

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

KEYLA SILVA NOBRE PIRES

**INFECÇÃO PLACENTÁRIA PELO ZIKA VÍRUS: INVESTIGAÇÃO DAS VIAS DE
SINALIZAÇÃO E FUNÇÕES CELULARES AFETADAS**

**MACEIÓ
2021**

KEYLA SILVA NOBRE PIRES

**INFECÇÃO PLACENTÁRIA PELO ZIKA VÍRUS: INVESTIGAÇÃO DAS VIAS DE
SINALIZAÇÃO E FUNÇÕES CELULARES AFETADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Urban Borbely
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Karen Steponavicius Cruz Borbely

**MACEIÓ
2021**

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 - 1767

P667i Pires, Keyla Silva Nobre.

Infecção placentária pelo Zika vírus : investigação das vias de sinalização e funções celulares afetadas / Keyla Silva Nobre Pires. – 2021.
88 f. : il.

Orientador: Alexandre Urban Borbely.

Co-orientadora: Karen Steponavicius Cruz Borbely.

Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2021.

Bibliografia: f. 79-88.

1. Zika vírus. 2. Infecção por Zika vírus. 3. Interferons. 4. Placenta. I. Título.

CDU: 618.36-056.7

Folha de Aprovação

KEYLA SILVA NOBRE PIRES

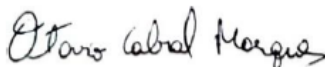
INFECÇÃO PLACENTÁRIA PELO ZIKA VÍRUS: INVESTIGAÇÃO DAS VIAS DE
SINALIZAÇÃO E FUNÇÕES CELULARES AFETADAS

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 31 de agosto de 2021.

Banca Examinadora



Prof. Dr. ALEXANDRE URBAN BORBELY (ORIENTADOR)



Prof. Dr. OTÁVIO CABRAL MARQUES



Prof.^a Dr.^a ESTELA MARIS ANDRADE FORELL BEVILACQUA

*A todas as mulheres que cederam suas
placentas para estudo, em meio a um momento
tão especial de suas vidas.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que me fortalece e é o meu refúgio; pela minha vida e oportunidade de chegar até aqui; à minha família, por todo suporte dado durante a minha jornada, por todo amor e por suportarem as ausências e saudade; e ao meu namorado, Flávio Martins, por estar sempre ao meu lado, incentivando e trazendo leveza aos meus dias mais difíceis.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre Borbely, por todo apoio, confiança e compreensão, por me ensinar tudo o que sei hoje, contribuindo imensamente para minha formação profissional e por não medir esforços para que eu consiga alcançar um futuro bem sucedido; e a minha coorientadora Prof.^a Dr.^a Karen Borbely, por toda disponibilidade, auxílio sempre que necessário e conhecimento compartilhado.

Às Trophogirls, integrantes do Grupo de Pesquisa em Saúde da Mulher e Gestação, por realizarem um trabalho de equipe sem igual e por toda ajuda inestimável em diversos detalhes deste trabalho. À Ana Lúcia Mendes, pela ajuda com imunofluorescências, à Camilla Gonçalves, por conduzir como ninguém a cultura de células, à Eloiza Tanabe, pelo auxílio na Biologia Molecular, à Jaqueline Correia e Rayane Botelho, pela disponibilidade em ajudar sempre e pelo apoio emocional e à Séfora Fragoso, por compartilhar experiências durante essa jornada.

Às ICs, Juliana Ramalho pelas coletas de placenta, à Lays Xavier pela parceria durante os longos experimentos de isolamento de células e todo suporte na microscopia de força atômica, e à Iasmin de Oliveira e Ashley Sousa pela dedicação em aprender e ajudar. Também à Monique Vila Nova e Larissa Moreira, ex-integrantes do grupo, que fizeram parte da minha formação como mestre. À todas pela amizade, por serem tão presentes, comprometidas e solícitas.

A todos os integrantes do Laboratório de Biologia Celular, em especial aos professores e à técnica Juliane Pereira da Silva, pelo conhecimento compartilhado, auxílio em todos âmbitos desta pesquisa e zelo com o nosso ambiente de trabalho;

Aos laboratórios parceiros pela contribuição para realização deste trabalho, incluindo o Laboratório de Pesquisa em Virologia e Imunologia (LAPEVI) da UFAL, em especial ao Prof. Dr. Ênio Bassi, a Prof.^a Dr.^a Alessandra Borges e a Stephannie Maia e Elane Conceição; o Laboratório de Ótica e Nanoscopia (IF/UFAL), em especial ao Prof. Dr. Samuel Teixeira, Prof. Dr. Eduardo Fonseca e a Elaine Oliveira; a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ), em

especial ao Dr. Milton Moraes e a Tamiris Azamor; o Dr. Juliano Bordignon, do Instituto Carlos Chagas da FIOCRUZ-PR; e à Prof^a. Dr^a. Estela Bevilacqua da Universidade de São Paulo (USP).

A todos os profissionais do Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes e do Hospital Maternidade Santo Antônio pelo apoio durante as coletas de dados e material placentário; e a todas as pacientes que autorizaram a coleta de suas placentas e participaram do estudo;

À Prof.^a Dr.^a Ana Catarina Rezende Leite e ao Prof. Dr. Rafael Brito da Silva, pela contribuição em minha banca de qualificação; e à Prof.^a Dr.^a Estela Bevilacqua e ao Prof. Dr. Otávio Cabral Marques pelo valioso auxílio na finalização deste trabalho na banca de defesa.

À Universidade Federal de Alagoas, por ter sido cenário principal de toda minha trajetória acadêmica, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) pelo auxílio e pelas oportunidades oferecidas de aprimoramento das minhas competências;

A todos que não foram aqui citados, mas que de alguma forma participaram da minha jornada e formação, meus sinceros agradecimentos.

“O que você faz com amor e cuidado tem uma chance de fazer diferença, tanto para você como para a vida de outras pessoas.”

(Ernst Wilhelm "Wim" Wenders)

RESUMO

Introdução: A infecção pelo Zika Vírus (ZIKV) é considerado um grande problema de saúde pública, devido a sua capacidade de atravessar a barreira placentária e infectar o feto, podendo causar uma condição chamada de Síndrome Congênita do Zika Vírus. Embora os casos de ZIKV na gestação tenham reduzido drasticamente, a infecção ainda merece grande atenção por aumentar os gastos públicos a curto, médio e longo prazo. Apesar dos esforços científicos realizados nos últimos anos, ainda são necessários estudos sobre a patogênese do ZIKV e a resposta imunológica na placenta. **Objetivo:** Investigar os aspectos morfológicos, imunológicos e moleculares associados à fisiopatologia da infecção gestacional pelo ZIKV em diferentes modelos experimentais *in vitro*. **Métodos:** Células HTR-8/SVneo derivadas do primeiro trimestre de gestação, células de citotrofoblasto extraviloso (CTEV) e explantes de vilosidades coriônicas de placentas a termo foram infectados com uma cepa africana (MR766) e uma cepa asiática (PE243) do ZIKV. A infecção foi confirmada por citometria de fluxo, imunofluorescência e RT-qPCR para as células e por RT-qPCR para os explantes. As células foram analisadas por microscópio de força atômica (AFM). A resposta imunológica foi observada pela análise da expressão de genes e produção de citocinas, assim como ativação de vias moleculares específicas. **Resultados:** Explantes placentários foram infectados apenas com a cepa PE243 e apresentaram aumento da produção de IL-6 ($p < 0,05$) e IL-8 ($p < 0,05$). As células HTR-8/SVneo foram infectadas por ambas as cepas (72,2% para MR766 e 80,2% para PE243) e apresentaram alterações morfológicas/topográficas em células infectadas, mas não exibiram nenhuma alteração na expressão gênica ou produção de citocinas. Já as células CTEV também foram infectadas com ambas as cepas (63,8% para MR766 e 66,5% para PE243), apresentando consideráveis alterações morfológicas/topográficas no tamanho, forma e rugosidade das células; e apresentaram produção aumentada de IFN- α 2 ($p < 0,0005$), IFN- λ 1 ($p < 0,01$) e IL-6 ($p < 0,01$) após infecção por PE243, e apenas aumento de IFN- λ 1 ($p < 0,05$) após infecção por MR766. A sinalização pelas moléculas analisadas diferiu apenas na infecção por PE243, que aumentou a expressão de p-IRF3 ($p < 0,05$) e IRF9 ($p < 0,05$), enquanto p-STAT2 permaneceu inalterada após a infecção com ambas as cepas. **Conclusões:** A resposta ao ZIKV é distinta em diferentes modelos de cultura celular e a depender da cepa viral. No fim da gestação, as células CTEV apresentam um panorama diferente de outros modelos celulares, conseguindo produzir alguns IFN e mantendo vias de resposta antiviral ativas, o que pode indicar que são mais combativas ao vírus do que células de primeiro trimestre.

Palavras-chave: Zika vírus; Infecção Congênita; Interferon; Placenta.

ABSTRACT

Introduction: Zika Virus (ZIKV) infection is considered a major public health problem, due to its ability to cross the placental barrier and infect the fetus, which can cause a condition called Congenital Zika Virus Syndrome. Although the cases of ZIKV during pregnancy have drastically reduced, the infection still deserves great attention as it increases public spending in the short, medium and long term. Despite the scientific efforts made in recent years, studies on the pathogenesis of ZIKV and the immune response in the placenta are still needed. **Objective:** To investigate the morphological, immunological and molecular aspects associated with the pathophysiology of gestational infection by ZIKV in different experimental models *in vitro*. **Methods:** HTR-8/SVneo cells derived from the first trimester of gestation, extravillous cytotrophoblast cells (EVT) and chorionic villus explants from term placentas were infected with an African strain (MR766) and an Asian strain (PE243) of ZIKV. Infection was confirmed by flow cytometry, immunofluorescence and RT-qPCR for cells and by RT-qPCR for explants. Cells were analyzed by atomic force microscope (AFM). The immune response was observed by analyzing gene expression and cytokine production, as well as activation of specific molecular pathways. **Results:** Placental explants were infected only with the PE243 strain and showed increased production of IL-6 ($p < 0.05$) and IL-8 ($p < 0.05$). HTR-8/SVneo cells were infected by both strains (72.2% for MR766 and 80.2% for PE243) and showed morphological/topographic changes in infected cells, but showed no change in the gene expression or cytokine production. EVT cells were also infected with both strains (63.8% for MR766 and 66.5% for PE243), showing considerable morphological/topographic changes in cell size, shape and roughness, and showed increased production of IFN- α 2 ($p < 0.0005$), IFN- λ 1 ($p < 0.01$) and IL-6 ($p < 0.01$) after PE243 infection, and only an increase in IFN- λ 1 ($p < 0.05$) after MR766 infection. The signaling by the molecules analyzed differed only in PE243 infection, which increased the expression of p-IRF3 ($p < 0.05$) and IRF9 ($p < 0.05$), while p-STAT2 remained unchanged after infection with both the strains. **Conclusions:** The response to ZIKV is distinct in different cell culture models and depending on the viral strain. At the end of pregnancy, EVT cells present a different picture from other cell models, managing to produce some IFN and maintaining active antiviral response pathways, which may indicate that they are more virus-fighting than first-trimester cells.

Keywords: Zika virus; Congenital Infection; Interferon; Placenta.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição das populações de células trofoblásticas na placenta humana de primeiro trimestre.....	23
Figura 2 - Visão geral dos subtipos de células envolvidos na invasão decidual e miometrial durante a gestação.....	24
Figura 3 - Estrutura genômica do ZIKV e suas proteínas.....	28
Figura 4 - Mecanismos de evasão imunológica do ZIKV.....	36
Figura 5 - Estrutura da placenta humana e regiões isoladas nos modelos experimentais.....	43
Figura 6 - Explantes placentários a termo e susceptibilidade ao ZIKV.....	49
Figura 7 - Expressão gênica relacionada a resposta antiviral de explantes de vilosidades coriônicas após infecção por PE243.....	50
Figura 8 - Avaliação da produção de interferons em explantes de vilosidades coriônicas após infecção por PE243.....	51
Figura 9 - Avaliação da produção de citocinas inflamatórias em explantes de vilosidades coriônicas após infecção por PE243.....	52
Figura 10 - Avaliação da produção de moléculas angiogênicas em explantes de vilosidades coriônicas após infecção por PE243.....	53
Figura 11 - Infecção da HTR-8/SVneo pelo ZIKV.....	55
Figura 12 - Análise morfológica/topográfica das células HTR-8/SVneo por AFM.....	56
Figura 13 - Expressão gênica relacionada a resposta antiviral.....	58
Figura 14 - Análise da produção de interferons em células HTR-8/SVneo.....	59
Figura 15 - Avaliação da produção de citocinas inflamatórias em células HTR-8/SVneo.....	60
Figura 16 - Isolamento de Células do CTEV.....	61
Figura 17 - Infecção do CTEV pelo ZIKV.....	62
Figura 18 - Análise morfológica/topográfica das células CTEV por AFM.....	64
Figura 19 - Rugosidade média das células CTEV.....	65
Figura 20 - Avaliação das vias de sinalização envolvidas na resposta antiviral em células CTEV.....	66
Figura 21 - Avaliação da produção de interferons em células CTEV.....	67
Figura 22 - Avaliação da produção de citocinas inflamatórias em células CTEV.....	68
Figura 23 - Alterações imunológicas e moleculares associadas à infecção por ZIKV em células CTEV de terceiro trimestre.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de anticorpos primários	46
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADE - Aumento dependente de anticorpos

AFM - Microscópio de força atômica

AKT - Proteína quinase B

AXL - Do grego *anexelekto* - significa incontrolável em português

C – Capsídeo viral

CCL2/MCP-1 - Ligante 2 de CC quimiocina/proteína quimiotática de monócitos

CD209 - Cluster de diferenciação 209

cDNA - DNA complementar

CO₂ - Dióxido de carbono

CTEV – Citotrofoblasto extraviloso

DENV – Vírus da dengue

DMEM - Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DPI - Dias após a infecção

E – Envelope viral

FcRn - Receptor da fração comum neonatal

FFU - Unidade formadora de foco

FGF-b - Fator de crescimento fibroblástico básico

FITC - Fluoresceína isotiocianato

Gas6 - Proteína específica de interrupção do crescimento 6

GM-CSF - Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

HBSS - Solução salina balanceada de Hank

HPI - Horas pós-infecção

IDO1 - Indoleamina 2,3-dioxigenase

IFIT5 - Proteína induzida por interferon com repetições de tetratricopeptídeo 5

IFNAR – Receptor de interferon *alpha*

IFNLR – Receptor de interferon *lambda*

IFN- β – Interferon *beta*

IFN- γ – Interferon *gama*

IFN- λ – Interferon *lambda*

IKK ϵ - Inibidor da proteína quinase serina /treonina *kappa*- B quinase *epsilon*

IL – Interleucina

IP-10 - Proteína 10 induzida por interferons

IRF - Fator regulador de interferons

ISGF3 - Fator de gene estimulado por interferon 3

ISGs – Genes estimulados por interferons

JAK1 - *Janus* quinase 1

Kb – Kilobases

MAVS - Proteína de sinalização antiviral mitocondrial

MDA-5 - Gene 5 associado à diferenciação de melanoma

MIP-1 α - Proteína inflamatória de macrófagos 1 *alpha*

MOI - Multiplicidade de infecção

mRNA - Ácido ribonucléico tipo mensageiro

mTOR - Proteína alvo da rapamicina em mamíferos

MX1 - Gene de resistência ao myxovirus 1

NF κ B - Fator nuclear *kappa*-B

NK - Células *natural killer*

NS - Proteínas não estruturais

OAS2 - Sintetase 2'-5'-Oligoadenilato

OMS - Organização Mundial da Saúde

PAMP - Padrões moleculares associados a patógenos

PBS - Tampão fosfato salina

PE - Ficoeritrina

PFA – Paraformaldeído

PFU – Unidade formadora de placa

PIGF - Fator de crescimento placentário

prM - Precursor de membrana

PRRs - Receptores de reconhecimento de padrões

Ra – Rugosidade média

RANTES/CCL5 - Proteína regulada sob ativação, expressa e secretada por células T

RIG-I - Gene indutível por ácido retinóico I

RLRs - Receptores semelhantes a RIG

RNA – Ácido ribonucléico

RPL13 - Proteína Ribossômica L13

RT-qPCR - Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa quantitativa

SA-PE – Estreptavidina - ficoeritrina

SBF - Soro bovino fetal

SCZ – Síndrome Congênita do Zika Vírus

SGB - Síndrome de Guillain Barré

sPECAM-1 - Molécula de adesão celular endotelial plaquetária solúvel tipo 1

STAT - Proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição

TBK1 - Quinase ligante a TANK 1

TIM-1 - Proteína dos domínios de mucina 1 e imunoglobulina de células T

TLR – Receptor similar ao *Toll*

TNF- α - Fator de necrose tumoral *alpha*

TORCH - Toxoplasmose, Outros, Rubéola, Citomegalovírus, Herpes Vírus

TRITC - Isotiocianato de tetrametilrodamina

TYK2 - Tirosina quinase 2

Tyro3 - Receptor tirosina-proteína quinase

VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial

WNV – Vírus do Nilo ocidental

YFV – Vírus da febre amarela

ZIKV – Zika Vírus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 A placenta	20
2.1.1 Componentes Fetais	21
2.1.2 Componentes Maternos	24
2.2 O Zika Vírus	25
2.2.1 Histórico e Epidemiologia	25
2.2.2 Biologia Molecular do ZIKV	27
2.2.3 Patogênese: Manifestações Clínicas	28
2.2.4 Síndrome Congênita do Zika Vírus	29
2.2.5 Transmissão e Tropismo Celular	31
2.2.6 Resposta Imunológica ao ZIKV	32
2.2.7 Mecanismo de Infecção do ZIKV	35
2.3 O ZIKV e a placenta	37
3 OBJETIVOS	40
4 METODOLOGIA	41
4.1 Obtenção das Placentas	41
4.2 Propagação e Titulação do Zika Vírus	41
4.3 Isolamento de Células Citotrofoblásticas Extravilosas	42
4.4 Cultura de Explantes de Vilosidades Coriônicas	42
4.5 Cultura da linhagem celular HTR-8/SVneo	43
4.6 Infecção por Zika Vírus	43
4.7 Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR)	44
4.7.1 Quantificação do genoma do ZIKV	44
4.7.2 Expressão gênica relacionada a resposta antiviral	44
4.8 Imunofluorescência e marcação para faloidina	45
4.9 Medições por microscópio de força atômica (AFM)	45
4.10 Citometria de Fluxo	46
4.11 Dosagem de Citocinas por Citometria de Fluxo	46
4.12 Análise Estatística	47
5 RESULTADOS	48
5.1 Explantes Placentários a Termo	48
5.1.1 Susceptibilidade a Infecção pelo ZIKV	48
5.1.2 Expressão gênica e produção de citocinas relacionadas a resposta antiviral	49
5.1.3 Expressão de moléculas angiogênicas relacionadas	52

