M. et al. An immunocytochemical and in situ hybridization analysis of annexin 1 expression in rat mast cells: modulation by inflammation and dexamethasone.

Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, v. 80, n. 9, p. 1429–38, set. 2000.

OLIANI, S. M. et al. Neutrophil interaction with inflamed postcapillary venule endothelium alters annexin 1 expression. **The American journal of pathology**, v. 158, n. 2, p. 603–15, fev. 2001.

OLIANI, S. M. et al. Fluctuation of annexin-A1 positive mast cells in chronic granulomatous inflammation. **Inflammation Research**, v. 57, n. 10, p. 450–456, 2 out. 2008.

OLIANI, S. M.; DAMAZO, A. S.; PERRETTI, M. Annexin 1 localisation in tissue eosinophils as detected by electron microscopy. **Mediators of inflammation**, v. 11, n. 5, p. 287–92, out. 2002.

PIETRO, L. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-receptor expression in placenta of hyperglycemic pregnant women☆. **Placenta**, v. 31, n. 9, p. 770–780, set. 2010.

RAGHUPATHY, R.; KALINKA, J. Cytokine imbalance in pregnancy complications and its modulation. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 13, p. 985–94, 1 jan. 2008.

RESCHER, U. et al. Annexin 2 is a phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding protein recruited to actin assembly sites at cellular membranes. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 16, p. 3473–3480, 15 jul. 2004.

SANTOS, G. R. et al. Case Report. **International Journal of Gynecological Pathology**, p. 1, 14 fev. 2019.

SARNO, M. et al. Zika Virus Infection and Stillbirths: A Case of Hydrops Fetalis, Hydranencephaly and Fetal Demise. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. e0004517, 25 fev. 2016.

SILASI, M. et al. Viral Infections During Pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 73, n. 3, p. 199–213, mar. 2015.

SILVA DE OLIVEIRA, C.; FERNANDO DA COSTA VASCONCELOS, P. Microcephaly and Zika virus Microcefalia e vírus zika. **Jornal de Pediatria (Versão em Português)**, v. 92, n. 2, p. 103–105, 2016.

SINGH, R. K. et al. Zika virus - emergence, evolution, pathology, diagnosis, and control: current global scenario and future perspectives - a comprehensive review. **The Veterinary quarterly**, v. 36, n. 3, p. 150–75, 2 set. 2016.

SOLITO, E. et al. Annexin 1 binds to U937 monocytic cells and inhibits their adhesion to microvascular endothelium: involvement of the alpha 4 beta 1 integrin. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 165, n. 3, p. 1573–81, 1 ago. 2000.

STEVENS, J.; LYALL, H. Mother to child transmission of HIV: What works and how much is enough? **Journal of Infection**, v. 69, p. S56–S62, nov. 2014.

STUQUI, B. et al. Ac2-26 Mimetic Peptide of Annexin A1 Inhibits Local and Systemic Inflammatory Processes Induced by Bothrops moojeni Venom and the Lys-49 Phospholipase A2 in a Rat Model. **Plos One**, v. 10, n. 7, p. e0130803, 2015.

SUN, M.; LIU, Y.; GIBB, W. Distribution of annexin I and II in term human fetal membranes, decidua and placenta. **Placenta**, v. 17, n. 2–3, p. 181–4, 1 mar. 1996.

TEDNER, S. G.; ÖRTQVIST, A. K.; ALMQVIST, C. Fetal growth and risk of childhood asthma and allergic disease. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 42, n. 10, p. 1430–1447, out. 2012.

TEIXEIRA, R. A. P. et al. The essential role of annexin A1 mimetic peptide in the skin allograft survival. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 10, n. 2, p. E44–E53, fev. 2016.

VO, T.; HARDY, D. B. Molecular mechanisms underlying the fetal programming of adult disease. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 6, n. 3, p. 139–153, 24 ago. 2012.

3.11 Tables

Table 1: Maternal clinical background and perinatal results.

	Neg/Neg n=10	Pos/Neg n = 07	Pos/Pos n= 05
<i>Mothers:</i>			
Age (years)*	32.40 ± 6.17 a1	23.83 ± 4.92 b1	33.25 ± 2.63 a1
GA (weeks/days) *	39w ± 6d a2	38w6d ± 1w4d ab2	37w ± 3w b2
Smoke	0 (0)	2 (28.5)	0 (0)
Multiple pregnancies	0 (0)	1 (14.3)	0 (0)
Associated pathologies	0 (0)	1 (14.3)	1 (20)
Infections (no ZIKV)	0 (0)	0 (0)	(0)
<i>Newborns:</i>			
Weight (g)*	3456 ± 327.5 a	3173 ± 343.8 ab	2674 ± 692.6 b
Malformations	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Data presented as means ± standard deviation or n (%). GA: Gestational age at delivery.

*Values followed by different letters and the same index significantly differ (p < 0.05). The pathologies observed were pre eclampsia and hypothyroidism.

3.12 Figures

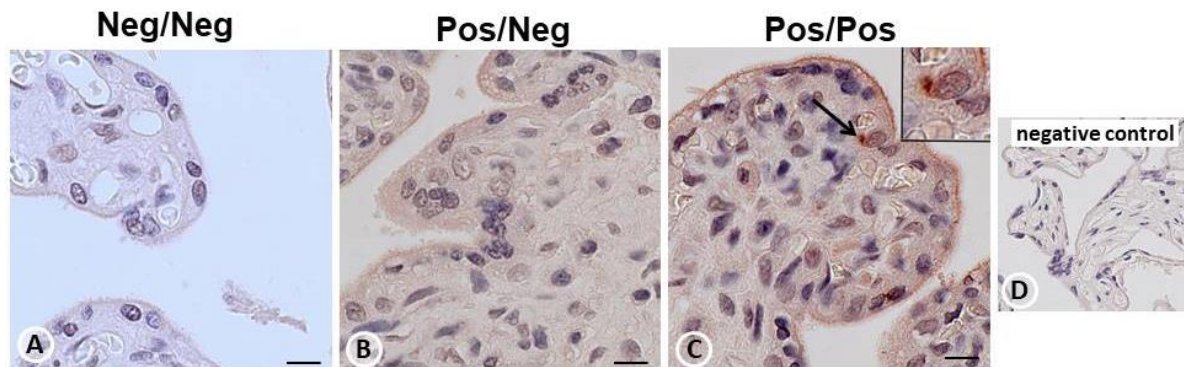


Figure 1. Immunolocalization of ZIKV envelope protein positive cells. Immunoreactivity of the anti-flavivirus 4g2 antibody (arrow) in the perinuclear region of the stroma cell in the Pos/Pos group (C). There was no positivity in Control (A) or Pos/Neg (B) groups. Negative control (D). Bars: 20µm. Contra-staining: Hematoxylin.