5.2 Linhagem celular HTR-8/SVneo.....	54
5.2.1 Susceptibilidade a Infecção pelo ZIKV.....	54
5.2.2 Efeitos da infecção por ZIKV na morfologia e topografia celular	56
5.2.3 Expressão gênica e produção de citocinas relacionadas a resposta antiviral	57
5.3 Células do Citotrofoblasto Extraviloso (CTEV).....	61
5.3.1 Susceptibilidade a Infecção pelo ZIKV.....	61
5.3.2 Efeitos da infecção por ZIKV na morfologia e topografia celular	63
5.3.3 Efeitos da infecção pelo ZIKV na sinalização e resposta antiviral	65
6 DISCUSSÃO	69
7 CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

O Zika vírus (ZIKV) é um arbovírus pertencente ao gênero *Flavivirus* (família *Flaviviridae*), que carrega um genoma de RNA de fita simples de sentido positivo e tem um envelope lipídico com glicoproteínas virais de superfície, com semelhança antigênica com outros membros desta família viral, incluindo o vírus da dengue (DENV), da febre amarela (YFV), do Nilo Ocidental (WNV) e da encefalite japonesa (COSTA; NOBREGA; TAVARES, 2020).

Descrito pela primeira vez em 1947 na Uganda (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952), o ZIKV circulou silenciosamente por várias décadas, apresentando apenas casos esporádicos em partes da África e da Ásia, com característica subclínica, muitas vezes diagnosticados erroneamente como outra infecção viral (BEAVER et al., 2018). Conforme se expandiu geograficamente, o ZIKV alterou seu comportamento, causando as primeiras grandes epidemias na Micronésia e na Polinésia Francesa, em 2007 e 2013, respectivamente, sendo associada a efeitos neurológicos (DUFFY et al., 2009; MALLET; VIAL; MUSSO, 2015). Entre sua descoberta e as epidemias recentes, duas principais linhagens de vírus foram reveladas através de análise filogenética, sendo elas africana e asiática (HADDOW et al., 2012).

Com uma rápida disseminação, em 2014, a cepa asiática chegou ao Brasil, se espalhando pelas Américas e revelando infecção congênita grave não conhecida anteriormente (COSTA; NOBREGA; TAVARES, 2020). A infecção materna durante a gravidez foi associada a defeitos congênitos que foram posteriormente agregados na Síndrome Congênita do Zika Vírus (SCZ), a qual inclui não apenas a microcefalia, mas também restrição do crescimento fetal, ventriculomegalia, calcificações intracranianas, atrofia cerebral grave, hidropisia fetal, anormalidades do corpo caloso, alterações oculares, distúrbio craniofacial, artrogrípse, perda auditiva e disfagia (MITTAL et al., 2017; MARQUES et al., 2019).

Apesar das complicações neurológicas mais graves estarem associadas a infecção no primeiro trimestre, a infecção pelo ZIKV pode acontecer em qualquer período gestacional, podendo apresentar complicações cognitivas, atrasos adaptativos motores, de linguagem e sociais, quando ocorre em períodos posteriores (TEIXEIRA et al., 2020). Essas alterações foram associadas com a identificação do ZIKV no líquido amniótico, placenta e encéfalo fetal (RASMUSSEN et al., 2016), comprovando a transmissão vertical do ZIKV e sua capacidade de infectar e transpassar a placenta.

Das diversas células que compõe a placenta, já foi descrito que o ZIKV se replica em células isoladas de vilosidades coriônicas de primeiro trimestre e membranas amniocoriônicas,

incluindo células citotrofoblásticas (vilosas e extravilosas), células de Hofbauer, células endoteliais do cordão umbilical e células epiteliais amnióticas, enquanto o sinciciotrofoblasto apresenta maior resistência ao vírus (TABATA et al., 2016; PEREIRA, 2018). A replicação viral também ocorre nas células decíduais e leucócitos decíduais, sendo esses possíveis facilitadores da transmissão vertical (PROENCA-MODENA et al., 2018).

Diversas linhagens de células trofoblásticas também foram comprovadamente infectadas pelo ZIKV. Em células HTR-8/SVneo, a infecção induziu a produção de interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 8 (IL-8) e ligante 2 de CC quimiocina/proteína quimiotática de monócitos (CCL2/MCP-1) (LUO et al., 2018). Já em explantes placentários a termo, o ZIKV induziu um aumento na produção de interferon (IFN) - β , IFN- γ , IFN- λ 1, IFN- λ 4, IL-6, IL-1 β e TNF- α , mostrando também aumento da clivagem da caspase-3 e morte celular (RIBEIRO et al., 2017).

A entrada do ZIKV nas células é facilitada por receptores como: receptor tirosina quinase (AXL) e receptor tirosina-proteína quinase (Tyro3), cluster de diferenciação 209 (CD209) e proteína dos domínios de mucina 1 e imunoglobulina de células T (TIM-1) (HAMEL et al., 2015). Na placenta, a expressão consistente e forte de TIM1, sugere que este seja um cofator importante da infecção viral, no entanto, o ZIKV não interage exclusivamente com um receptor, podendo usar vários deles para a entrada viral (TABATA et al., 2016).

Embora a placenta possua células e moléculas da imunidade inata para se defender contra agentes patogênicos, o ZIKV desenvolveu mecanismos para superar essas defesas e cruzar a barreira materno-fetal. Cada proteína não estrutural do ZIKV desempenha um papel importante na replicação viral e evasão das respostas imunes do hospedeiro, inibindo moléculas envolvidas nas vias de sinalização de IFN, que tem atividade antiviral, envolvendo *janus* quinase 1 (JAK1), tirosina quinase 2 (TYK2) e proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição (STAT). A via de sinalização da proteína quinase B/proteína alvo da rapamicina em mamíferos (AKT-mTOR), envolvida na autofagia também é utilizada pelo ZIKV para favorecer sua replicação (OJHA et al., 2018). Logo, essas vias e mecanismos estão sendo bastante estudadas, na tentativa de encontrar alvos terapêuticos para o ZIKV, mas ainda não foram visualizadas em células citotrofoblásticas extravilosas de placentas a termo.

Apesar do número de casos de ZIKV ter caído nos últimos anos, seu caráter endêmico e com o ambiente favorável a replicação no Brasil, torna muito provável novas epidemias futuramente e embora se apresente grande evolução no conhecimento sobre o ZIKV nos últimos anos, ainda existe uma série de lacunas, principalmente relacionadas aos mecanismos de infecção placentários, que necessitam ser preenchidas. O ZIKV é um patógeno que apresenta

limitações a pesquisa com modelo animal e necessita do estabelecimento de diferentes modelos de estudo. Dentro desse contexto, apresentamos dois modelos já conhecidos (linhagem celular e explante placentário) e um modelo novo para o estudo com ZIKV, usando células do citotrofoblasto extraviloso (CTEV) de decíduas basais de placentas a termo, que são extremamente importantes na manutenção da gestação. Logo, é interessante o estudo dos mecanismos de infecção do ZIKV em diferentes modelos placentários que possam fornecer informações sobre as vias de defesa do hospedeiro ou mecanismos de evasão viral do ZIKV na placenta. A nossa hipótese é a de que a patogênese do ZIKV inclui vias moleculares intracelulares específicas e diferenciais nessas células, que podem facilitar ou não a entrada do vírus e sua passagem para o feto, sendo assim passíveis de serem alvos terapêuticos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A placenta

A placenta é um órgão altamente especializado e de extrema importância para a saúde de uma mulher e seu feto durante a gravidez, funcionando como um agente único de simbiose humana, que combina em somente um órgão diversas atividades funcionais, exercendo as ações de todos os principais sistemas orgânicos, enquanto estes se diferenciam e amadurecem no feto (GUTTMACHER; MADDOX; SPONG, 2014).

Assim, realiza trocas gasosas, permitindo a passagem de oxigênio e gás carbônico por difusão passiva, assumindo a função dos pulmões fetais e influenciando diretamente a modulação respiratória materna, pois conforme o sangue fetal passa pela placenta, o dióxido de carbono é excretado, tornando o sangue materno mais ácido e reduzindo a afinidade pelo oxigênio na hemoglobina materna (VAUSE; SAROYA, 2005). A placenta também desempenha o transporte de nutrientes necessários para sustentar o crescimento fetal, principalmente glicose, aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e minerais, fornecendo substratos para o metabolismo, e elimina resíduos fetais, como ácido úrico e ureia que se difundem passivamente pelas estruturas placentárias (DONNELLY; CAMPLING, 2014).

Os efeitos circulatórios orquestrados pela placenta se dão a partir da invasão e remodelação das artérias espiraladas endometriais, realizada por uma subpopulação de células trofoblásticas, garantindo um fluxo constante de sangue materno para placenta em baixa velocidade e pressão (BURTON; FOWDEN; THORNBURG, 2016). Atuando como um importante órgão endócrino, a placenta secreta mais de 100 peptídeos e hormônios esteroides que modulam a fisiologia materna, agindo na manutenção da gravidez, preparação para o parto e lactação (BURTON; JAUNIAUX, 2015).

Além disso, a placenta é capaz de produzir moléculas sinalizadoras, incluindo serotonina, dopamina, norepinefrina/epinefrina, que podem influenciar o desenvolvimento cerebral do feto e o neurocomportamento materno. Essa relação íntima entre a placenta e o sistema nervoso central pode inclusive estar associada a distúrbios neurocomportamentais posteriores, atribuindo a placenta um papel mediador da programação fetal (ROSENFELD, 2021). Em última análise, a placenta também possui importantes propriedades imunomoduladoras, sendo responsável pela tolerância do embrião em formação, pelo sistema imunológico materno, que ao mesmo tempo deve ser eficiente no combate aos demais estímulos antigênicos, para proteger mãe e feto contra infecções (BURTON; JAUNIAUX, 2015; NELSON, 2015).

Esse órgão é composto por diferentes estruturas: o cório viloso (porção fetal), contendo as vilosidades coriônicas revestidas por sincitiotrofoblasto e citotrofoblasto viloso, que se posicionam sobre o mesênquima embrionário rico em macrófagos (células de Hofbauer), células mesenquimais e capilares fetais; e a decídua basal (porção materna), composta por glândulas endometriais, células deciduais, células imunológicas e componentes do sistema vascular arterial e venoso, além de um componente de origem fetal, as células do CTEV (BOYD; HAMILTON, 1970; BENIRSCHKE; BURTON; BAERGEN, 2012).

2.1.1 Componentes Fetais

Na superfície fetal, a placa coriônica, que se posiciona entre o âmnio e a base das vilosidades, carrega os vasos sanguíneos coriônicos fetais, ramificados dos vasos umbilicais e projeta as vilosidades coriônicas, determinando o espaço entre essas como espaço interviloso. Na placenta madura, o sangue materno entra nesse espaço pelas artérias espiraladas uterinas e circula ao redor das vilosidades. Essas são divididas em: vilosidades-tronco ou de ancoragem, que servem de suporte à árvore vilosa, fixando-se aos tecidos maternos; vilosidades intermediárias, que se ramificam das vilosidades-tronco; e vilosidades terminais, que representam as estruturas finais da árvore vilosa, onde acontecem as principais trocas de material entre as circulações materna e fetal (MONTENEGRO; FILHO, 2011).

Em geral, no primeiro trimestre, todas elas são envolvidas por citotrofoblasto viloso internamente e sincitiotrofoblasto externamente, e formadas por mesênquima extraembrionário, onde especificamente se encontram os vasos sanguíneos fetais, células mesenquimais e os macrófagos placentários ou células de Hofbauer, no entanto ao decorrer da gestação a camada de células citotrofoblásticas subsinciciais torna-se mais fina e descontínua, desaparecendo gradualmente até a fusão do sincitiotrofoblasto com os capilares fetais (BOYD; HAMILTON, 1970; JONES et al., 2008).

A maioria das vilosidades coriônicas é flutuante e possui contato com o sangue materno presente no espaço interviloso. No entanto, as vilosidades de ancoragem permanecem aderidas à decídua basal através da proliferação do citotrofoblasto, o qual extravasa os limites da vilosidade, formando colunas celulares e diferenciando-se em células CTEV no primeiro trimestre (BENIRSCHKE; BURTON; BAERGEN, 2012).

O termo “Extraviloso” é usado para todas as células que não pertencem a uma vilosidade coriônica. Dentre estas, destacam-se as células CTEV, que podem possuir fenótipo proliferativo ou invasivo (BOYD; HAMILTON, 1970; BAERGEN, 2011). As células CTEV proliferativas

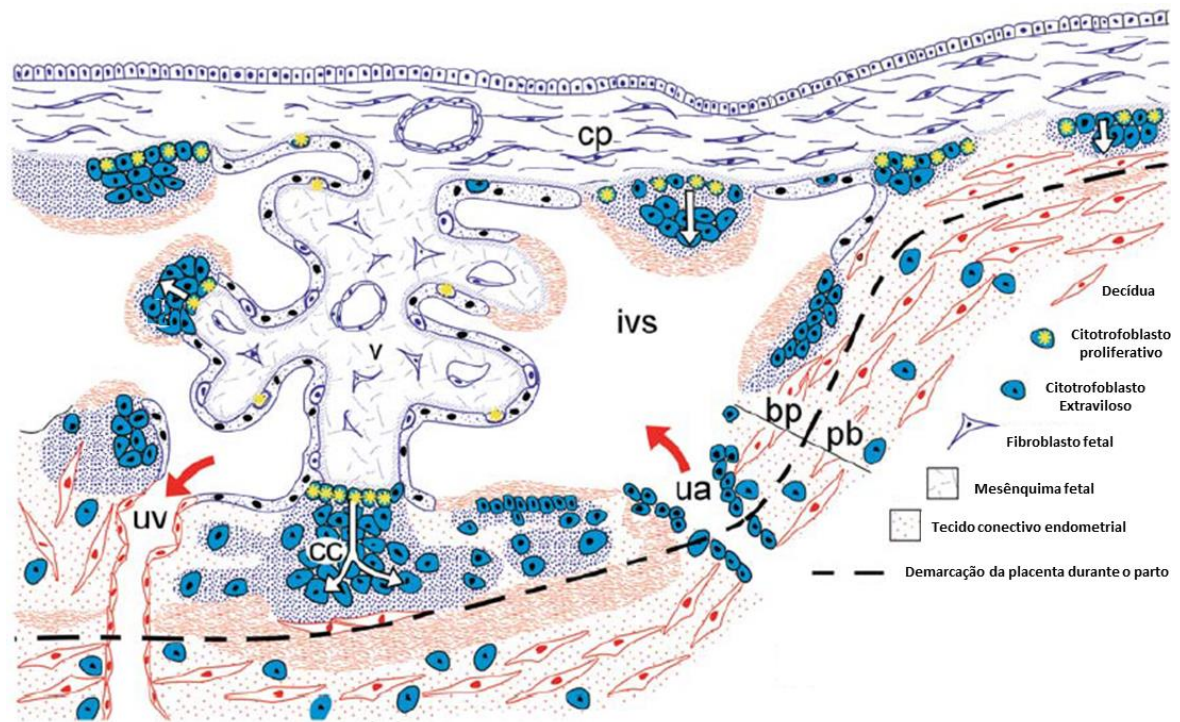
estão localizadas nas colunas celulares, que fazem parte das vilosidades de ancoragem, e apresentam grande atividade no primeiro trimestre (BENIRSCHKE; BURTON; BAERGEN, 2012). Já as células que possuem fenótipo invasivo se desprendem da porção distal das colunas celulares, tornando-se capazes de invadir as artérias uterinas, que caracteriza o CTEV endovascular, e o tecido materno, caracterizando o CTEV intersticial (Fig. 1) (KEMP et al., 2002; LOREGGER; POLLHEIMER; KNÖFLER, 2003; POLLHEIMER et al., 2018).

Ainda assim, as células CTEV apresentam outras rotas de diferenciação, categorizando subpopulações fenotipicamente distintas, como as células CTEV endovasculares, classificadas como intramural, quando localizada nas paredes das artérias e veias uteroplacentárias, substituindo estruturas da parede vascular; e classificadas como intra-arterial, quando está dentro dos lúmens das artérias, onde forma um novo revestimento de superfície ou forma tampões multicelulares, este último presente apenas no início da gestação (BAERGEN, 2011; BENIRSCHKE; BURTON; BAERGEN, 2012).

Quanto o grupo de células CTEV intersticiais, é subdividido conforme sua morfologia em CTEV pequenas e fusiformes, que prevalecem no primeiro e no segundo trimestre, mas são raramente encontradas em placentas a termo; CTEV grandes e poligonais, que aumentam numericamente com o avanço da gestação, sendo o tipo de célula trofoblástica dominante na placa basal a termo; e CTEV gigantes multinucleadas, altamente diferenciadas, encontradas profundamente na placa basal, com quantidades reduzidas progressivamente ao decorrer da gestação (Fig. 2) (BAERGEN, 2011; BENIRSCHKE; BURTON; BAERGEN, 2012).

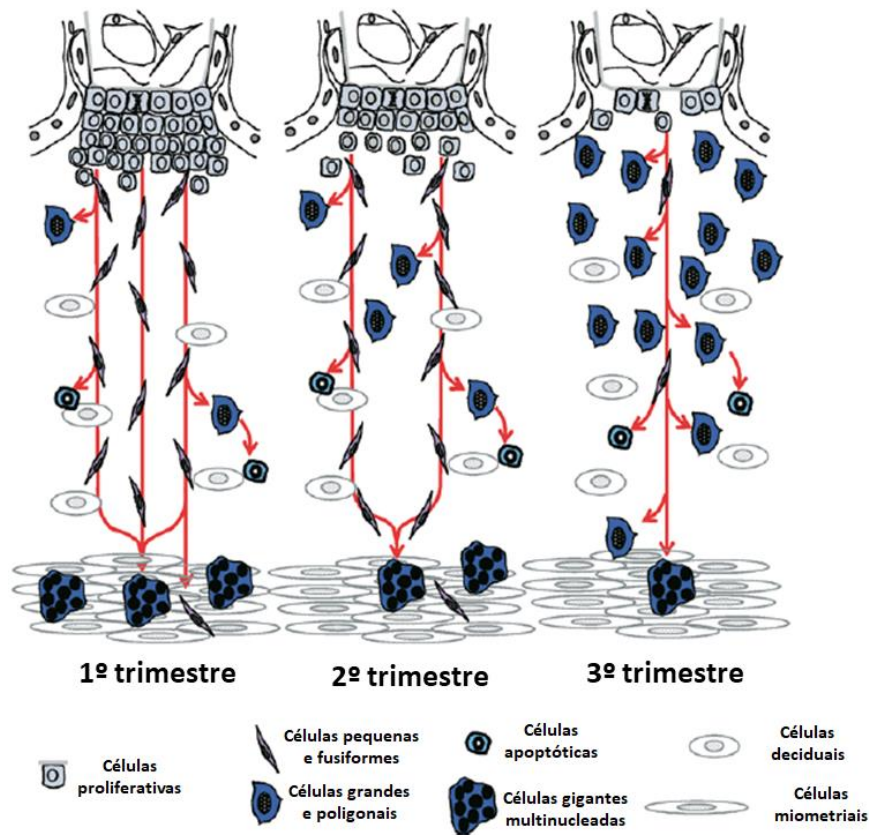
Os mecanismos funcionais de algumas dessas células ainda estão sob investigação, mas em geral, é conhecida a importância do CTEV para uma comunicação efetiva com diversas células da interface materno-fetal, o que ocorre principalmente na decídua basal (PIJNENBORG et al., 1981; WINTERHAGER; KAUFMANN; GRUEMMER, 2000; BULMER; WILLIAMS; LASH, 2009).

Figura 1 - Distribuição das populações de células trofoblásticas na placenta humana de primeiro trimestre.



Legenda: Células trofoblásticas proliferativas presentes na placa coriônica (cp), vilosidades (v) e colunas de células (cc), que se fundem sincicialmente ou se diferenciam em células citotrofoblásticas extravilosas invasivas, sendo encontradas em artérias uteroplacentárias (ua), placa basal (bp), placa coriônica (cp) e colunas celulares (cc). Rotas de invasão/migração são simbolizadas por setas e as populações trofoblásticas estão em azul CP – placa coriônica; V – vilosidade coriônica; CC – colunas celulares; ivs – espaço intervilosos; uv – veia uteroplacentária; ua – artéria uteroplacentária; bp – placa basal. Fonte: Adaptado de BAERGEN (2011).

Figura 2 - Visão geral dos subtipos de células envolvidas na invasão decidual e miometrial durante a gestação.



Fonte: BENIRSCHKE; BURTON; BAERGEN, 2012. Modificado de KEMP et al., 2002.

2.1.2 Componentes Maternos

Na superfície materna da placenta, além de células CTEV derivadas do feto, estão presentes todos os tipos de células da decídua uterina, incluindo células imunológicas e deciduais, provenientes da mãe. As células deciduais se originam de um processo denominado decidualização, onde em resposta aos níveis crescentes de progesterona no sangue materno, os fibroblastos uterinos acumulam glicogênio e lipídios em seu citoplasma, alterando seu perfil morfológico e funcional, e assumindo uma aparência epitelióide (BENIRSCHKE; BURTON; BAERGEN, 2012).

Quanto as células imunológicas presentes na decídua basal no primeiro trimestre: estão as células *natural killer* uterinas (aproximadamente 70% do total de células imunes) e células apresentadoras de antígeno (aproximadamente 30% das células imunológicas), entre as quais se destacam macrófagos e células dendríticas, além de diferentes populações linfocitárias. Essa região ainda contém grandes quantidades de matriz extracelular, fibrinóide e componentes do sistema vascular arterial e venoso (BENIRSCHKE; BURTON; BAERGEN, 2012;

POLLHEIMER et al., 2018; PEREIRA, 2018). Na placenta a termo, as células decíduais representam de 30 a 55% do total de células da decídua basal, linfócitos T representam cerca de 10% e macrófagos representam de 20 a 40%, participando ativamente de diversos processos gestacionais (MARZUSCH; DIETL, 1994; LOKE; KING, 1995; LOKE; KING; BURROWS, 1995).

Todos esses tipos de células e estruturas interagem entre si, apresentando importantes papéis na interface materno-fetal e formando uma barreira imunológica e física para patógenos. A saúde e o desenvolvimento fetal dependem do funcionamento adequado desses componentes, garantindo proteção contra substâncias potencialmente nocivas e micro-organismos. No entanto, ainda assim, alguns patógenos utilizam mecanismos que conseguem afetar a placenta de forma significativa, perturbando a homeostase natural e o bem-estar fetal, como é o caso do ZIKV (COSTA; NOBREGA; TAVARES, 2020).

2.2 O Zika Vírus

2.2.1 Histórico e Epidemiologia

O ZIKV é um arbovírus da família *Flaviviridae*, que foi isolado pela primeira vez de macacos Rhesus em 1947, na floresta de Zika, em Uganda. Em 1952, foram detectados os primeiros casos de infecção humana, no entanto, por apresentar um perfil de doença leve com casos esporádicos, o ZIKV permaneceu relativamente silencioso por quase 70 anos. Esse cenário mudou em 2007, com o primeiro surto de ZIKV na ilha de Yap, na Micronésia e, em 2013 com um segundo surto que ocorreu na Polinésia Francesa (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952; KAZMI et al., 2020).

Em um curto espaço de tempo, a epidemia se espalhou, chegando ao Brasil em 2014, e rapidamente atingindo outros países americanos, o que culminou na detecção do ZIKV em mais de 70 países ao redor do mundo em 2016, se transformando em uma emergência de saúde pública com preocupação internacional, declarada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), em decorrência da associação da infecção com doença congênita grave, não conhecida anteriormente (COSTA; NOBREGA; TAVARES, 2020). O Nordeste do Brasil foi considerado epicentro global das infecções por ZIKV, e o país foi severamente assolado pela epidemia, sendo registrados 216.207 casos prováveis de infecção pelo ZIKV em 2016, e 16.870 casos prováveis em 2017, com uma taxa de incidência de 8,2 casos/100 mil habitantes (BRASIL, 2017).

Ainda assim, esses dados podem ser subestimados, considerando que o Brasil é um país endêmico para outros arbovírus que produzem apresentações clínicas semelhantes ao ZIKV, o que dificulta o diagnóstico clínico e sorológico, devido à alta reatividade cruzada de anticorpos contra flavivírus, na ausência de ensaios baseados em anticorpos específicos para o ZIKV. Além disso, muitas pessoas sintomáticas não procuram atendimento médico, a menos que manifestem características graves, que podem se apresentar após o momento ideal para coleta da amostra e diagnóstico, contribuindo significativamente para a subnotificação dos casos (MCARTHUR, 2017; PROENÇA-MODENA et al., 2018)

Em 2020, até a semana epidemiológica 43 (29/12/2019 a 24/10/2020), foram notificados 7.006 casos prováveis de infecções por ZIKV no país, com taxa de incidência 3,3 casos/100 mil habitantes. Ainda assim, a região Nordeste apresentou o maior número de casos prováveis (5.169 casos; 73,8%), seguida pelas regiões Sudeste (792 casos; 11,3%), Centro-Oeste (587 casos; 8,4%), Norte (377 casos; 5,4%) e Sul (81 casos; 1,1%) (BRASIL, 2020). Diante disso, embora se observe uma redução da incidência do ZIKV no Brasil e no mundo (WHO, 2019a), suas repercussões continuam e ainda existem diversas lacunas de conhecimento sobre a infecção, sendo necessários esforços científicos para prevenir uma eventual nova epidemia.

Considerando o diferente comportamento da infecção pelo ZIKV durante a epidemia e as evidências de que ele causa neuropatologia e distúrbios cerebrais fetais, observa-se também uma mudança evolutiva na estrutura molecular e genética das cepas de ZIKV, o que contribuiu para sua rápida expansão, gravidade da patogenicidade e múltiplas rotas de infecções. A análise filogenética dos isolados coletados entre sua descoberta em 1947 e os surtos recentes revelou que o ZIKV evoluiu a partir de 3 linhagens distintas, incluindo a África Ocidental (aglomerado nigeriano), a África Oriental (aglomerado de protótipos MR766) e a linhagem asiática (OJHA et al., 2018).

A análise das cepas responsáveis pela epidemia nas Américas se mostrou filogeneticamente mais próxima da linhagem asiática. Embora a linhagem africana se mostre mais infecciosa, ela geralmente se apresenta como uma doença febril autolimitada, enquanto as linhagens asiáticas exibem infecções persistentes, com neuropatogenicidade aumentada e diversas vias de transmissão (HADDOW et al., 2012; BEAVER et al., 2018)

As diferenças entre as linhagens relacionadas a infectividade, virulência e patogênese evidenciam a evolução viral a partir de modificações genéticas. Foi descrita a substituição de 75 aminoácidos na cepa asiática em relação a cepa africana (ZHU et al., 2016), enquanto em relação a cepa asiática pré-epidêmica para a epidêmica houve apenas uma única mutação, que

resultou na substituição de serina por asparagina em sua poliproteína prM (YUAN et al., 2017). Assim, as mutações genômicas do ZIKV podem explicar a ampla disseminação e neuropatogenicidade aumentada do vírus na epidemia do Brasil (OJHA et al., 2018; PROENÇA-MODENA et al., 2018).

2.2.2 Biologia Molecular do ZIKV

O comprimento do genoma do ZIKV é de aproximadamente 11 kb, compreendendo uma molécula de RNA de fita simples de sentido positivo e um quadro de leitura aberto longo que codifica um único polipeptídeo, que é clivado em três proteínas estruturais: precursor de membrana (prM), Envelope (E) e Capsídeo (C); e sete proteínas não estruturais (NS): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Fig. 3) (PEREIRA, 2018; KAZMI et al., 2020).

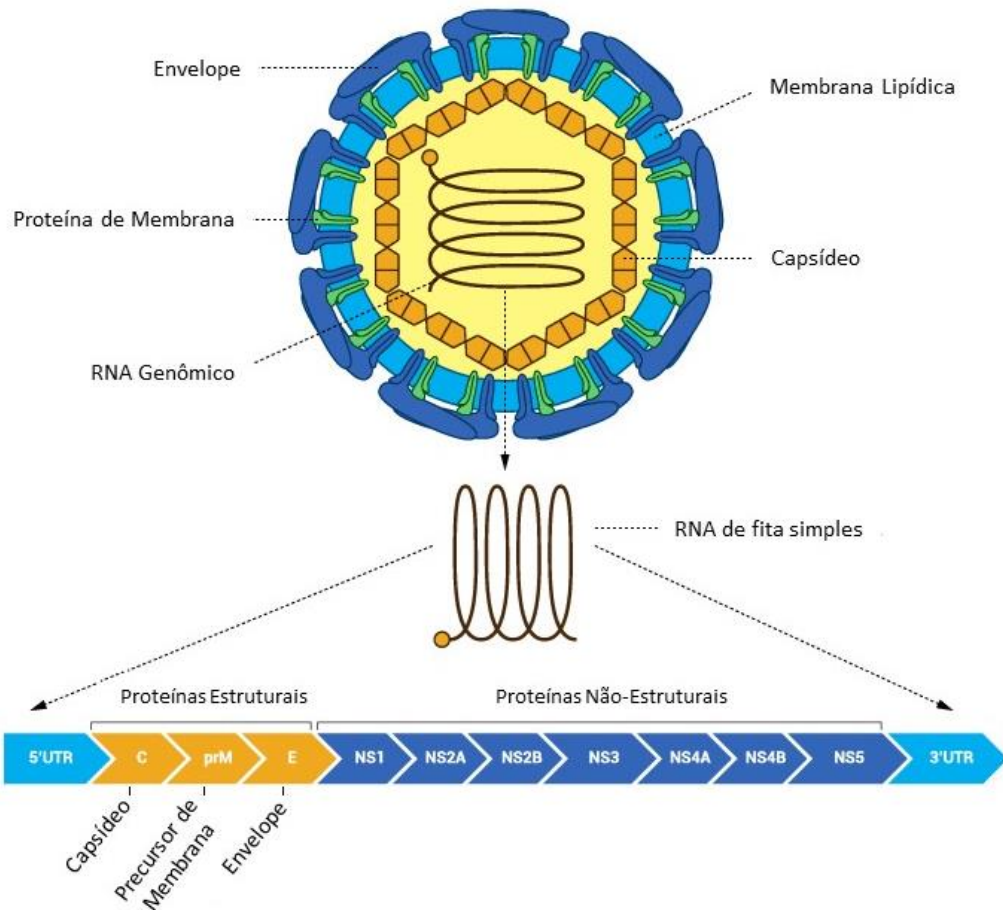
A proteína E está envolvida em várias características do ciclo viral, fusão da membrana e ligação a célula hospedeira e apresenta grande semelhança antigênica com outros flavivírus, como DENV e encefalite japonesa (TURRINI et al., 2016). O capsídeo é responsável por encapsular o RNA genômico, enquanto o prM atua como uma chaperona para a proteína E durante a montagem do vírion e já foi demonstrado que mutações nesta proteína podem aumentar o efeito teratogênico de cepas do ZIKV (YUAN et al., 2017). Enquanto o vírus em si é composto de proteínas estruturais, cada proteína NS desempenha um papel na replicação viral e na evasão das respostas imunes do hospedeiro (ROBY et al., 2015; KHAIBOULLINA et al., 2019).

As proteínas NS1, NS3 e NS5 são grandes e altamente conservadas, enquanto as proteínas NS2A, NS2B, NS4A e NS4B são pequenas e hidrofóbicas (GALÁN-HUERTA et al., 2016). A NS1 exerce um papel essencial na replicação do vírus e defesa antiviral associada a interferons, além de ser um forte imunógeno. Esta é inicialmente traduzida como monômero, torna-se glicosilada no retículo endoplasmático e subsequentemente forma um dímero que pode trafegar por vários locais dentro da célula. Sua forma secretada existe como hexâmetro e se acumula em altos níveis no soro e nos tecidos (XIA et al., 2018; BAILEY et al., 2018). As proteínas NS2 e NS3 são importantes durante a montagem do vírion (SAHOO; JENA; KUMAR, 2016), e além disso, NS3 junto com NS2B, funcionam como um complexo de protease e helicase (LEE; SHIN, 2019; KHAIBOULLINA et al., 2019).

A proteína NS4 interfere na sinalização intracelular e tem sido associada à autofagia e neurogênese alterada (LIANG et al., 2016); enquanto a NS5 contém um domínio RNA polimerase dependente de RNA, que é essencial para a replicação viral, e um domínio

metiltransferase, que está envolvido na tradução e evasão da resposta imune do hospedeiro (SHI; GAO, 2017). Todas as características da biologia estrutural do ZIKV refletem diretamente em sua patogênese clínica específica, sendo importantes para sua compreensão e identificação de futuros alvos terapêuticos.

Figura 3 - Estrutura genômica do ZIKV e suas proteínas.



Fonte: Adaptado de SINGH e colaboradores (2016). Disponível em promega.com/-/media/images/inspiration/zika/ZikaVirusStructureIllustration.png

2.2.3 Patogênese: Manifestações Clínicas

A infecção pelo ZIKV no estágio agudo se apresenta assintomática em até 80% das pessoas infectadas. Os casos sintomáticos, que são geralmente leves, podem incluir febre baixa, erupção cutânea maculopapular pruriginosa, artralgia e edema (principalmente nas pequenas articulações das mãos e pés), conjuntivite não purulenta, cefaleia, mialgia, astenia e dor retro-orbital (SINGH et al., 2016; COSTA; NOBREGA; TAVARES, 2020).