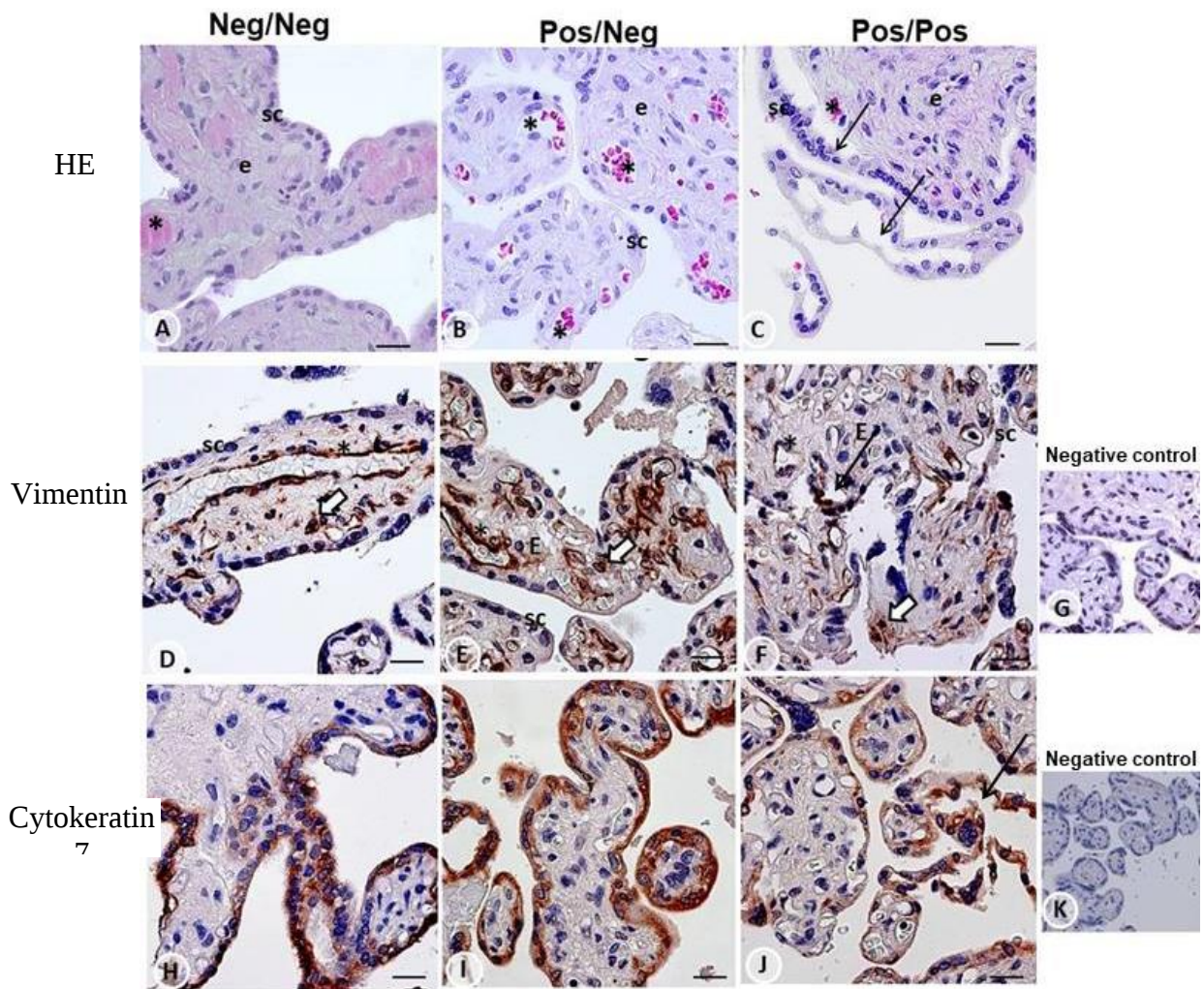


Figure 2: Histopathological analysis and cellular characterization of placental tissue. Fragments showing the syncytiotrophoblast (SC), stroma (e) and blood vessels (*) in the villi (A-C). Detachment and disorganization of SC (arrows) and lesions in the fetal villous stroma (E) were evident in the Pos/Pos (C) group. Staining: Hematoxylin-Eosin. Cellular characterization of placental tissue with Vimentin (D-G) label showing positivity for fetal endothelial cells (black arrow) and mesenchymal cells (white arrow). Cytokeratin 7 (H-K), marker of trophoblastic cells, was strongly expressed in SC. No immunostaining was detected in the negative control sections (G,K). Bars: 40 μ m. Counterstaining: Hematoxylin.