O ZIKV tem um período de incubação de 3 a 12 dias e a maioria das infecções seguem um curso benigno, com os sintomas desaparecendo em um período de 2 semanas. Essas manifestações clínicas são semelhantes à de outras doenças virais, como Dengue e Chikungunya, o que dificulta o diagnóstico clínico, mas o início abrupto de febre baixa e o aparecimento de erupções cutâneas que desaparecem entre 4-5 dias são aspectos característicos da infecção. Embora considerada uma doença branda e autolimitada, os recentes surtos de ZIKV geraram grande preocupação devido a associações com complicações neurológicas (GOEIJENBIER et al., 2016; MITTAL et al., 2017).

A Síndrome de Guillain Barré (SGB) é uma dessas complicações, que consiste em uma paralisia aguda, a qual se apresenta por uma fraqueza progressiva, bilateral e simétrica dos membros, frequentemente com hiporreflexia ou arreflexia. A SGB pode deixar até 20% dos pacientes gravemente incapacitados e levar cerca de 5% deles a óbito, devido ao envolvimento dos músculos respiratórios (MCARTHUR, 2017). Outras sequelas neurológicas também foram relatadas, menos frequentemente, como encefalite e mielite aguda (SOARES et al., 2016; MÉCHARLES et al., 2016).

Ademais, uma ampla gama de complicações está associada à infecção do ZIKV durante a gestação, apesar de comumente se apresentar de forma assintomática ou leve na mãe, pode induzir danos graves ao feto semelhantes aos encontrados nas infecções TORCH (Toxoplasmose, Outros, Rubéola, Citomegalovírus, Herpes Vírus), que consistem em um grupo de patógenos conhecidos pela sua capacidade de transmissão materno-fetal, estando associados a anomalias congênitas, o qual o ZIKV também integra atualmente (HANPRASERTPONG, 2017; LIANG et al., 2019; TEIXEIRA et al., 2020).

A associação da infecção materna pelo ZIKV a microcefalia fetal tornou-se um sinal alarmante para as autoridades de saúde globais, no entanto, seu impacto na gravidez não se limita a microcefalia, podendo levar a inúmeras disfunções morfofuncionais congênitas e complicações neurológicas, caracterizando a Síndrome Congênita do Zika Vírus (MITTAL et al., 2017; COSTA; NOBREGA; TAVARES, 2020).

2.2.4 Síndrome Congênita do Zika Vírus

O termo Síndrome Congênita do Zika Vírus (SCZ) foi adotado para descrever a gama de achados neuropatológicos associados à transmissão materno-fetal do ZIKV, que incluem a microcefalia com dano cerebral pronunciado, caracterizado principalmente por redução do desenvolvimento cortical e atrofia, ventriculomegalia, calcificações intracranianas,

anormalidades do corpo caloso, hipoplasia do cerebelo, distúrbio craniofacial, lesões oculares que afetam principalmente o desenvolvimento do nervo óptico, perda auditiva e disfagia. Artrogripose e polidrâmnio também são achados comuns, provavelmente relacionados ao comprometimento da deglutição devido a lesão cerebral. A infecção materna por ZIKV também está associada a restrição do crescimento intrauterino, abortamentos e óbito perinatal (MITTAL et al., 2017; LIANG et al., 2019; COSTA; NOBREGA; TAVARES, 2020).

Em 2016, no pico da epidemia no Brasil, foram notificados 216.207 casos prováveis de doença aguda pelo ZIKV e aproximadamente 8.604 bebês nasceram com malformações (WHO, 2019b). A microcefalia foi a primeira anomalia fetal associada ao ZIKV, sendo definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como a redução do perímetro cefálico ($\leq 31,9$ cm para meninos e $\leq 31,5$ cm para meninas) em neonatos advindos de gestações com 37 ou mais semanas de gestação (WHO, 2016). No entanto, a SCZ é determinada pelo conjunto de alterações clínicas, podendo se apresentar com ou sem microcefalia, e além disso, nem todas as mulheres grávidas infectadas com ZIKV irão parir neonatos com SCZ (REYNOLDS et al., 2017).

No caso de não haver anormalidades congênicas em bebês nascidos de mães infectadas, é necessário manter o acompanhamento e vigilância durante o primeiro ano de vida por exames periódicos de neuroimagem, oftalmológicos e de audição para diagnosticar casos subclínicos, considerando que existem relatos de defeitos de desenvolvimento pós-natal, onde bebês que parecem saudáveis ao nascimento podem apresentar complicações como atrasos adaptativos, problemas de desenvolvimento social, motor e de linguagem (STAPLES et al., 2016; PRATA-BARBOSA et al., 2019). Essa variação de resultados gestacionais frente ao ZIKV sugere que fatores adicionais extrínsecos e intrínsecos podem contribuir para as alterações neurológicas desencadeadas pela infecção (CAIRES-JÚNIOR et al., 2018; KHAIBOULLINA et al., 2019).

Os efeitos da infecção do ZIKV parecem estar associados ao período gestacional durante a qual ocorre, apesar de infectar qualquer período da gestação, os casos mais graves de alterações neurológicas fetais geralmente estão associadas à infecção no primeiro trimestre (PROENÇA-MODENA et al., 2018). O ZIKV infecta as células progenitoras neurais, inibindo seu crescimento e proliferação, e aumentando a apoptose, o que poderia explicar a sequência de malformações associadas a SCZ (WU et al., 2016; LIANG et al., 2019). Além disso, a infecção regula negativamente uma série de genes ligados à microcefalia (LI et al., 2016; WU et al., 2016). E as respostas inflamatórias da placenta devido a infecção viral também podem ser responsáveis por danos ao feto (MOR, 2016; SINGH et al., 2016).

Logo, são necessários maiores estudos para determinar os mecanismos moleculares específicos que levam à microcefalia e lesões neurológicas durante a infecção pelo ZIKV. A recente epidemia mostrou que o ZIKV se tornou um vírus de alta transmissibilidade e patogenicidade e que suas apresentações clínicas variam de erupções cutâneas leves a danos cerebrais graves, o que pode ser atribuído a sua capacidade de infectar diferentes tipos celulares.

2.2.5 Transmissão e Tropismo Celular

O ZIKV é transmitido principalmente por meio da picada de mosquitos *Aedes* sp., mas diferente de outros flavivírus, existem fortes evidências de infecção não vetorial, incluindo transmissão sexual, transfusão de sangue e transmissão vertical (GRISCHOTT et al., 2016). Alguns fluidos corporais, como leite materno, saliva e urina também foram relatadas como possíveis formas de transmissão do ZIKV, no entanto, esse potencial transmissível por contato direto ainda necessita de mais estudos (ALIOTA et al., 2017).

Consistente com suas múltiplas rotas de transmissão e associação com complicações em diversos órgãos, o ZIKV apresenta um amplo tropismo, onde vários tipos de células se apresentam suscetíveis à infecção, incluindo células derivadas de pulmão, fígado, pele, rim, ovário, placenta, retina, próstata, tecido muscular, tecido nervoso e tecido testicular (KHAIBOULLINA et al., 2019). Considerando a transmissão vetorial através da pele, o ZIKV infecta células dendríticas, queratinócitos e fibroblastos. Células epiteliais e células mononucleares do sangue periférico também são alvos virais (PROENÇA-MODENA et al., 2018; NGONO; SHRESTA, 2018).

Referente à transmissão sexual, diversas células dos sistemas reprodutores masculino e feminino são altamente permissivas ao ZIKV, incluindo espermatogônias e células de Sertoli em homens, e células epiteliais vaginais e fibroblastos uterinos em mulheres (MINER; DIAMOND, 2017). Nesse contexto, o RNA viral pode persistir no trato vaginal até 3 semanas após a resolução dos sintomas e em homens o ZIKV pode persistir no sêmen por 24 semanas, estando associado a alterações espermáticas, como baixa concentração de espermatozóides e motilidade prejudicada (PRISANT et al., 2016; MANSUY et al., 2019; AVELINO-SILVA et al., 2018).

No entanto, a via de transmissão mais preocupante para os humanos é a transmissão vertical durante a gravidez, considerando a SCZ e seus distúrbios neurológicos. Várias células placentárias são propensas à infecção pelo ZIKV, incluindo células de Hofbauer, células endoteliais e determinadas células trofoblásticas, o que demonstra o potencial transmissível da

placenta (LEE et al., 2018). Além disso, o ZIKV é capaz de infectar quase todos os tipos de células cerebrais, incluindo astrócitos, micróglia, células endoteliais microvasculares cerebrais, pericitos, oligodendrócitos e neurônios, além das células progenitoras neurais (OJHA et al., 2018).

A infecção por ZIKV também é capaz de romper a barreira hemato-retiniana, conforme visto pelos sintomas oculares, infectando células ganglionares, nervo óptico e córnea, sendo possível também a transmissão por meio de fluidos conjuntivais e lágrimas (NGONO; SHRESTA, 2018; LEE; SHIN, 2019). Além de tecidos fetais e placentários, o RNA do ZIKV foi encontrado no líquido amniótico e líquido cefalorraquidiano de recém-nascidos infectados, nesse último a carga viral foi encontrada persistindo mesmo após 6 meses, em casos de microcefalia grave (CAROD-ARTAL, 2018; BRITO et al., 2018).

A presença prolongada do ZIKV é outro aspecto diferencial em relação aos demais flavivírus, considerando que a resposta imune geralmente limpa o ácido nucleico viral em um curto período de tempo após o início dos sintomas. No entanto, de toda forma, uma vez que o vírus faz interação com o hospedeiro, uma rede de defesa imunológica integrada trabalha em conjunto para impedir o avanço da infecção viral (OJHA et al., 2018; LEE; SHIN, 2019).

2.2.6 Resposta Imunológica ao ZIKV

O ZIKV desencadeia uma série de respostas imunes inatas e adaptativas da célula hospedeira. O sistema imunológico inato é a primeira linha de defesa para controlar a infecção e sua patogênese. Iniciando pelo reconhecimento da invasão viral, o padrão molecular associado a patógenos (PAMP) é identificado pela célula hospedeira ativando diferentes tipos de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que podem ser receptores de superfície ou endossômicos (LEE et al., 2018).

No caso do ZIKV, pode ser reconhecido pelo receptor similar ao Toll 3 (TLR-3) endossomal, encontrado em macrófagos e células de Langerhans. A ativação de TLR-3 induzida pelo ZIKV promove a fosforilação do fator regulador de interferon 3 (IRF3) pela quinase ligante a TANK 1 (TBK1), induzindo ativação de genes envolvidos nas vias de sinalização do interferon tipo I (IFN-I). Esse mecanismo inicia uma cascata ativando também receptores semelhantes a RIG citoplasmáticos (RLRs), induzindo posteriormente a transcrição do gene indutível por ácido retinoico I (RIG-I), gene 5 associado à diferenciação de melanoma (MDA5) e vários genes estimulados por interferon (ISGs), incluindo sintetase 2'-5'-Oligoadenilato

(OAS2), gene estimulado por interferon 15 (ISG15) e gene de resist ncia ao myxovirus 1 (MX1) (HAMEL et al., 2015; DANG et al., 2016).

A ativa o da via de sinaliza o de IFN orchestra a resposta prim ria   infec o viral, onde os tr s tipos (IFN-I, IFN-II e IFN-III) interagem com seus respectivos receptores para iniciar uma s rie de eventos de fosforila o, envolvendo JAK1, TYK2 e STAT, induzindo a ativa o de ISGs, que possuem propriedades antivirais (BEAVER et al., 2018; LEE; SHIN, 2019).

O IFN tipo I, que se refere   via de sinaliza o cl ssica do IFN- α e IFN- β , s o produzidos por quase todas as c lulas do corpo e confere maior resist ncia   infec o por ZIKV, ligam-se a um receptor transmembranar heterodim rico IFNAR, que   composto pelas subunidades IFNAR1 e IFNAR2. IFN- β   codificado por um  nico gene IFNB, enquanto 14 genes distintos codificam v rias isoformas de IFN α (IVASHKIV; DONLIN, 2014; OJHA et al., 2018). Especificamente, a liga o de IFN- β secretado, ao seu receptor ativa JAK1 e TYK2, que por sua vez fosforilam STAT1 e STAT2, formando um heterod mero fosforilado com IRF9, promovendo a transcri o de ISGs mediada pelo fator de gene estimulado por interferon 3 (ISGF3) (BOWEN; ZIMMERMAN; SUTHAR, 2018).

Ao contr rio da resposta do IFN tipo I, que age inibindo a infec o pelo ZIKV, o IFN- γ (IFN-II) n o diminui a infec o, mas aumenta a transcri o de citocinas inflamatrias e quimiocinas inatas. Os n veis aumentados de IFN- γ durante a infec o pelo ZIKV podem estar associados   resposta das c lulas natural killer (NK), considerando que essas secretam altos n veis desta citocina no per odo infeccioso (CHAUDHARY et al., 2017; BOWEN; ZIMMERMAN; SUTHAR, 2018).

J  os IFN-III compreendem quatro variantes do IFN- λ (1 a 4), destas IFN- λ 1 a 3 compartilham homologias de sequ ncia de amino cidos altas, enquanto IFN- λ 4   mais divergente com apenas 40,8% de similaridade de amino cidos (SYEDBASHA; EGLI, 2017). Eles desempenham um papel importante na prote o de barreiras epiteliais e atuam ligando-se ao receptor heterodim rico IFNLR, ativando uma cascata de sinaliza o dependente da fosforila o de STAT (BAYER et al., 2016). Al m disso, c lulas do sistema nervoso central tamb m respondem a sinaliza o de IFN-III, no entanto, ainda s o necess rias maiores informa es sobre sua sinaliza o na infec o pelo ZIKV (LI et al., 2011; BOWEN; ZIMMERMAN; SUTHAR, 2018).

Ainda considerando a resposta imune inata, o ZIKV pode desencadear a autofagia de maneira dependente de c lulas. Esse processo de degrada o intracelular neutraliza a infec o removendo as prote inas virais por meio da reticulofagia, que consiste em uma forma seletiva

de autofagia que leva a degradação do retículo endoplasmático, ou inclusão de proteínas virais em autofagossomos destinados à degradação lisossomal (CHIRAMEL; BEST, 2018; LEE et al., 2018). Adicionalmente, a sinalização de IFN-I também promove a destruição autofágica da protease NS2B/NS3 viral de uma forma dependente de STAT1 (WU et al., 2017). E em células-tronco neurais fetais humanas, o ZIKV desencadeia a autofagia através da inibição da via de sinalização AKT-mTOR (LIANG et al., 2016).

O ZIKV também desencadeia várias respostas inflamatórias da célula hospedeira, sendo conhecido por regular positivamente citocinas, como as interleucinas (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 e IL-17, bem como a proteína 10 induzida por interferon (IP-10), proteína regulada sob ativação, expressa e secretada por células T (RANTES/CCL5), proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa (MIP-1 α) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), na fase aguda da infecção. Posteriormente, a maioria delas retorna aos níveis basais durante a fase de recuperação (TAPPE et al., 2016). Além disso, estudos mostram que as proteínas estruturais (C, prM e E) e não estruturais (especificamente NS1) são os principais alvos das respostas das células T CD8+ e T CD4+, o que sugere um papel importante das células T na proteção contra o ZIKV (GRIFONI et al., 2017; MCARTHUR, 2017).

Além da imunidade inata e celular, o ZIKV também pode induzir resposta imune humoral ao produzir anticorpos protetores e neutralizantes em humanos (DOWD et al., 2016). No entanto, esse efeito protetor mediado por anticorpos pode ser prejudicado em indivíduos previamente expostos a outros flavivírus, como o DENV, devido a um fenômeno imunológico conhecido como aumento dependente de anticorpos (ADE), que pode ocorrer devido a anticorpos de reação cruzada e fracamente neutralizantes. Nesse caso, anticorpos pré-existentes contra DENV podem aumentar a infecção pelo ZIKV, em vez de neutralizar, levando à doença mais grave. Ainda assim, essas evidências foram demonstradas *in vitro* e em modelo animal, sendo necessárias análises epidemiológicas que determinem a significância clínica dessa interação em áreas onde o ZIKV e o DENV co-circulam (MCARTHUR, 2017; SARIOL; NOGUEIRA; VASILAKIS, 2018; LEE et al., 2018).

Considerando as diferentes formas de defesa imunológica do hospedeiro contra a infecção viral, os vírus como o ZIKV, desenvolveram mecanismos evolutivos para fugir da detecção pelo sistema imunológico ou para neutralizar a resposta imunológica, levando assim a uma resposta alterada associada aos processos patogênicos no ciclo de vida viral. Logo, o resultado final do processo infeccioso depende do equilíbrio entre as respostas do hospedeiro e as ações de neutralização viral (LEÓN-JUÁRES et al., 2017; LEE et al., 2018).

2.2.7 Mecanismo de Infecção do ZIKV

Os flavivírus entram nas células hospedeiras por endocitose mediada por clatrina, que é iniciada quando as partículas virais se ligam aos receptores de superfície celular, que as direcionam para a via endocítica. O baixo pH do endossomo induz a fusão do envelope do vírion com as membranas celulares e após a remoção do nucleocapsídeo, o genoma do RNA viral é liberado no citoplasma, onde ocorre sua replicação e tradução de todas as proteínas virais. Os vírions se agregam por brotamento no retículo endoplasmático, transitam pela via secretora do hospedeiro e são liberados na superfície celular, continuando o ciclo infeccioso (GALÁN-HUERTA et al., 2016).