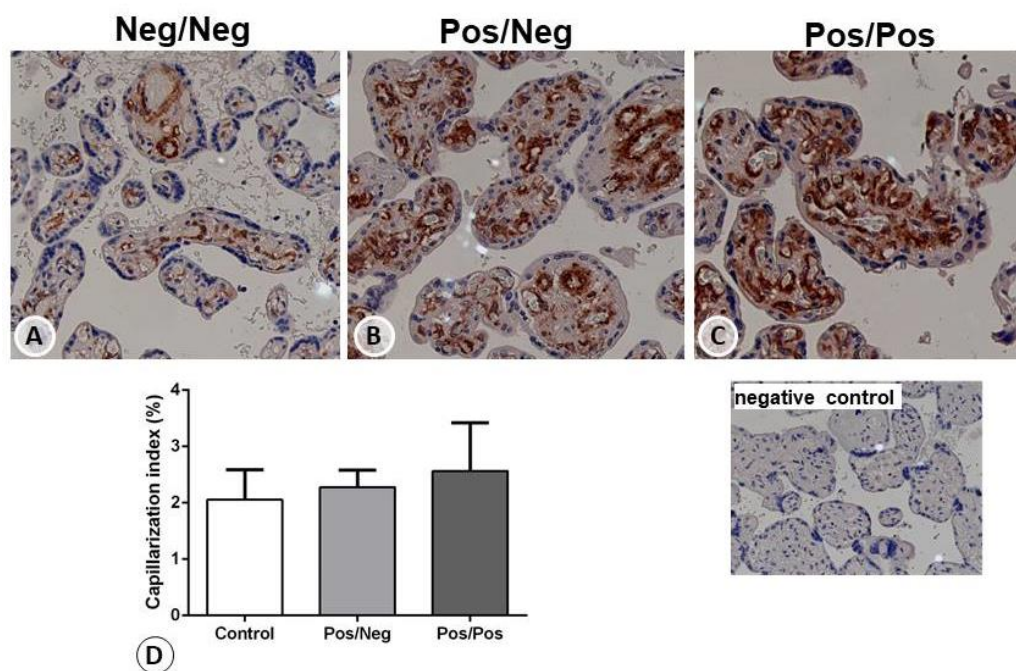


Figure 3. Immunohistochemical and quantitative analysis of terminal villi and vessels. Placenta fragments showing blood vessels in placental villi from (A) Control, (B) Pos/Neg and (C) Pos/Pos groups. No difference was observed in the groups. (D) Capillarization index (%). No immunostaining was detected in the negative control section. Counterstaining: Hematoxylin.

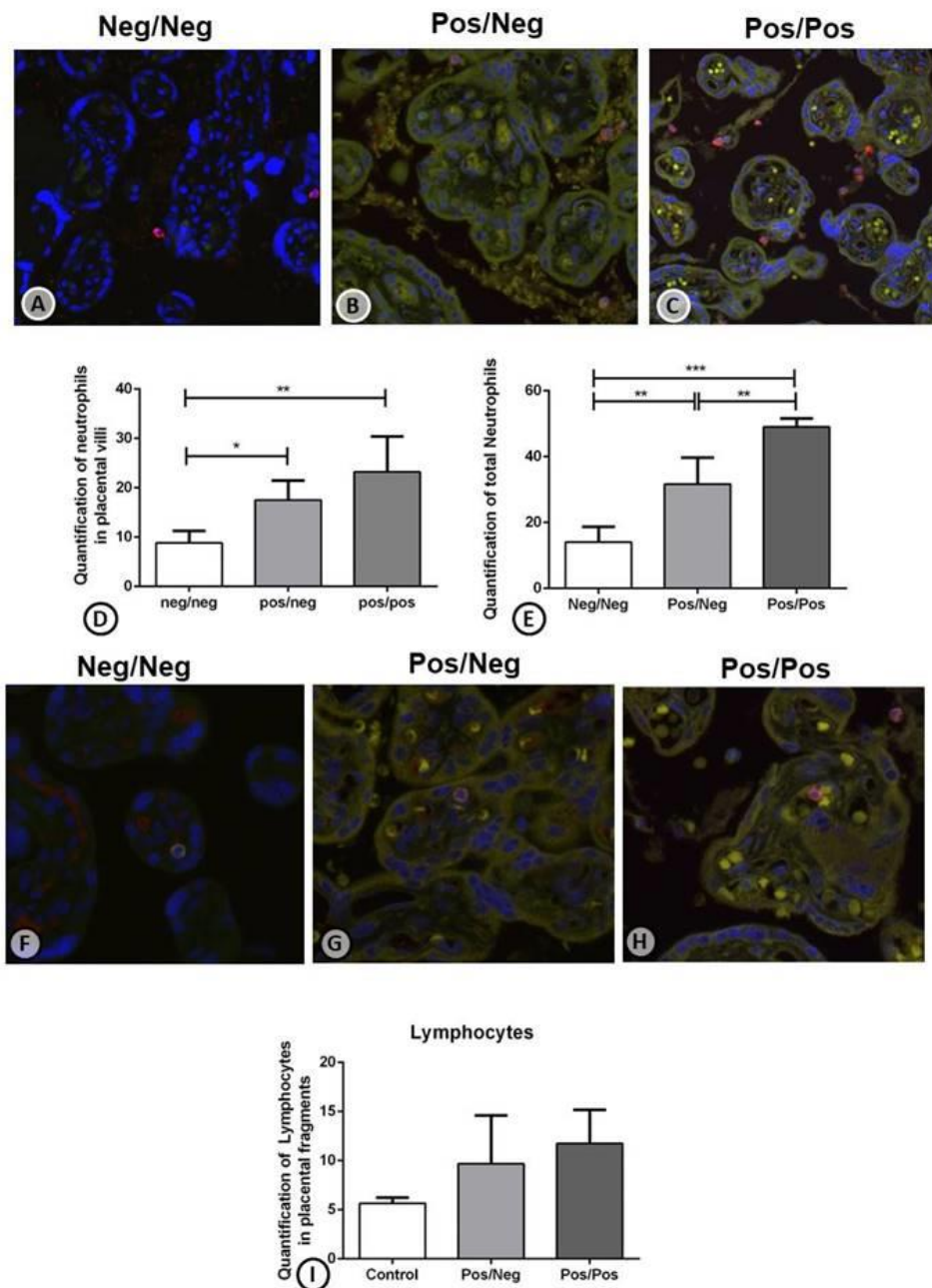


Figure 4. Immunofluorescence and quantification of inflammatory cells in placental fragments. Placental fragments were analyzed for neutrophils (CD15+, red), Lymphocytes (CD3+, red) cells and cell nuclei with DAPI (blue). **Neutrophils** in Neg/Neg (A), Pos/Neg (B) and Pos/Pos (C) groups. Quantification was performed on placental villi (D) and in all fragment (E). * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ and *** $P < 0.0001$ compared with control. Data indicate mean $\pm$ SEM ($n=5$ placentas/group). **Lymphocytes** in Neg/Neg (F), Pos/Neg (G) and Pos/Pos (H) groups. It was quantified every lymphocyte inside all the placental villi (I). There was no statistical difference between groups ($n=3$ placentas/group). Bars = 40 μ m.

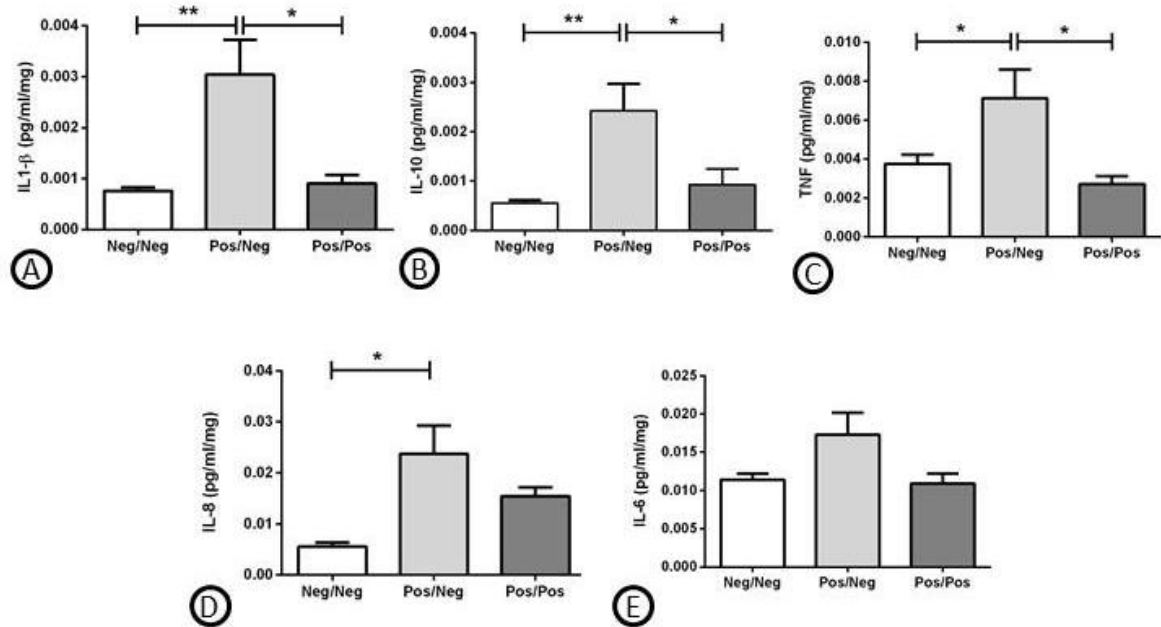


Figure 5: Cytokine analysis in the placental homogenate. High expression of IL-1 β , IL-10, TNF, IL-8 was observed in Pos/Neg group (A-d). IL-6 measured in the placental macerate did not show difference between groups (E). Data indicated mean $\pm$ S.E.M of the analyte concentration (pg/ml/mg), determined using MAGPIX xPONENT software. * p < 0.005 and ** p < 0.0001.

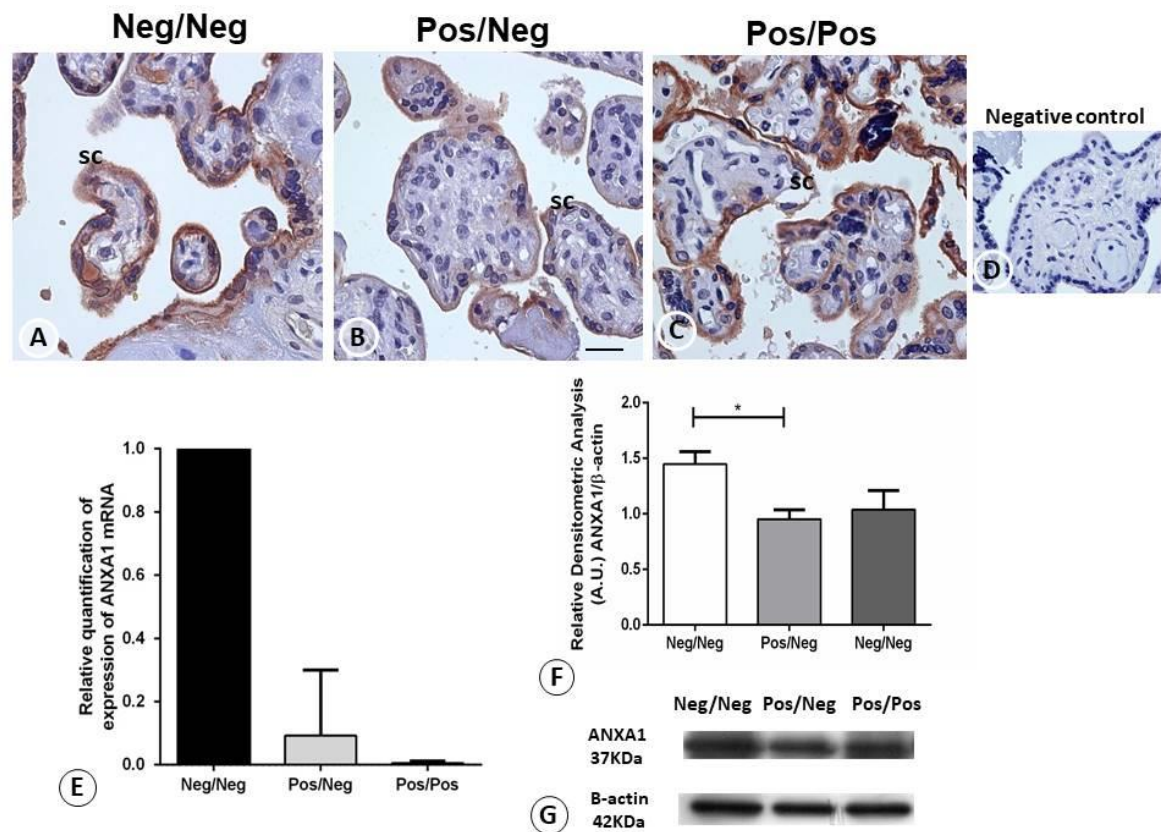


Figure 6. Immunolocalization and endogenous expression of ANXA1 mRNA and protein in infected human placental tissue. Immunoreactivity for ANXA1 protein, in the nucleus and cytoplasm of syncytiotrophoblast (SC) in all study groups (A-C). Bars: 40 μ m. Counterstaining: Hematoxylin. **ANXA1 mRNA expression (E).** Results are shown with Fold-change relative to the controls, which consist of uninfected tissues (Neg / Neg). **ANXA1 protein expression (F-G).** The relative band intensities by western blot were normalized to β -actin. Results are shown in relative densitometric analysis. Data indicate mean $\pm$ SEM; * p < 0.05 vs others groups.