Evidências mostram que o ZIKV utiliza receptores de superfície celular para a entrada viral, incluindo os receptores AXL e Tyro3, CD209 e TIM-1 (HAMEL et al., 2015; BOWEN; ZIMMERMAN; SUTHAR, 2018). Os receptores AXL e Tyro3 são membros da família de receptores TAM (Tyro3-AXL-MER), que normalmente possuem como ligante a proteína específica de interrupção do crescimento 6 (Gas6) e são conhecidos por regular a imunidade inata e outros mecanismos celulares, incluindo proliferação, migração, adesão celular e sobrevivências em diferentes tipos de células (LEMKE; COHEN, 2010), enquanto CD209 e TIM-1 desempenham papéis importantes na sinalização de antígenos e na resposta do hospedeiro à infecção viral (LEE et al., 2018).

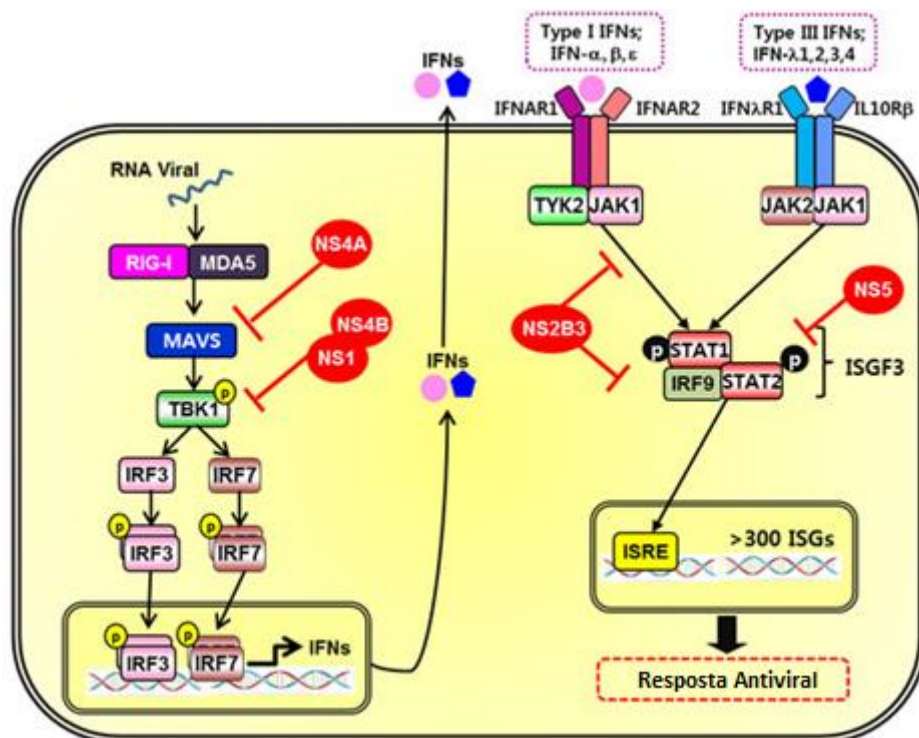
Entre os receptores mencionados, AXL é o mais estudado em relação à infecção pelo ZIKV, devido a sua associação com a entrada viral em diversos tipos celulares, incluindo células da pele, células endoteliais, células tronco neurais, micróglia, astrócitos e células progenitoras da retina (HAMEL et al., 2015; NOWAKOWSKI et al., 2016). Além disso, seu ligante Gas6 é capaz de reconhecer a partícula viral e funcionar como uma ponte entre o vírus e a células hospedeira (MEERTENS et al., 2017). No entanto, apesar de ter sido proposto como receptor principal para ZIKV, estudos mostraram que a inibição de AXL não impediu a infecção viral, sugerindo que a entrada do ZIKV e replicação subsequente não dependem exclusivamente desse receptor (WELLS et al., 2016; WANG et al., 2017). O ZIKV interage com CD209 para infectar macrófagos e células dendríticas (HAMEL et al., 2015) e TIM-1 mostrou um papel mais proeminente na infecção de células placentárias, apesar das mesmas também expressarem AXL e Tyro3 (TABATA et al., 2016).

Após a entrada viral, a replicação eficiente do ZIKV está associada à sua capacidade de antagonizar a respostas imune do hospedeiro, e para isso os vírus desenvolveram múltiplos mecanismos de evasão imune. As proteínas não estruturais (NS) desempenham um papel

importante durante o ciclo de vida viral, interagindo diretamente com as proteínas sinalizadoras da resposta imune inata, neutralizando a ação antiviral. As proteínas NS1 e NS4B inibem a produção de IFN-I por direcionamento a TBK1, evitando sua oligomerização e consequentemente bloqueando a ativação de IRF3. NS4A também pode participar desse processo ao interagir com a proteína de sinalização antiviral mitocondrial (MAVS) (WU et al., 2017; MA et al., 2018).

A sinalização de IFN-I também é inibida pela proteína viral NS2B em conjunto com NS3 (NS2B3), que promovem a degradação de JAK1 e a inibição da sinalização JAK-STAT, seguida pela inibição da apoptose induzida por ZIKV e aumento da replicação viral (OJHA et al., 2018). Além disso, a proteína NS5 interage com STAT2, visando sua degradação proteossomal, e assim comprometendo a fosforilação e recrutamento de STAT1-STAT2-IRF9, resultando no desligamento da tradução de ISGs (Fig. 4). Enquanto inibe a resposta de IFN-I e IFN-III, NS5 ativa seletivamente IFN-II (IFN- γ), sinalizando para induzir inflamação e também facilita a replicação viral, formando um complexo que interage com outras proteínas não estruturais (GRANT et al., 2016; CHAUDHARY et al., 2017; BOWEN; ZIMMERMAN; SUTHAR, 2018).

Figura 4 - Mecanismos de evasão imunológica do ZIKV.



Legenda: As proteínas virais, indicadas pela cor vermelha, podem interferir nas respostas do interferon (IFN) suprimindo a indução das vias de sinalização em várias etapas. Fonte: LEE; SHIN, 2019.

A via AKT-mTOR também foi identificada como um alvo das proteínas virais, sendo inibida por NS4A e NS4B, o que leva a uma regulação positiva da autofagia e neurogênese prejudicada na célula hospedeira. Ativando a via da autofagia, o ZIKV tira proveito da formação do autofagossomo, para aumentar sua replicação viral (HAMEL et al., 2015; LIANG et al., 2016). As proteínas não estruturais do ZIKV atuam sinergicamente para restringir a resposta antiviral e interferir com importantes mecanismos de sobrevivência e homeostase celular, visando a fuga do sistema imunológico do hospedeiro (LEE; SHIN, 2019).

É paradoxal que componentes da resposta imune aumentem a replicação viral e a patogênese relacionada. Além da via da autofagia, a ativação da via TLR-3, que pode detectar o patógeno após a entrada e levar a resposta antiviral, pode ocasionar uma resposta imune exagerada mediada por sua hiperativação, levando a um comprometimento da neurogênese. Sendo assim, o ZIKV utiliza a maquinaria do hospedeiro para manter seu ciclo de vida viral (OJHA et al., 2018).

No entanto, apesar dos diversos estudos realizados até o momento, os mecanismos exatos pelo quais o vírus entra nas células do hospedeiro e medeia anomalias cerebrais no feto, superando as defesas placentárias e cruzando a barreira materno-fetal ainda não são conclusivos, e considerando os graves efeitos da infecção congênita pelo ZIKV, torna-se especialmente importante a compreensão desses mecanismos, assim como a identificação das células da placenta envolvidas na patogênese viral.

2.3 O ZIKV e a placenta

A placenta protege o feto contra diversos agentes patogênicos presentes no sangue materno, no entanto, a infecção pelo ZIKV é capaz de superar as defesas placentárias e cruzar a barreira materno-fetal, trazendo diversas complicações fetais. O ZIKV apresenta um amplo tropismo para as células placentárias, incluindo células de Hofbauer, citotrofoblasto viloso, células decíduais, células endoteliais, fibroblastos e células epiteliais amnióticas, que expressam cofatores de entrada viral AXL, Tyro3 e/ou TIM1 (TABATA et al., 2016; COSTA; NOBREGA; TAVARES, 2020).

A expressão de alguns desses receptores variam substancialmente entre doadores, idade gestacional, estado de diferenciação e modelos experimentais, o que sugere que a entrada viral não acontece por apenas um único e dominante fator, a infecção por ZIKV em células trofoblásticas provavelmente envolve diferentes cofatores (CAO; DIAMOND; MYSOREKAR, 2017). No entanto, um estudo com um inibidor de TIM1 demonstrou uma redução da infecção de ZIKV de forma mais significativa em comparação com um inibidor de AXL, indicando

talvez um papel mais importante de TIM1 na infecção congênita do ZIKV, considerando que ele também é amplamente expresso em decíduas basais e parietais, vilosidades coriônicas e membranas amniocoriônicas (TABATA et al., 2016).

Embora o ZIKV seja capaz de infectar e se replicar em modelos de explantes de vilosidade coriônicas de diferentes idades gestacionais (TABATA et al., 2016; RIBEIRO et al., 2018), a camada de sinciciotrofoblasto se mostrou resistente à infecção, devido a liberação constitutiva de IFN- λ 1, que atua de forma autócrina e parácrina protegendo as células placentárias e não placentárias da infecção pelo ZIKV (BAYER et al., 2016). Além disso, a superfície sincicial tem propriedades físicas únicas, como a presença de microvilosidades densas e ramificadas na superfície apical e uma rede complexa de actina que limita a invasão de patógenos (ARORA et al., 2017). Ainda não está claro como o ZIKV poderia contornar esta camada da barreira placentária para acessar as células fetais subjacentes, mas mecanismos possíveis incluem o bloqueio da sinalização de IFN- λ 1, o rompimento da integridade da barreira placentária, com dano celular do sinciciotrofoblasto, a infecção via células imunes ou transcitose de vírions complexados com imunoglobulinas maternas via receptor Fc neonatal (FcRn) (OLAGNIER et al., 2016; CAO; DIAMOND; MYSOREKAR, 2017).

Hipóteses sobre a transmissão do ZIKV apoiam rotas de transmissão vertical: placentária, onde o CTEV seria infectado ao invadir a decídua basal; e paraplacentária, onde o ZIKV disseminado na decídua parietal, infectaria células trofoblásticas progenitoras e depois células epiteliais amnióticas da membrana, consequentemente, os vírus liberados no líquido amniótico poderiam infectar diversas células fetais susceptíveis. Essas rotas de transmissão se destacam ao considerar a persistência do ZIKV no sangue materno e na decídua durante a gravidez, a carga viral elevada nas membranas fetais e no líquido amniótico, dano placentário limitado com alta taxa viral no cérebro fetal, maior frequência de casos sintomáticos de infecção congênita no início da gestação em comparação com o final da gestação e uma janela estreita após a infecção primária até o desenvolvimento de anomalias fetais, sugerindo infecção direta do feto (TABATA et al., 2016; DRIGGERS et al., 2016; WEISBLUM et al., 2017).

Assim que os vírions ou células infectadas entram em contato com a interface fetal, as células desse microambiente tornam-se alvos da replicação viral. As células de Hofbauer são consideradas alvos principais do ZIKV que podem participar da disseminação viral e promoção da transmissão vertical (SIMONI et al., 2017). Em explantes de vilosidades coriônicas de placentas de primeiro trimestre, o ZIKV também infectou células citotrofoblásticas proliferativas e invasivas (células de ancoragem) (TABATA et al., 2016). Sendo assim, essas células são consideradas importantes no mecanismo de transmissão vertical do ZIKV.

Além da variedade de células que suportam a infecção pelo ZIKV na interface materno-fetal, os estudos sugerem suscetibilidade e mecanismos distintos de patogênese de acordo com a idade gestacional, apresentando desfechos mais graves diante de infecções no primeiro trimestre (OLAGNIER et al., 2016; RASMUSSEN et al., 2016). Células trofoblásticas das fases iniciais do desenvolvimento, são sensíveis ao ZIKV, mas tornam-se cada vez mais resistentes à medida que se diferenciam (SHERIDAN et al., 2017), consistente com isso, a camada de citotrofoblasto viloso torna-se mais fina e parcialmente descontínua após o primeiro trimestre, reduzindo a camada suscetível ao vírus na estrutura vilosa (JONES et al., 2008).

Ainda assim, a infecção em estágios mais avançados da gestação também pode provocar efeitos deletérios ao feto, e diante disso, se destaca também o papel potencial da decídua basal como um local de transmissão contínua do ZIKV, permanecendo suscetível ao longo da gestação (WEISBLUM et al., 2017). O RNA viral pode ser detectado na placenta após vários meses dos primeiros sintomas, sendo assim um tecido de persistência viral durante a gravidez (DRIGGERS et al., 2016). Já os achados morfológicos e anatomopatológicos da placenta foram relatados como inespecíficos e leves, incluindo inflamação crônica, aumento das células de Hofbauer, vilite crônica, imaturidade vilosa, fibrose estromal e calcificação, aumento da fibrina perivilosa, deciduitis linfocítica e necrose focal do sinciciotrofoblasto (NORONHA et al., 2016; RITTER; MARTINES; ZAKI, 2017).

Considerando que a infecção congênita do ZIKV está relacionada intimamente com as células da placenta, e que essas possuem um papel crítico nos mecanismos de transmissão vertical, torna-se esse órgão foco de investigações que poderiam preencher as lacunas de conhecimento existentes sobre o ZIKV, principalmente nos casos de infecções ocorrendo no terceiro trimestre e termo, visto que as vilosidades placentárias são mais resistentes à entrada do vírus (BAYER et al., 2016). Logo, é altamente relevante a pesquisa de aspectos imunológicos e moleculares da infecção nesse período gestacional, e relacionados a patogênese viral, os quais podem fornecer informações importantes e alvos que possam ser direcionados terapêuticamente, evitando a passagem do ZIKV pela placenta e infecção do feto.

3 OBJETIVOS

O principal objetivo deste estudo foi investigar os aspectos morfológicos, imunológicos e moleculares associados à fisiopatologia da infecção gestacional pelo ZIKV em diferentes modelos, focando no final da gestação.

Como objetivos específicos:

- Verificar se o ZIKV infecta células CTEV de fim de gestação
- Avaliar diferenças topográficas das células infectadas com ZIKV
- Analisar a influência do ZIKV na produção de citocinas
- Avaliar a ativação das vias de sinalização e genes alvo após infecção pelo ZIKV

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção das Placentas

As amostras de placentas utilizadas foram provenientes de gestações saudáveis coletadas no momento do parto no Hospital Geral Santo Antônio e no Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes, ambos em Maceió/AL, conforme os princípios éticos, práticos e de biossegurança estipulados pelo Ministério da Saúde e pela Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). O uso de placentas foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFAL, através do sistema unificado da Plataforma Brasil (CAEE 57828616.3.0000.5013), e com consentimento informado de todas as pacientes, de acordo com as diretrizes do Ministério da Saúde. Vinte placentas a termo (37-40 semanas de gravidez) derivadas de cirurgias cesarianas foram obtidas de pacientes com idade materna entre 18 e 40 anos, com 0 a 3 gestações anteriores e sem histórico prévio de doenças gestacionais. Foram utilizados como critérios de inclusão para este estudo: admissão no serviço de obstetrícia dos hospitais; ausência de enfermidades de caráter autoimune, infeccioso ou genético; parto ou cirurgia nesse Serviço Obstétrico; e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, conforme recomendações éticas. As considerações éticas foram baseadas no uso do material para fins científicos, com sigilo da identidade das pacientes e sem constrangimento das instituições ou pessoas envolvidas.

4.2 Propagação e Titulação do Zika Vírus

Duas cepas de ZIKV foram gentilmente fornecidas pelo Dr. Juliano Bordignon, do Instituto Carlos Chagas da Fundação Oswaldo Cruz (ICC / FIOCRUZ-PR, Brasil): a cepa MR766 (isolada na Uganda em 1947, terceira passagem, titulação de estoque de $6,25 \times 10^7$ FFU/mL, acesso ao GenBank KX421193) e a cepa PE243 (isolada no Brasil em 2016, terceira passagem, titulação de estoque de 1×10^8 FFU/mL, acesso ao GenBank MF352141.1). Os procedimentos de propagação e titulação viral foram realizados em células cedidas pela Prof.^a Alessandra Borges e em parceria com o Prof. Ênio Bassi, ambos do Laboratório de Pesquisa em Virologia (LAPEVI/ICBS) da UFAL. Resumidamente, ambas as linhagens virais foram incubadas, separadamente, em células C6/36, derivadas de *Aedes albopictus*, ou Vero E6, derivadas do rim do macaco verde, em estufa à 37 °C com 5% de dióxido de carbono (CO₂). Após 90 minutos, o inóculo foi removido e substituído por meio Leibovitz L-15 (Gibco, Grand Island, EUA) ou meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma- Aldrich) suplementado com 2% de soro bovino fetal (SBF) (Sigma- Aldrich) e 1% de antibióticos. Os

sobrenadantes sem células foram colhidos 5 dias após a infecção (dpi), divididos em alíquotas e armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para estoque viral. Os títulos foram determinados pelo ensaio de formação de placas conforme descrito anteriormente (BAER; KEHN-HALL, 2014), sendo realizada infecção em células Vero E6 por 1 h, posteriormente o meio foi trocado e as células foram incubadas com 1% de carboximetilcelulose (CMC) em meio DMEM (Sigma- Aldrich) com 2% de SBF a 1:1 (v/v). A formação da placa foi observada no 5º dpi, após fixação com formalina tamponada a 10% e coloração com cristal violeta a 2%. A titulação viral da cepa MR766 foi estocada a 5×10^5 PFU/mL e PE243 a 3×10^5 PFU/mL, para uso nos experimentos.