4 DISCUSSÃO



Estudos que permitem a compreensão dos mecanismos que atuam na fisiopatologia placentária são de extrema relevância e podem auxiliar na compreensão das muitas complicações que comprometem a gestação e saúde do feto. São muitos os fatores que podem comprometer o desenvolvimento placentário e fetal, entre eles, as infecções virais. Nossos resultados mostraram que placentas com infecção por ZIKV apresentaram alterações estruturais, incluindo descolamento e desorganização do epitélio trofoblástico. Além disso, independente da presença do vírus na placenta, a infecção materna desencadeou uma resposta inflamatória, observada pelo recrutamento de células inflamatórias e aumento dos níveis de citocinas. A inflamação exacerbada nessas placentas pode estar relacionada à diminuição da expressão de ANXA1.

A placenta constitui uma barreira protetora para a transmissão vertical de partículas virais na maioria dos casos. A detecção do RNA de ZIKV classificou os fragmentos placentários nos grupos controle (Neg/Neg), mãe positiva para ZIKV/placentas negativas (Pos/Neg) e, mãe/placentas positivas para o vírus (Pos/Pos). A presença do vírus no tecido placentário foi confirmada pela marcação da proteína do envelope do ZIKV que esta localizada na região perinuclear das células do estroma. Esses dados corroboram com Cortese e colaboradores (2017). As células infectadas durante a viremia materna são células trofoblásticas sinciciais ou intermediárias e macrófagos intravenosos. Ainda, essas células podem atuar como uma fonte potencial de infecção fetal (HORN; RÖSE, 1998).

Em geral, as alterações histopatológicas da placenta após a infecção viral são bastante evidentes (SANTOS et al., 2019). No nosso estudo foi possível observar danos estruturais nos vilos placentários, como lesões e desorganização do sinciciotrofoblasto, assim como destruição do tecido conjuntivo fetal no grupo Pos/Pos. Células trofoblásticas são importantes componentes da barreira placentária, envolvidas no mecanismo de proteção e na prevenção da transmissão vertical de parasitas (EL COSTA et al., 2016). Outro estudo com placenta humana observou placentite crônica com inflamação vilosa crônica, edema e lesões do epitélio trofoblástico em tecidos infectados por ZIKV quando comparadas ao tecido viloso normal (NORONHA et al., 2016). Recentemente, SANTOS e colaboradores (2019) descreveram alterações morfológicas e moleculares, como hiperplasia de células de Hofbauer e expressão elevada de Bcl-2 (inibidor de apoptose) em vilosidades coriônicas após a transmissão vertical do ZIKV.

O processo de angiogênese é essencial para o sucesso gestacional (PIETRO et al., 2010). O estabelecimento da vascularização adequada na decídua placentária é crucial para que os tecidos materno e fetal interajam durante a gestação. Pesquisadores sugerem que o ZIKV pode interromper a vascularização placentária, e que este dano nos

vasos sanguíneos pode interromper o transporte de oxigênio para o feto, podendo restringir seu crescimento e levar a natimortos, entre outras condições (HIRSCH et al., 2018b). Em nosso estudo não foi observado diferença estatística no índice de capilarização entre os grupos infectados e controle, no entanto, o peso fetal foi menor no grupo Pos/Pos, o que pode estar relacionado com alterações histopatológicas na placenta.

Um aspecto importante observado foi que a infecção materna do ZIKV é suficiente para induzir resposta inflamatória placentária, identificada pelo aumento no tráfego de células imunes. Aumento do influxo de neutrófilos e dano tecidual foi observado no grupo Pos/Pos, quando o vírus foi detectado na placenta, assim como aumento de linfócitos, embora não significativo. Os neutrófilos são tipicamente conhecidos como células de vida curta que agem como a primeira linha de defesa contra patógenos (NADKARNI et al., 2016). Recentemente, estudos em macacos Rhesus mostraram que as células imunes inatas, incluindo as de origem neutrofílica, podem ser infectadas com ZIKV (HIRSCH, 2017). Os leucócitos também expressam um conjunto de receptores acoplados à proteína G, que reconhecem moléculas endógenas liberadas durante a inflamação, como as citocinas (MAYADAS et al., 2014).

A produção de citocinas é uma parte significativa da resposta imune durante a gestação. Dados da literatura indicam que a placenta é uma fonte de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , TNF α , IL-6, que são secretadas sob condições basais e em resposta aos diferentes tipos de estímulos imunológicos (RAGHUPATHY; KALINKA, 2008). Nossos estudos subsequentes com a quantificação de citocinas no homogenato placentário revelaram aumento das expressões de IL-1 β , IL-10, TNF- α e IL-8 no grupo Pos/Neg. Esses achados sugerem um mecanismo de defesa placentária à possível infecção pelo vírus Zika no grupo Pos/Neg. Enquanto, a ausência de resposta a essas moléculas no grupo Pos/Pos pode ser resultado do dano estrutural causado no tecido placentário após a infecção por ZIKV.

Recentes investigações indicam que a ausência da resposta de mediadores inflamatórios está correlacionada com o efeito letal do ZIKV no trofoblasto (ALDO et al., 2016; BOWEN et al., 2017). Curiosamente, em um modelo de estudo com murinos, nenhum vírus foi detectado nos fetos de mães infectadas pelo vírus do herpes murino (SILASI et al., 2015). No entanto, apesar de não terem sido detectados, a evidência de uma resposta inflamatória fetal foi observada, como demonstrado pelos níveis elevados de IL-1, MCP-1, IFN- γ e TNF- α . Silasi e colaboradores (2015) sugerem que a resposta imune da unidade feto-placentária, durante a gravidez, pode ter consequências de longo alcance, levando a resultados adversos no desenvolvimento pós-natal.

Assim, a inflamação é essencial para proteger o hospedeiro dos riscos exógenos e endógenos que, em última instância, levam à lesão tecidual (GOBBETTI; COORAY, 2016). A restauração da homeostase tecidual é alcançada por meio de um equilíbrio entre mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios/pró-resolução (GOBBETTI; COORAY, 2016; OLIANI et al., 2001). Com base nos dados da literatura sobre a ação anti-inflamatória da anexina A1 (ANXA1), estudos foram realizados em nosso laboratório envolvendo os mecanismos de ação dessa proteína em células inflamatórias (DE OLIVEIRA CARDOSO et al., 2018a; GOBBETTI; COORAY, 2016; LACERDA et al., 2018; TEIXEIRA et al., 2016) e no efeito antiparasitário em explantes placentários humanos infectados por *Toxoplasma gondii* (DE OLIVEIRA CARDOSO, 2018). Embora esses efeitos tenham sido avaliados em diversas investigações, a ação da ANXA1 não foi completamente explorada em placentas infectadas por ZIKV.

Nossas investigações mostraram presença da ANXA1 em células trofoblásticas nos grupos controle e infectados. A imunomarcação dessa proteína foi observada no núcleo e citoplasma do sinciciotrofoblasto, assim como demonstrado previamente por Sun e colaboradores (1996). As expressões gênica e proteica foram reduzidas em mães infectadas pelo vírus. Esses achados sugerem que a infecção materna por ZIKV é suficiente para gerar resposta inflamatória placentária e pode estar relacionada com a expressão da ANXA1.

Em conjunto, nossos resultados mostram que a infecção materna pelo ZIKV é suficiente para aumentar os níveis de citocinas e recrutamento de células de defesa gerando uma resposta inflamatória placentária possivelmente relacionada com a modulação da ANXA1. Nossos achados são inovadores e abrem novos caminhos no estudo da infecção pelo ZIKV na placenta e nos mecanismos de ação da proteína ANXA1 durante a gravidez.

5 CONCLUSÕES



Os nossos achados após investigar placentas de mães negativas para o vírus (Neg/Neg), mães positivas e placenta sem detecção viral (Pos/Neg) e mães e placentas infectadas por ZIKV (Pos/Pos) permitem concluir que:

- 1- A presença do vírus no tecido placentário, após confirmação com a proteína do envelope do ZIKV, está localizada na região perinuclear de células do estroma;
- 2- A presença do vírus Zika na placenta provoca alterações estruturais, incluindo descolamento e desorganização do epitélio trofoblástico, gerando disfunção placentária, o que pode estar relacionado com a diminuição da idade gestacional e do peso do recém-nascido;
- 3- Não foi observada diferença estatística no índice de capilarização entre os grupos infectados e controle;
- 4- A quantificação das citocinas no homogenato placentário mostra aumento dos níveis das citocinas IL-1 β , IL-10, TNF- α e IL-8 no grupo Pos/Neg.
- 5- A infecção materna por ZIKV é suficiente para desenvolver uma resposta inflamatória placentária, observada pelo aumento no recrutamento de células inflamatórias e citocinas .
- 6- A ANXA1 é altamente expressa na placenta, especialmente no sinciciotrofoblasto;
- 7- A diminuição na expressão proteica e gênica da ANXA1 indica modulação após a resposta inflamatória placentária.

Em conjunto, nossos resultados mostram que a infecção materna por ZIKV é suficiente para desenvolver uma resposta inflamatória placentária, possivelmente relacionada com a modulação da ANXA1. Esses dados são inovadores e poderá abrir um novo caminho para a exploração futura dos mecanismos de ação dessa proteína no processo gestacional.

REFERÊNCIAS

ALDO, P. et al. HSV-2 enhances ZIKV infection of the placenta and induces apoptosis in first-trimester trophoblast cells. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 76, n. 5, p. 348–357, nov. 2016.

ARORA, S. et al. Influenza A virus enhances its propagation through the modulation of Annexin-A1 dependent endosomal trafficking and apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, v. 23, n. 7, p. 1243–1256, 4 jul. 2016.

BENIRSCHKE, K.; KAUFMANN, P.; BAERGEN, R. N. **Pathology of the human placenta**. [s.l.] Springer, 2006.

BOWEN, J. R. et al. Zika Virus Antagonizes Type I Interferon Responses during Infection of Human Dendritic Cells. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 2, p. e1006164, 2 fev. 2017.

BRASIL, P. et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 24, p. 2321–2334, 15 dez. 2016.

BROGIN MORELI, J. et al. Interleukin 10 and tumor necrosis factor-alpha in pregnancy: aspects of interest in clinical obstetrics. **ISRN obstetrics and gynecology**, v. 2012, p. 230742, 2012.

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E.; CHARNOCK-JONES, D. S. Human early placental development: potential roles of the endometrial glands. **Placenta**, v. 28 Suppl A, p. S64-9, abr. 2007.

CARTEAUX, G. et al. Zika Virus Associated with Meningoencephalitis. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 16, p. 1595–1596, 21 abr. 2016.

COYNE, C. B.; LAZEAR, H. M. Zika virus — reigniting the TORCH. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 11, p. 707–715, 30 nov. 2016.

CUGOLA, F. R. et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, v. 534, n. 7606, p. 267–271, 9 jun. 2016.

D'ACQUISTO, F.; PERRETTI, M.; FLOWER, R. J. Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. **British journal of pharmacology**, v. 155, n. 2, p. 152–69, set. 2008.

DE OLIVEIRA CARDOSO, M. F. et al. Annexin A1 peptide is able to induce an anti-parasitic effect in human placental explants infected by *Toxoplasma gondii*.

Microbial Pathogenesis, v. 123, p. 153–161, 1 out. 2018a.

DE OLIVEIRA CARDOSO, M. F. et al. Annexin A1 peptide is able to induce an anti-parasitic effect in human placental explants infected by *Toxoplasma gondii*.

Microbial Pathogenesis, v. 123, p. 153–161, 9 out. 2018b.

EL COSTA, H. et al. ZIKA virus reveals broad tissue and cell tropism during the first trimester of pregnancy. **Scientific reports**, v. 6, p. 35296, 2016.

FLOWER, R. J. Eleventh Gaddum memorial lecture. Lipocortin and the mechanism of action of the glucocorticoids. **British journal of pharmacology**, v. 94, n. 4, p. 987–1015, ago. 1988.