4.3 Isolamento de Células Citotrofoblásticas Extravilosas

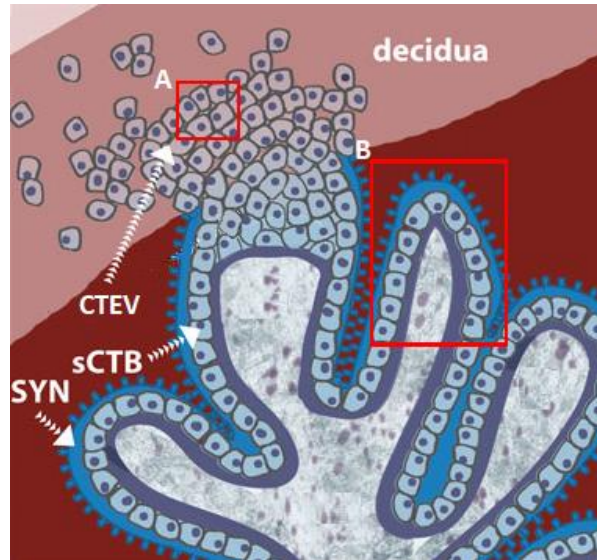
O isolamento das células CTEV da decídua basal de placentas a termo (Fig. 5) foi realizado conforme descrito por BORBELY e colaboradores (2014). Após o parto, a decídua basal foi cuidadosamente separada das vilosidades coriônicas, lavada exaustivamente em tampão fosfato salina (PBS) (Sigma- Aldrich) e em solução salina balanceada de Hank (HBSS) (Gibco) e triturada a seco. Em seguida, o tecido foi digerido enzimaticamente em 1 mg/mL de colagenase II e 25 U/mL de DNase I (ambas da Sigma-Aldrich) por 1 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Logo após, a atividade enzimática foi inativada com SBF e o sobrenadante duplamente filtrado em *cell strainer* de 100 μm e 70 μm , sequencialmente. O material foi centrifugado a 400 g por 10 min a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e ressuspenso em meio DMEM/F12 (Sigma, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de SBF, 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina, gentamicina), 0,01% de insulina, 520 $\mu\text{g/mL}$ de lactato de cálcio e 56 $\mu\text{g/mL}$ de piruvato de sódio (todos da Life Technologies), formando o que denominamos DMEM/F12 completo. As células foram separadas por gradientes de densidade de Percoll (30% e 60%; GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) durante centrifugação a 700 g por 30min a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a camada acima do gradiente de 30% foi coletada. As hemácias remanescentes foram lisadas utilizando centrifugação a 400 g por 5min a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ em solução de cloreto de amônio a 0,83% em água ultrapura de pH 7,0 e após lavagens em PBS, as células foram contadas e plaqueadas em fibronectina (Sigma-Aldrich), sendo mantidas em estufa à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ com 5% de CO_2 , em meio DMEM/F12 completo.

4.4 Cultura de Explantes de Vilosidades Coriônicas

Amostras do tecido placentário foram lavadas extensivamente em PBS e HBSS, seguidas da separação cuidadosa com auxílio de bisturi das vilosidades coriônicas terminais

(Fig. 5) para cultura de explantes de aproximadamente 5mg e 3-4mm de diâmetro em placas de 48 poços com meio DMEM/F12 suplementado e mantidas em incubadora úmida a 37 °C e 5% de CO₂, conforme descrito anteriormente (MILLER et al., 2005; HERMANNNS et al., 2018).

Figura 5 - Estrutura da placenta humana e regiões isoladas nos modelos experimentais.



Legenda: A – Citotrofoblasto extraviloso (CTEV); B – Vilosidade Coriônica, composta por sincitotrofoblasto (SYN) e citotrofoblasto subsincicial (sCTB). Fonte: Adaptado de ROBBINS et al., 2010.

4.5 Cultura da linhagem celular HTR-8/SVneo

A linhagem HTR-8/SVneo (ATCC® CRL-3271™), originada do citotrofoblasto extraviloso de primeiro trimestre de gestação, foi gentilmente doada pela Prof. Estela Bevilacqua da Universidade de São Paulo (USP, São Paulo, Brasil). As células foram mantidas em meio DMEM/F12 suplementado com 10% de SBF e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina, gentamicina) e anfotericina B (Sigma-Aldrich), em incubadora úmida a 37 °C e 5% de CO₂. As células foram subcultivadas a cada 5 dias com 80% de confluência e o meio foi reabastecido a cada 2 dias.

4.6 Infecção por Zika Vírus

A cultura primária de CTEV e a linhagem HTR-8/SVneo foram infectadas após adesão das células, com as duas cepas virais já mencionadas a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 1 (LUO et al., 2018) e incubadas por 24 h. Posteriormente, foram lavadas com PBS para remoção completa do inóculo e mantidas em DMEM/F12 com 2% de SBF por 24 h em estufa à 37 °C com 5% CO₂. Os explantes placentários (4 por poço) foram infectados com $1,5 \times 10^5$

PFU/mL (HERMANNNS et al., 2018) das duas cepas do ZIKV, com período de adsorção de 24 h, lavados e mantidos com novo meio de cultura. Todos os sobrenadantes foram armazenados 24 horas pós-infecção (hpi) para posterior análise.

4.7 Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR)

4.7.1 Quantificação do genoma do ZIKV

A carga viral de RNA dos sobrenadantes das células foi extraída usando o Mini Kit de RNA / DNA Viral PureLink™ (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado e amplificado usando M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Em seguida, as cópias do RNA do ZIKV foram quantificadas usando o sistema de PCR em tempo real StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, CA, EUA). Para cada reação de amplificação de poço único, foi avaliado um ciclo limiar (Ct) na fase exponencial. Os *primers* utilizados foram descritos por Lanciotti e colaboradores (2008) (ZIKV 1086: CCGCTGCCCAACACAAG e ZIKV 1162c: CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT).

4.7.2 Expressão gênica relacionada a resposta antiviral

Os experimentos foram realizados em parceria com o Prof. Milton Moraes da ICC/FIOCRUZ-RJ. O RNA total foi extraído das células e explantes placentários utilizando Trizol® (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), conforme especificações do fabricante e o cDNA foi sintetizado utilizando o kit Superscript® First Strand (Life Technologies). Em parceria com a FIOCRUZ-RJ, cada amostra foi usada para quantificar o mRNA de IFN- α , IFN- α R1, IFN- λ 1, IFN- λ 4, IDO1, IFIT5, RIG-I e ISG15, bem como o gene de referência RPL13. Para tanto, utilizou-se o master mix Sybr Green (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA) com 200 nM de cada primer (forward e reverse) e 10ng de cada cDNA em um volume final de reação de 10 μ L. As amplificações foram realizadas no sistema ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA), nas condições: 95 °C por 10 minutos, 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 4 minutos, durante 45 ciclos. Os dados obtidos foram normalizados para o valor médio do limiar de ciclagem do gene de referência RPL13.

4.8 Imunofluorescência e marcação para faloidina

Todos os grupos de cultura foram fixados com paraformaldeído (PFA) a 4% em PBS por 15 minutos em temperatura ambiente. O fixador foi removido e as amostras foram lavadas três vezes com PBS. Foi realizada permeabilização com Triton X-100 (Sigma-Aldrich) a 0,1% em PBS por 10 minutos, bloqueio de antígenos inespecíficos com gelatina de pele de peixe a 0,05% (Merck / Sigma-Aldrich, Alemanha) em PBS por 30 minutos e bloqueio da autofluorescência com PBS contendo 3% de glicina por 30 minutos. Em seguida, foi realizada a incubação do anticorpo primário fabricado em camundongo anti-ZIKV NS1 (1:100, v/v em gelatina de pele de peixe; E107, MA5-24585, Invitrogen, Reino Unido), overnight a 4°C. Posteriormente, após lavagem com PBS, foi realizada incubação com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) (1:50, v/v em gelatina de pele de peixe; Sigma-Aldrich) por 1 hora em temperatura ambiente e lavados novamente. As células foram coradas com faloidina conjugada com fluoresceína (FITC) (1:50, v/v em PBS; Abcam, Cambridge, Reino Unido) por 1h, os núcleos foram corados com 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; 1:1000, v/v em PBS; Merck / Sigma-Aldrich) e a montagem foi realizada com PBS/glicerol (1:3, v/v) sob lamínulas de vidro. Os resultados foram visualizados com um microscópio de fluorescência Nikon DS-Ri1 (Nikon, Japão) e as imagens foram obtidas utilizando o *software* DP2-BSW (Nikon).

4.9 Medições por microscópio de força atômica (AFM)

Para microscopia de força atômica, todos os grupos de cultura foram fixados com glutaraldeído a 0,5% em PBS. As imagens topográficas e análises de rugosidade foram realizadas em parceria com o Laboratório de Óptica e Nanoscopia (IF/UFAL), utilizando um AFM Multiview 4000™ (Nanonics, Israel), combinado com microscópio óptico (BXFM, Olympus, Japão). Essa combinação permitiu o posicionamento lateral da ponta do AFM sobre a região nuclear da célula com precisão em escala micrométrica. Para as medidas de rugosidade foi utilizada a mesma frequência de cortes das imagens para a filtração, em nove varreduras de segmentos aleatórios de um total de doze células (totalizando 108 varreduras) de experimentos distintos. As imagens foram obtidas a partir da varredura das células com a ponta do cantilever e processadas com o programa WSxM (Nanotec Electrónica SL, Espanha).

4.10 Citometria de Fluxo

Para analisar a porcentagem de células infectadas pelo ZIKV ou de marcadores específicos associados a infecção, as células foram removidas do substrato com tripsina-EDTA (Gibco, Life Technologies), a ação enzimática foi neutralizada com soro de cabra (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) a 10% em PBS por 20 minutos e a fixação e permeabilização foram realizadas usando kits comerciais de citometria de fluxo (e-Bioscience, San Diego, CA, EUA) de acordo com as instruções do fornecedor. Anticorpos primários (Tabela 1) foram incubados com anticorpos secundários conjugado Zenon Alexa 488 (1:2,5, v/v, em solução tampão do kit; Thermo Fisher Scientific), Zenon Alexa 647 (1:2,5, v/v, em solução tampão do kit; Thermo Fisher Scientific), TRITC (1:100, v/v, em solução tampão do kit; Sigma) ou FITC (1:100, v/v, em solução tampão do kit; Abcam) por 5 min para formar um imunocomplexo com adição do Reagente Bloqueador Zenon (1:2,5, v/v, em solução tampão do kit; Invitrogen) por mais 5 min. O imunocomplexo foi posteriormente incubado com células por 1 h a 37 °C. A porcentagem de células infectadas com ZIKV foi analisada com citômetro de fluxo FACS Canto™ II (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), com o programa FACSDiva (BD Biosciences). Um total de 10.000 eventos foram adquiridos por amostra e os dados obtidos foram analisados utilizando o *software* FlowJo (TreeStar, Ashland, OR, EUA).

Tabela 1 - Lista de anticorpos primários

Anti-HLA-G1 (1:100, Invitrogen)

Anti-ZIKV NS1 (1:100, Invitrogen)

Anti-p-IRF3 (1:200, Cell Signalling)

Anti-IRF9 (1:200, Cell Signalling)

Anti-p-STAT2 (1:200, Cell Signalling)

4.11 Dosagem de Citocinas por Citometria de Fluxo

A dosagem de citocinas nos sobrenadantes foi realizada utilizando os kits comerciais LEGENDplex™ Human Anti-Virus Response Panel 13-plex (BioLegend, EUA) quanto a presença de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF- α , IP-10, GM-CSF, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN- λ 1 e IFN- λ 2/3 e LEGENDplex™ Human Angiogenesis Panel 1 (BioLegend, EUA), quanto a presença de Angiopietina-1, Angiopietina-2, FGF-b, sPECAM-1, PlGF e VEGF. Resumidamente, os sobrenadantes e os padrões de citocinas do kit foram incubados com microesferas de captura de dois tamanhos e níveis diferentes de fluorescência e recobertas com anticorpos específicos para as respectivas citocinas e com o anticorpo de detecção marcado com

ficoeritrina (PE). Após as incubações de 2 horas em constante agitação, no escuro e à temperatura ambiente, foi adicionado estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE) o qual se liga aos anticorpos de detecção biotinilados, fornecendo sinal fluorescente com intensidades em proporção à quantidade de analito ligado. A detecção das citocinas foi realizada em citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Biosciences) equipado com o programa de computador Diva (BD bioscience), após a aquisição de 3.000 microesferas. Os resultados da citometria de fluxo foram convertidos para a secreção de pg/mL utilizando o programa LEGENDplex (BioLegend, EUA).

4.12 Análise Estatística

Os ensaios foram realizados em 3n, no mínimo, e em triplicata para cada amostra, e os resultados foram expressos em média e desvio padrão. A avaliação estatística foi determinada utilizando testes não paramétricos, teste de Mann-Whitney e ANOVA, seguido do pós-teste de Dunnett ou Tukey, dependendo do experimento. Na legenda das figuras estará indicado o tipo de análise estatística realizada, assim como o número de experimentos realizados. Valores estatisticamente significantes foram considerados quando $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas no GraphPad Prism v.7 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

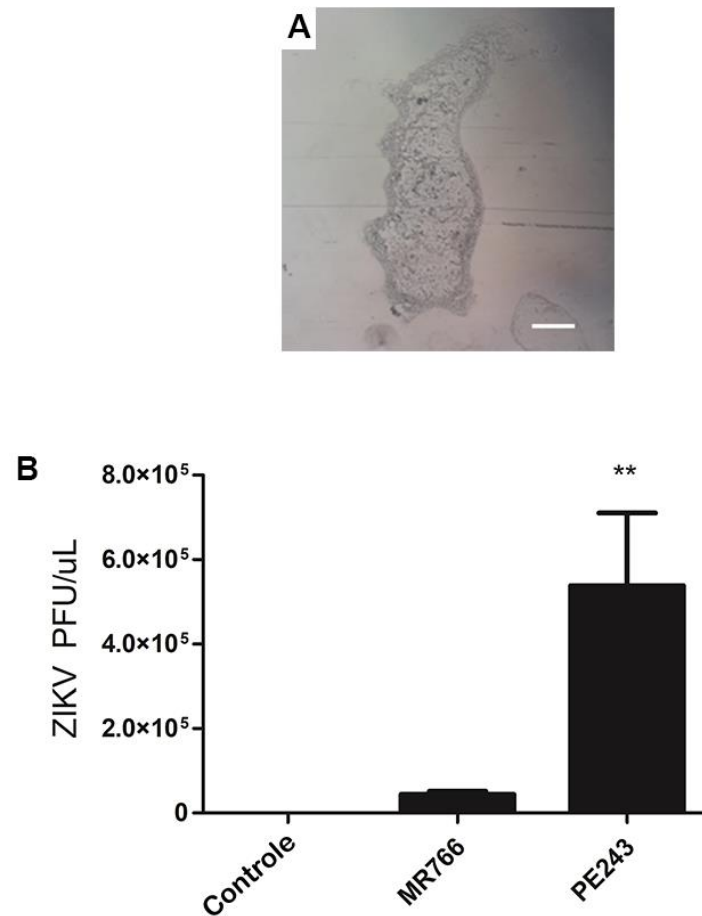
5 RESULTADOS

5.1 Explantes Placentários a Termo

5.1.1 Susceptibilidade a Infecção pelo ZIKV

O modelo de explante placentário, amplamente utilizado em estudos envolvendo mecanismos atuantes na interface materno-fetal, foi padronizado em cultura (Fig. 6A), conforme protocolos estabelecidos na literatura. Para verificar a susceptibilidade dos explantes placentários a infecção pelo ZIKV, os sobrenadantes de cultura obtidos após 24 hpi foram analisados por RT-qPCR, onde foi possível observar que esse modelo suporta a infecção e replicação viral apenas da cepa asiática PE243 ($5,38 \pm 1,72 \times 10^5$; $p = 0,007$), considerando os elevados níveis de carga viral apresentada, quando comparado com o tecido controle não infectado. Por outro lado, explantes placentários a termo se mostraram resistentes a cepa africana MR766, não apresentando replicação viral significativa (Fig 6B). Considerando que os explantes das vilosidades coriônicas foram suscetíveis apenas a cepa PE243, as análises posteriores foram realizadas somente com essa cepa.

Figura 6 - Explantes placentários a termo e susceptibilidade ao ZIKV.

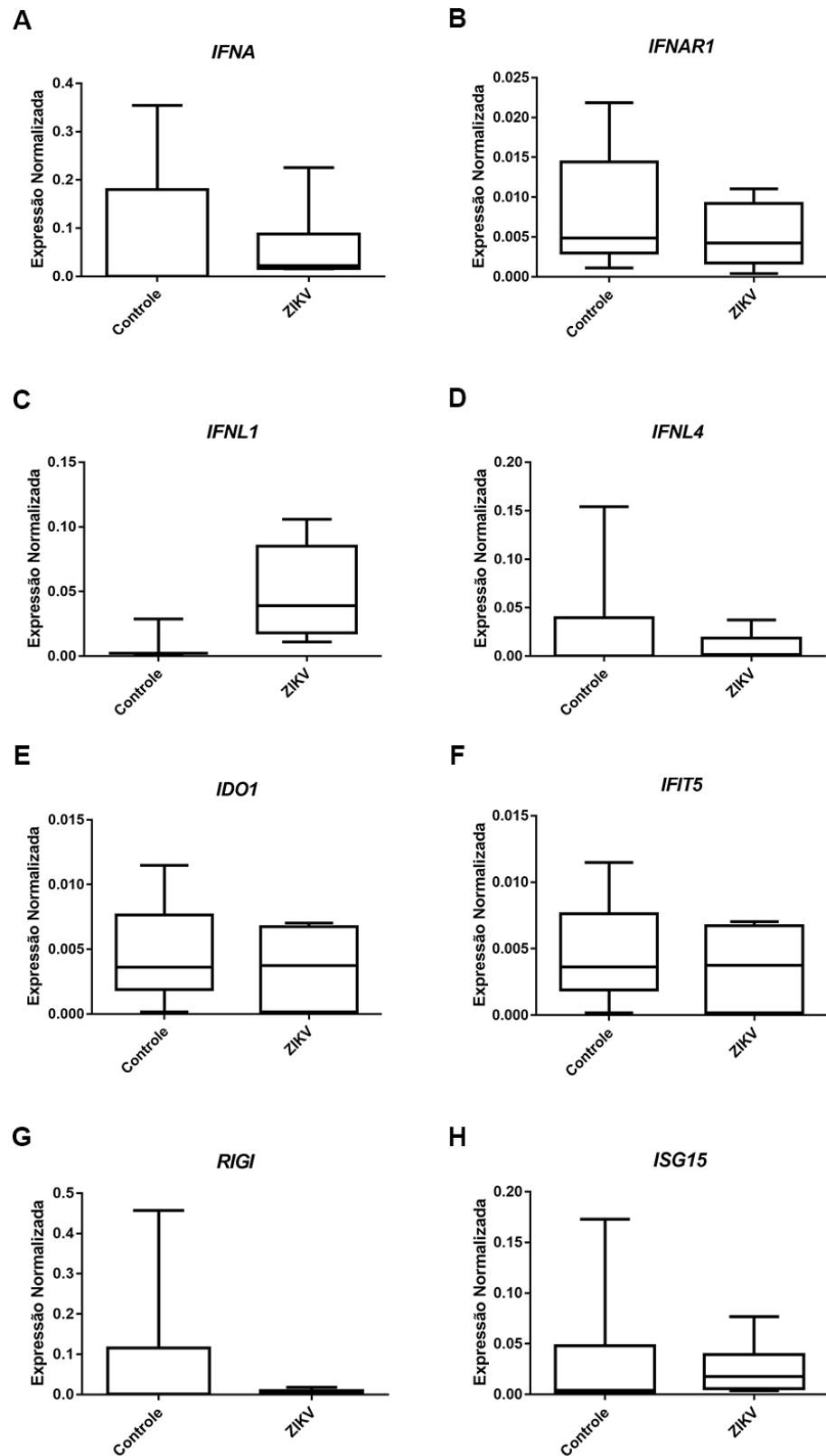


Legenda: A – Microscopia óptica de uma vilosidade coriônica em cultura (barra de escala representa 100 µm para ampliação de 200x); B – Análise quantitativa por RT-qPCR da carga viral do ZIKV no sobrenadante 24 hpi das cepas MR766 e PE243 em explantes placentários. $**p < 0,01$ em relação ao controle. $n = 4$, one-way ANOVA com pós-teste de Dunnett.

5.1.2 Expressão gênica e produção de citocinas relacionadas a resposta antiviral

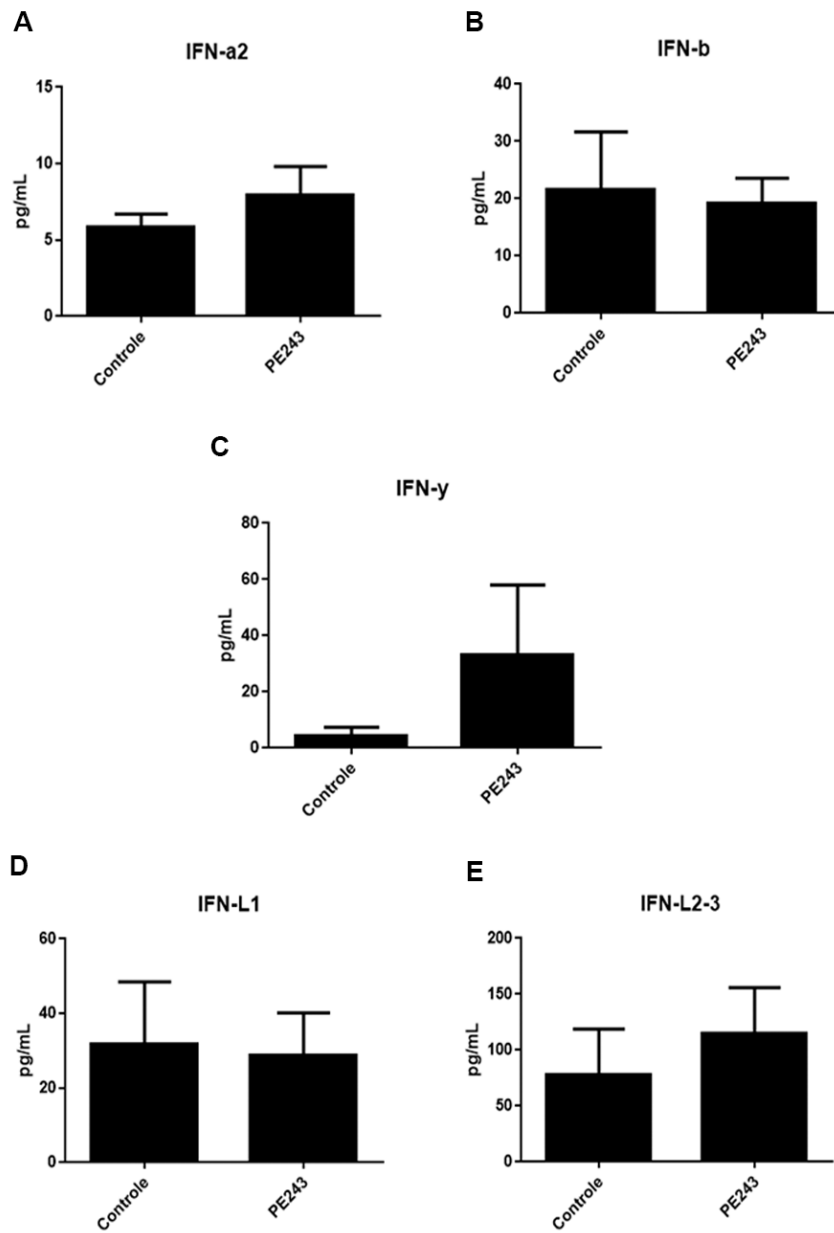
A expressão gênica de IFN- α , IFN- α R1, IFN- λ 1, IFN- λ 4, IDO1, IFIT5, RIG-I e ISG15 foi avaliada 24 hpi, por RT-qPCR em explantes placentários. Entre os genes analisados, nenhum deles apresentou diferenças significativas nos explantes infectados quando comparados com o controle (Fig. 7). Além disso, ao analisar por citometria de fluxo a produção de citocinas, não foram encontradas alterações na secreção de nenhum IFN frente a infecção de PE243 (Fig. 8), em contrapartida, foi possível observar um aumento significativo das citocinas inflamatórias IL-6 (52878 ± 22577 pg/mL; $p = 0,028$) e IL-8 (21839 ± 2314 pg/mL; $p = 0,025$) após a infecção viral em explantes placentários (Fig. 9).

Figura 7 - Expressão gênica relacionada a resposta antiviral de explantes de vilosidades coriônicas após infecção por PE243.



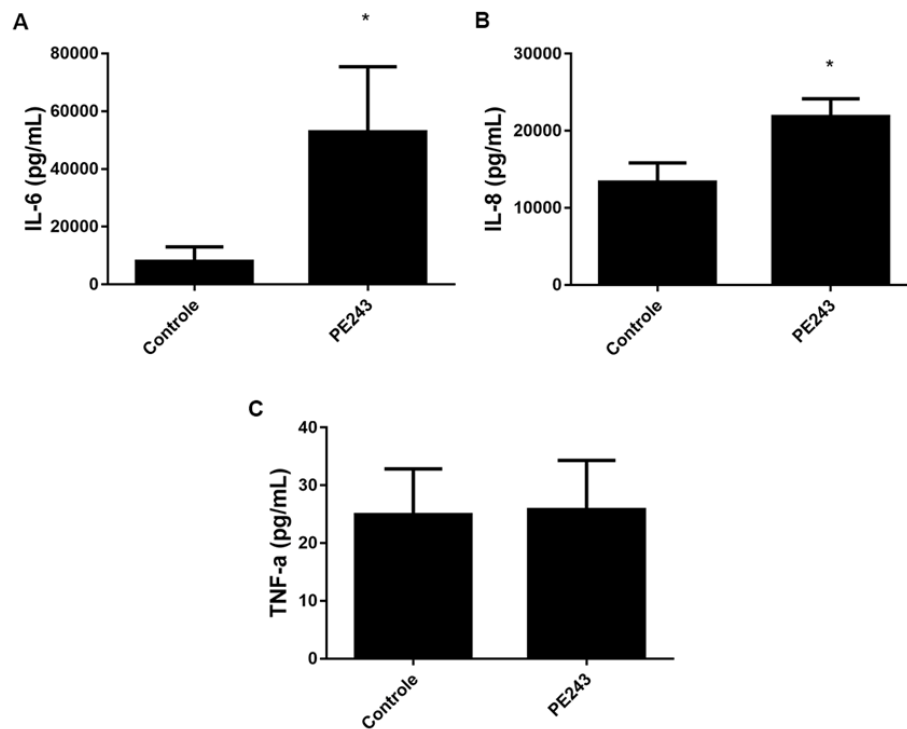
Legenda: Níveis relativos de mRNA de IFN- α (A), IFN- α R1 (B), IFN- λ 1 (C), IFN- λ 4 (D), IDO1 (E), IFIT5 (F), RIG-I (G) e ISG15 (H) em grupo controle não infectado e infectado com a cepa asiática do ZIKV. $n = 5$; $p < 0,05$, segundo análise do teste de Mann-Whitney.

Figura 8 - Avaliação da produção de interferons em explantes de vilosidades coriônicas após infecção por PE243.



Legenda: Quantificação por citometria de fluxo de IFN- α 2 (A), IFN- β (B), IFN- γ (C), IFN- λ 1 (D), IFN- λ 2/3 (E) em sobrenadantes coletados de explantes controle ou infectados 24 hpi. n = 8., Análise por teste de Mann-Whitney.

Figura 9 - Avaliação da produção de citocinas inflamatórias em explantes de vilosidades coriônicas após infecção por PE243.

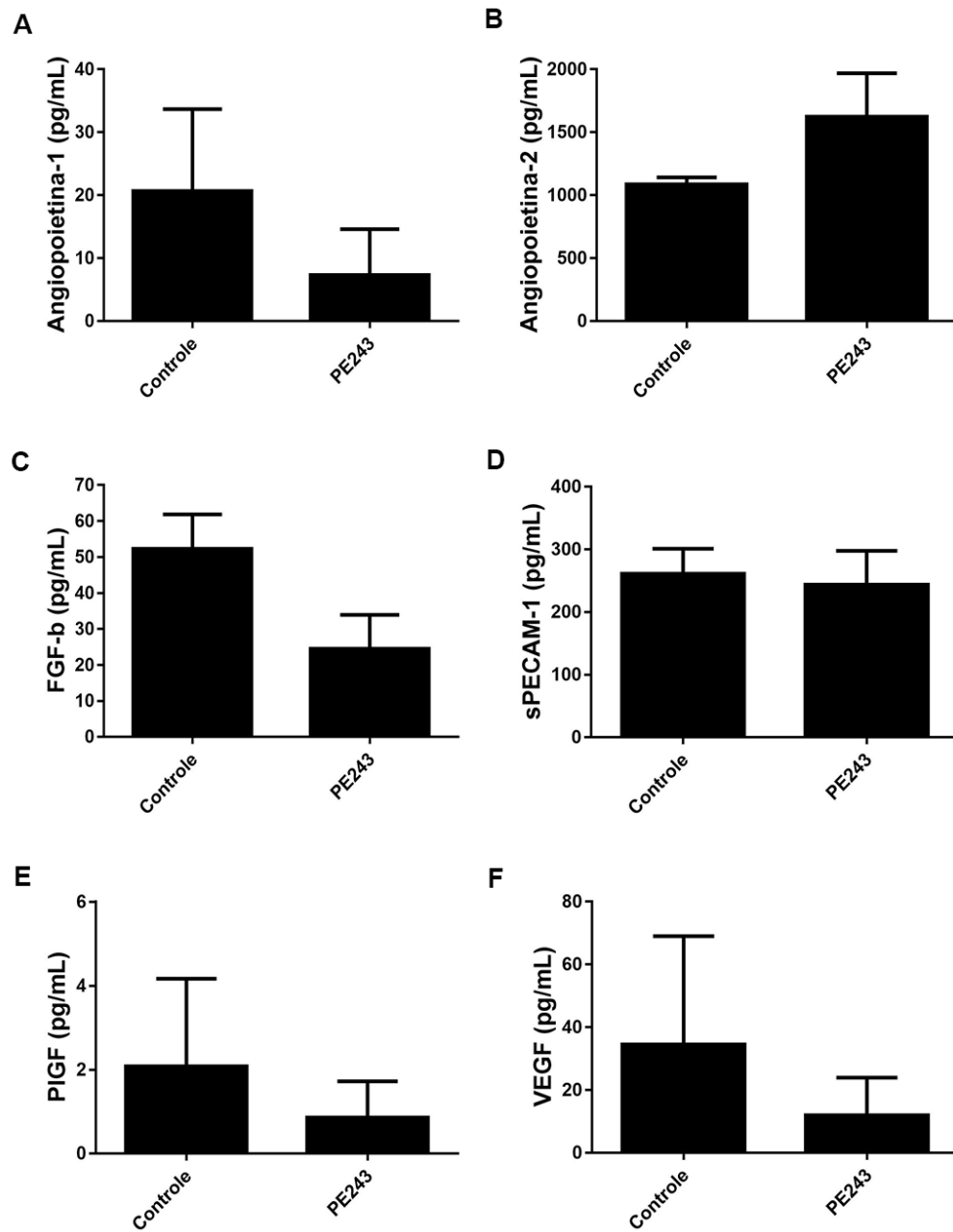


Legenda: Quantificação por citometria de fluxo de IL-6 (A), IL-8 (B) e TNF- α (C) em sobrenadantes coletados de explantes controle ou infectados 24 hpi. IL-1 β , IP-10, IL-12p70, GM-CSF e IL-10 não foram detectadas. n = 7; * p < 0,05, segundo análise do teste de Mann-Whitney.

5.1.3 Expressão de moléculas angiogênicas relacionadas

Para avaliar os efeitos da infecção do ZIKV na produção de moléculas vasoativas, considerando a característica de modulação vascular do modelo de explante de vilosidades coriônicas, quantificamos por citometria de fluxo a produção de angiopoietina-1, angiopoietina-2, FGF-b, sPECAM-1, PlGF e VEGF no sobrenadante de explantes. Os resultados obtidos não exibiram alterações significativas nos níveis de nenhuma das moléculas analisadas comparando o grupo controle e o grupo infectado com a cepa PE243 do ZIKV (Fig. 10).

Figura 10 - Avaliação da produção de moléculas angiogênicas em explantes de vilosidades coriônicas após infecção por PE243.