FRANK, C. et al. Sexual transmission of Zika virus in Germany, April 2016. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 23, p. 30252, 9 jun. 2016.

FRÉOUR, T. et al. Sexual transmission of Zika virus in an entirely asymptomatic couple returning from a Zika epidemic area, France, April 2016. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 23, p. 30254, 9 jun. 2016.

GASTARDELO, T. S. et al. Functional and Ultrastructural Analysis of Annexin A1 and Its Receptor in Extravasating Neutrophils during Acute Inflammation. **The American Journal of Pathology**, v. 174, n. 1, p. 177–183, jan. 2009.

GOBBETTI, T.; COORAY, S. N. Annexin A1 and resolution of inflammation: tissue repairing properties and signalling signature. **Biological Chemistry**, v. 397, n. 10, 1 jan. 2016.

HERZBERG, F., MAUSNER, B., & SNYDERMAN, B. The motivation to work (12^o ed.). Cleveland, Ohio: Transaction Publishers, 1993.

HIRSCH, A. J. et al. Zika virus infection in pregnant rhesus macaques causes placental dysfunction and immunopathology. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 263, 2018a.

HIRSCH, A. J. et al. Zika virus infection in pregnant rhesus macaques causes placental dysfunction and immunopathology. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 263, 17 dez. 2018b.

HORN, L.-C.; RÖSE, I. Placental and Fetal Pathology in Intrauterine Viral Infections. **Intervirolgy**, v. 41, n. 4–5, p. 219–225, 1998.

HUPPERTZ, B.; GHOSH, D.; SENGUPTA, J. An integrative view on the physiology of human early placental villi. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 114, n. 1, p. 33–48, 1 jan. 2014.

LACERDA, J. Z. et al. Annexin A12-26 Treatment Improves Skin Heterologous Transplantation by Modulating Inflammation and Angiogenesis Processes. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 1015, 10 set. 2018.

LAZEAR, H. M.; DIAMOND, M. S. Zika Virus: New Clinical Syndromes and Its Emergence in the Western Hemisphere. **Journal of Virology**, v. 90, n. 10, p. 4864–4875, 15 maio 2016.

LIEBERMAN, R. W. et al. Seasonal influenza A (H1N1) infection in early pregnancy and second trimester fetal demise. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 1, p. 107–9, jan. 2011.

LIM, L. H. K.; PERVAIZ, S. Annexin 1: the new face of an old molecule. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 4, p. 968–975, abr. 2007.

LIOTTA, G. et al. Elimination of Mother-To-Child Transmission of HIV Infection: The Drug Resource Enhancement against AIDS and Malnutrition Model. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 12, n. 10, p. 13224–13239, 21 out. 2015.

LIZARBE, M. et al. Annexin-Phospholipid Interactions. Functional Implications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 2, p. 2652–2683, 28 jan. 2013.

MAYADAS, T. N.; CULLERE, X.; LOWELL, C. A. The Multifaceted Functions of Neutrophils. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 9, n. 1, p. 181–218, 24 jan. 2014.

MLAKAR, J. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 10, p. 951–958, 10 mar. 2016.

MOORE, K. L. **Embriologia Clínica**. 10 edition ed. [s.l.] Elsevier, 2016.

MUNN, T. Z.; MUES, G. I. Human lipocortin similar to ras gene products. **Nature**, v. 322, n. 6077, p. 314–315, 24 jul. 1986.

NADKARNI, S. et al. Neutrophils induce proangiogenic T cells with a regulatory

phenotype in pregnancy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 52, p. E8415–E8424, 27 dez. 2016.

NORONHA, L. DE et al. Zika virus damages the human placental barrier and presents marked fetal neurotropism. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 5, p. 287–93, maio 2016.

OLIANI, S. M. et al. An immunocytochemical and in situ hybridization analysis of annexin 1 expression in rat mast cells: modulation by inflammation and dexamethasone. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 80, n. 9, p. 1429–38, set. 2000.

OLIANI, S. M. et al. Neutrophil interaction with inflamed postcapillary venule endothelium alters annexin 1 expression. **The American journal of pathology**, v. 158, n. 2, p. 603–15, fev. 2001.

OLIANI, S. M. et al. Fluctuation of annexin-A1 positive mast cells in chronic granulomatous inflammation. **Inflammation Research**, v. 57, n. 10, p. 450–456, 2 out. 2008.

OLIANI, S. M.; DAMAZO, A. S.; PERRETTI, M. Annexin 1 localisation in tissue eosinophils as detected by electron microscopy. **Mediators of inflammation**, v. 11, n. 5, p. 287–92, out. 2002.

PIETRO, L. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-receptor expression in placenta of hyperglycemic pregnant women☆. **Placenta**, v. 31, n. 9, p. 770–780, set. 2010.

RAGHUPATHY, R.; KALINKA, J. Cytokine imbalance in pregnancy complications and its modulation. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 13, p. 985–94, 1 jan. 2008.

RESCHER, U. et al. Annexin 2 is a phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding protein recruited to actin assembly sites at cellular membranes. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 16, p. 3473–3480, 15 jul. 2004.

SANTOS, G. R. et al. Case Report. **International Journal of Gynecological Pathology**, p. 1, 14 fev. 2019.

SARNO, M. et al. Zika Virus Infection and Stillbirths: A Case of Hydrops Fetalis,

Hydranencephaly and Fetal Demise. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. e0004517, 25 fev. 2016.

SILASI, M. et al. Viral Infections During Pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 73, n. 3, p. 199–213, mar. 2015.

SINGH, R. K. et al. Zika virus - emergence, evolution, pathology, diagnosis, and control: current global scenario and future perspectives - a comprehensive review. **The Veterinary quarterly**, v. 36, n. 3, p. 150–75, 2 set. 2016.

SOLITO, E. et al. Annexin 1 binds to U937 monocytic cells and inhibits their adhesion to microvascular endothelium: involvement of the alpha 4 beta 1 integrin. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 165, n. 3, p. 1573–81, 1 ago. 2000.

STEVENS, J.; LYALL, H. Mother to child transmission of HIV: What works and how much is enough? **Journal of Infection**, v. 69, p. S56–S62, nov. 2014.

STUQUI, B. et al. Ac2-26 Mimetic Peptide of Annexin A1 Inhibits Local and Systemic Inflammatory Processes Induced by Bothrops moojeni Venom and the Lys-49 Phospholipase A2 in a Rat Model. **Plos One**, v. 10, n. 7, p. e0130803, 2015.

SUN, M.; LIU, Y.; GIBB, W. Distribution of annexin I and II in term human fetal membranes, decidua and placenta. **Placenta**, v. 17, n. 2–3, p. 181–4, 1 mar. 1996.

TEDNER, S. G.; ÖRTQVIST, A. K.; ALMQVIST, C. Fetal growth and risk of childhood asthma and allergic disease. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 42, n. 10, p. 1430–1447, out. 2012.

TEIXEIRA, R. A. P. et al. The essential role of annexin A1 mimetic peptide in the skin allograft survival. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 10, n. 2, p. E44–E53, fev. 2016.

VO, T.; HARDY, D. B. Molecular mechanisms underlying the fetal programming of adult disease. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 6, n. 3, p. 139–153, 24 ago. 2012.



ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO DURANTE O MESTRADO



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicon

Ac₂₋₂₆ peptide and serine protease of *Bothrops atrox* similarly induces angiogenesis without triggering local and systemic inflammation in a murine model of dorsal skinfold chamber



Rafaela Batista Molás^a, Marina de Paula-Silva^b, Rehana Masood^c, Anwar Ullah^d, Alexandre Dantas Gimenes^e, Sonia Maria Oliani^{a, e, *}

^a Department of Biology, Immunomorphology Laboratory, São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences (IBILCE), Campus São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

^b Department of Toxicology and Toxicological Analyses, University of São Paulo (USP), São Paulo, São Paulo, Brazil

^c Department of Biochemistry, Shaheed Benazir Bhutto Women University, Peshawar, Pakistan

^d Department of Biosciences, COMSATS Institute of Information Technology, Park Road, Islamabad, Pakistan

^e Department of Morphology and Genetics, São Paulo Federal University (UNIFESP), São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 April 2017

Received in revised form

12 June 2017

Accepted 13 June 2017

Available online 1 July 2017

Keywords:

Annexin A1

Neovascularization

Inflammatory cells

Cytokines

Skin fragments

Angiogenesis

1. Introduction

Angiogenesis is the process of new blood vessels formation from the pre-existing vasculature (Stanton et al., 2009). Also known as neovascularization, this dynamic process involves extracellular matrix degradation, dilation of existing blood vessels, migration and proliferation of endothelial cells, formation of vessel lumen, expression of adhesion molecules and, finally, stabilization of new vascular walls by other types of cells (Laschke et al., 2006). This is a key event in the maintenance of tissue homeostasis, remodelling and repair. The angiogenic process is fundamental to physiological events, such as embryogenesis and organogenesis, as well as physiopathological conditions, including tissue regeneration,

cicatrizization, and tumour progression (Bergers and Benjamin, 2003; Karamysheva, 2008).

Neovascularization in non-physiological contexts is mostly dependent on immune modulators, such as immune cells and the cytokines/chemokines (Szade et al., 2015). However, these mediators interact in complex pathways and their exact role in the angiogenic process is still controversial, as inflammatory cells and signals act either promoting or inhibiting the formation of new capillaries (Apte et al., 2006; Sanberg et al., 2010; Szade et al., 2015). Regardless the stimulatory or inhibitory effect, these mediators certainly play a role in mediating the pro- and anti-angiogenic balance, and investigating them is crucial to provide new alternatives for public health issues such as the application of bioengineering tools therapeutic strategies which success depends on angiogenesis, including tissue/organ transplantsations and the treatment of diseases associated with impaired vascular irrigation (Liu et al., 2017; Said and Geoffrey, 2013; Mimura et al., 2016). Studies in this field have pointed the anti-inflammatory protein annexin A1 (AnxA1), as well as the serine protease isolated from *Bothrops atrox* venom (BaSp) as potent inducers of neovascularization (Bhat et al., 2016; M Yi and Schnitzer, 2009).

Endothelial cells produce and are modulated by both AnxA1 and serine proteases (Drewes et al., 2012; Kamal et al., 2005; Pin et al., 2012; Sharma and Sharma, 2007). So far, it is known that the endogenous AnxA1 induces endothelial proliferation and migration (Ming Yi and Schnitzer, 2009), while serine proteases from snake venom (SPSVs) are well-characterized as a class of toxins that affect the blood coagulation system (Serrano and Maroun, 2005). Although it is clear that AnxA1 and serine proteases display an important interaction with the vasculature, few investigations have assessed the effects of administering these mediators over angiogenesis in an in vivo system.

We hypothesize that the mimetic peptide from AnxA1, Ac₂₋₂₆, in association with BaSp increases angiogenesis. Herein, a dorsal skin

* Corresponding author. Cristóvão Colombo Street, 2265, São José do Rio Preto, Brazil.

E-mail address: smoliani@ibilce.unesp.br (S.M. Oliani).

ANEXO B – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO CEP/CONEP

- DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título Público: Estudo Clínico e Laboratorial das infecções por Flavivirus no ciclo gravídico puerperal
Pesquisador Responsável: Denise Cristina Mos Vaz Oliani
Contato Público: Denise Cristina Mos Vaz Oliani
Condições de saúde ou problemas estudados: Malformações fetais
Infecções por flavivirus no ciclo gravídico puerperal
Infecções congênitas
Descritores CID - Gerais: Dengue [dengue classico]
Febre de Chikungunya
Febre viral transmitida por mosquitos, nao especificada
Malformacao congenita nao especificada do sistema nervoso
Doencas virais congenitas
Descritores CID - Especificos: Malformacao congenita nao especificada do sistema nervoso
Doencas virais congenitas
Descritores CID - da Intervenção:
Data de Aprovação Ética do CEP/CONEP: 11/02/2019



- DADOS DA INSTITUIÇÃO PROPONENTE

Nome da Instituição: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto- FAMERP - SP
Cidade: SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

- DADOS DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Comitê de Ética Responsável: 5415 - Faculdade de Medicina de São Jose do Rio Preto- FAMERP - SP
Endereço: BRIGADEIRO FARIA LIMA, 5416
Telefone: (17)3201-5813
E-mail: cepfamerp@famerp.br

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 13/05/2019


Assinatura do autor