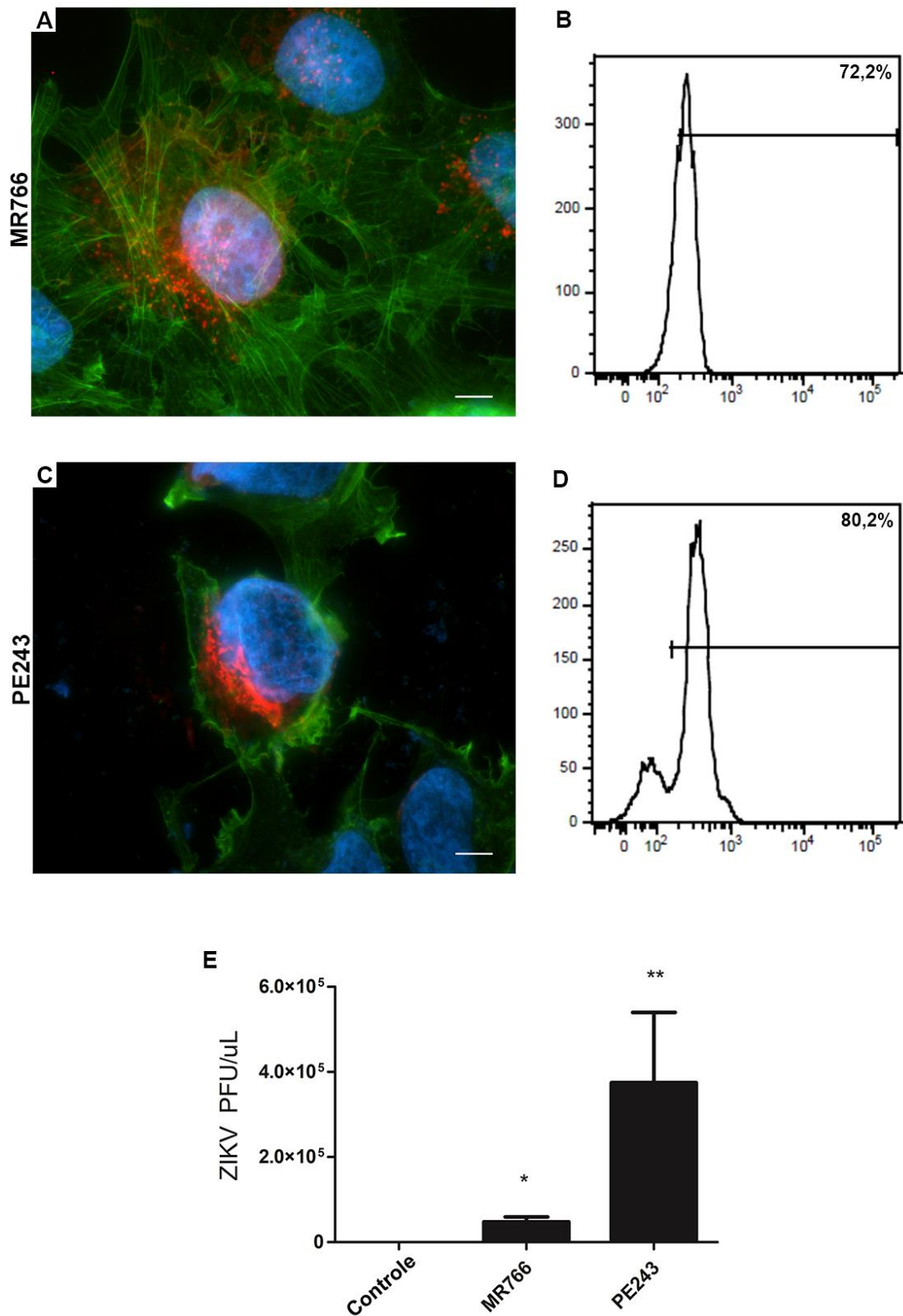
Legenda: Quantificação por citometria de fluxo de Angiopoietina-1 (A), Angiopoietina-2 (B), FGF-b (C), sPECAM-1 (D), PlGF (E) e VEGF (F) em sobrenadantes coletados de explantes controle ou infectados 24 hpi. n = 4; Teste de Mann-Whitney.

5.2 Linhagem celular HTR-8/SVneo

5.2.1 Susceptibilidade a Infecção pelo ZIKV

Avaliamos a infecção pelo ZIKV em células HTR-8/SVneo, linhagem de células trofoblásticas de primeiro trimestre de gestação, que se mostraram altamente susceptíveis a infecção e replicação viral de ambas as cepas do ZIKV. Por meio de imunofluorescência, conseguimos identificar a proteína NS1 do ZIKV, que se apresentou no citoplasma das células após 24 h de infecção. O citoesqueleto de actina se apresentou destruído após a infecção com a cepa asiática em muitas células, mas não pela cepa africana (Fig. 11A e 11C). Quantitativamente, em média $73,1\% \pm 18,73$ das células foram infectadas pela cepa MR766 e $84,4\% \pm 3,77$ foram infectadas pela cepa PE243 (Fig. 11B e 11D). A replicação viral também foi confirmada por RT-qPCR, apresentando uma carga viral de $0,48 \pm 0,11 \times 10^5$ ($p = 0,043$) para a cepa MR766 e de $3,75 \pm 1,65 \times 10^5$ para a cepa PE243 ($p = 0,0025$) após 24 h de infecção, em relação ao controle não infectado (Fig. 11E).

Figura 11 - Infecção da HTR-8/SVneo pelo ZIKV.

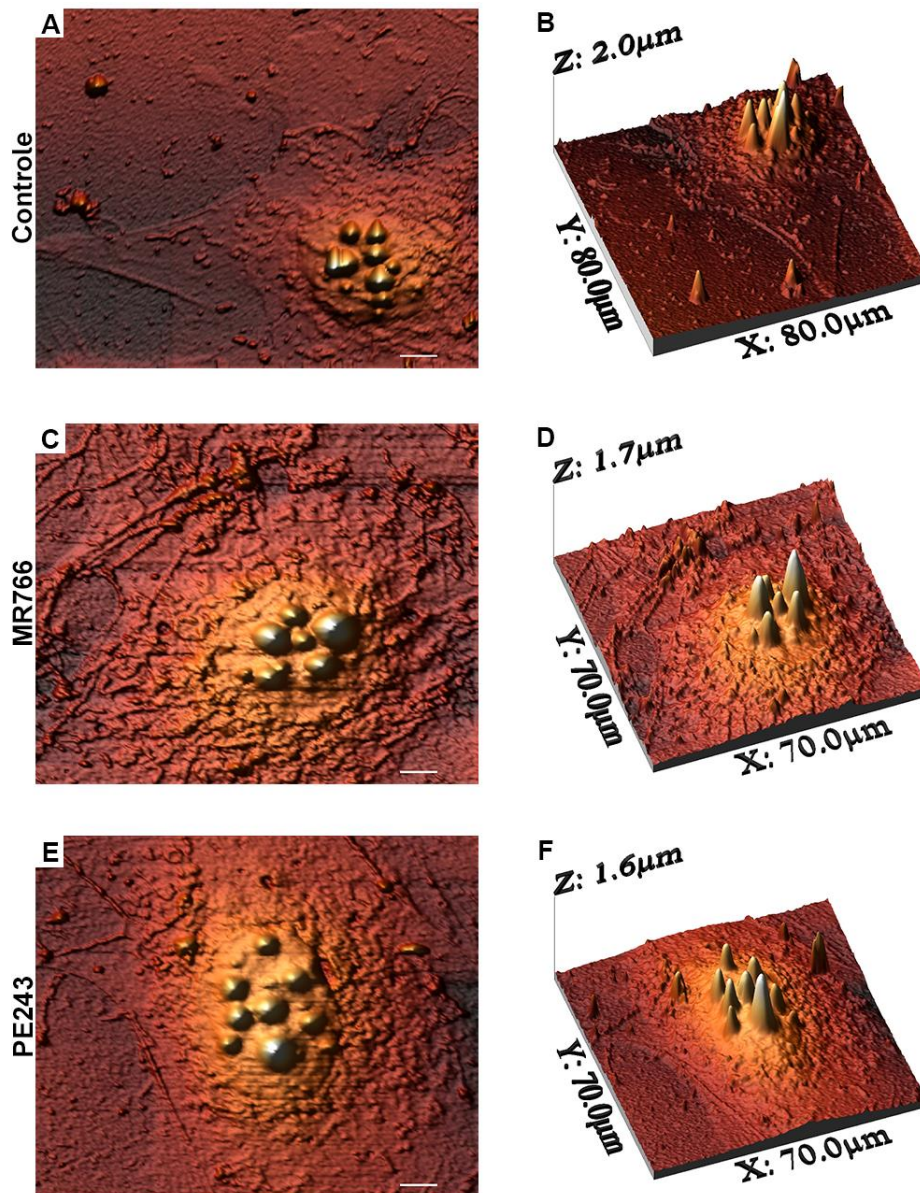


Legenda: A e C – Imunofluorescência em células infectadas por 24 h com as cepas MR766 e PE243, respectivamente (barras de escala representam 10 μm para ampliações de 1000x); B e D – Representação da quantificação por citometria de fluxo das células infectadas com as cepas MR766 e PE243; E - Análise por RT-qPCR da carga viral no sobrenadante das culturas de HTR-8/SVneo para confirmar replicação viral. Verde – Faloidina; Vermelho – proteína NS1 do ZIKV; Azul - DAPI. n = 7, one-way ANOVA com pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ em relação ao controle.

5.2.2 Efeitos da infecção por ZIKV na morfologia e topografia celular

Para verificar as possíveis alterações morfológicas ocasionadas nas células HTR-8/SVneo pela infecção por ZIKV, foi utilizada a Microscopia de Força Atômica, onde as análises demonstraram, em geral, células grandes com região nuclear volumosa (Fig. 12). A topografia tridimensional do grupo controle apresentou dimensões médias de 60 a 80 μm de diâmetro e altura de 2 μm (Fig. 12B), enquanto as células infectadas com ambas as cepas virais apresentaram diminuição da altura celular (MR766: 1,7 μm ; PE243: 1,6 μm), superfície rugosa, citoplasma com áreas descontínuas e protuberâncias membranares (Fig. 12D e 12F).

Figura 12 - Análise morfológica/topográfica das células HTR-8/SVneo por AFM.

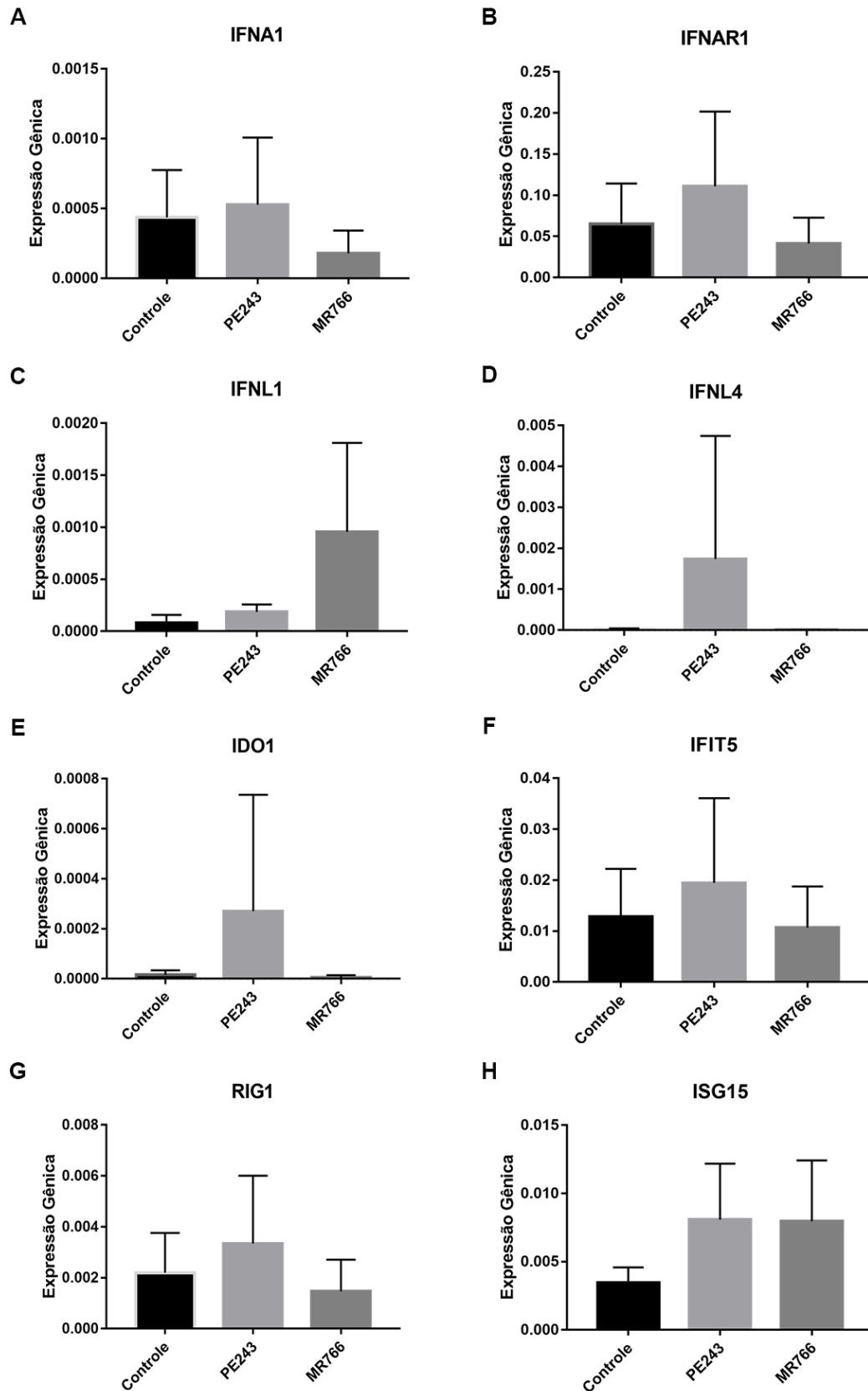


Legenda: A e B – Células controle; C e D – Células infectadas com a cepa MR766; E e F – Células infectadas com a cepa PE243. Microscópio de Força Atômica Multiview 4000™ (Nanonics, Israel), combinado com microscópio óptico (BXFM, Olympus, Japão). As barras de escala representam 10 μm para ampliações de 1000x. n = 3.

5.2.3 Expressão gênica e produção de citocinas relacionadas a resposta antiviral

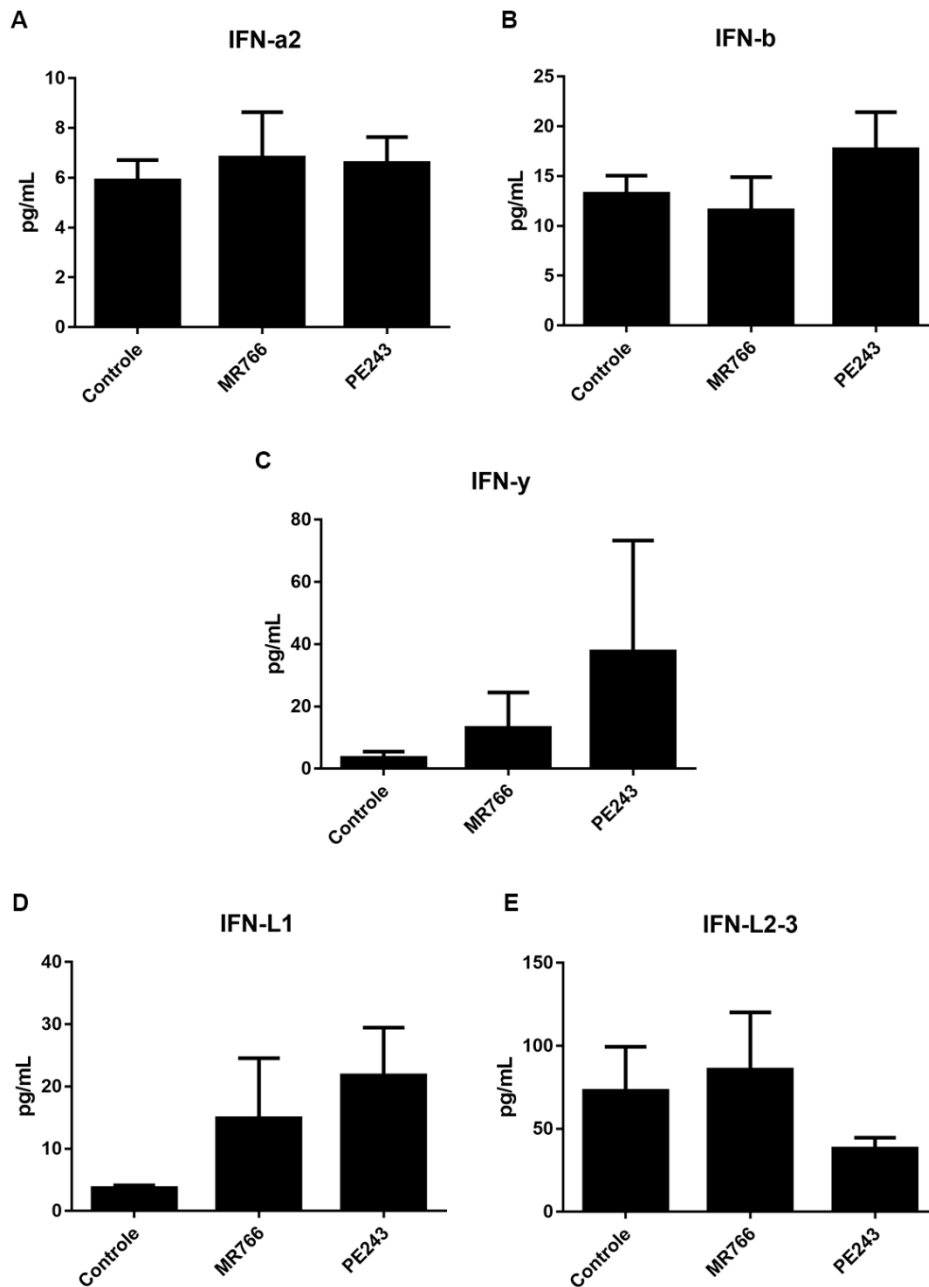
Considerando a elevada susceptibilidade das células trofoblásticas de primeiro trimestre ao ZIKV e as complicações graves associadas à infecção nesse período gestacional, nós também analisamos alguns fatores associados a resposta antiviral em células HTR-8/SVneo. Por meio de RT-qPCR, os genes IFN- α , IFN- α R1, IFN- λ 1, IFN- λ 4, IDO1, IFIT5, RIG-I e ISG15 foram analisados 24 horas pós-infecção, onde foi possível observar que não houve nenhuma alteração significativa na expressão gênica dos grupos infectados com ambas cepas virais, quando comparado com o controle (Fig. 13). O que se repetiu na análise por citometria de fluxo, onde a secreção de interferons nos sobrenadantes de células controle e infectadas, não apresentou mudanças (Fig. 14). A única diferença estatisticamente significativa encontrada foi na produção de TNF- α , que apresentou aumento ($26,76 \pm 7,2$ pg/mL; $p = 0,039$) após a infecção com a cepa africana MR766 (Fig. 15).

Figura 13 - Expressão gênica relacionada a resposta antiviral.



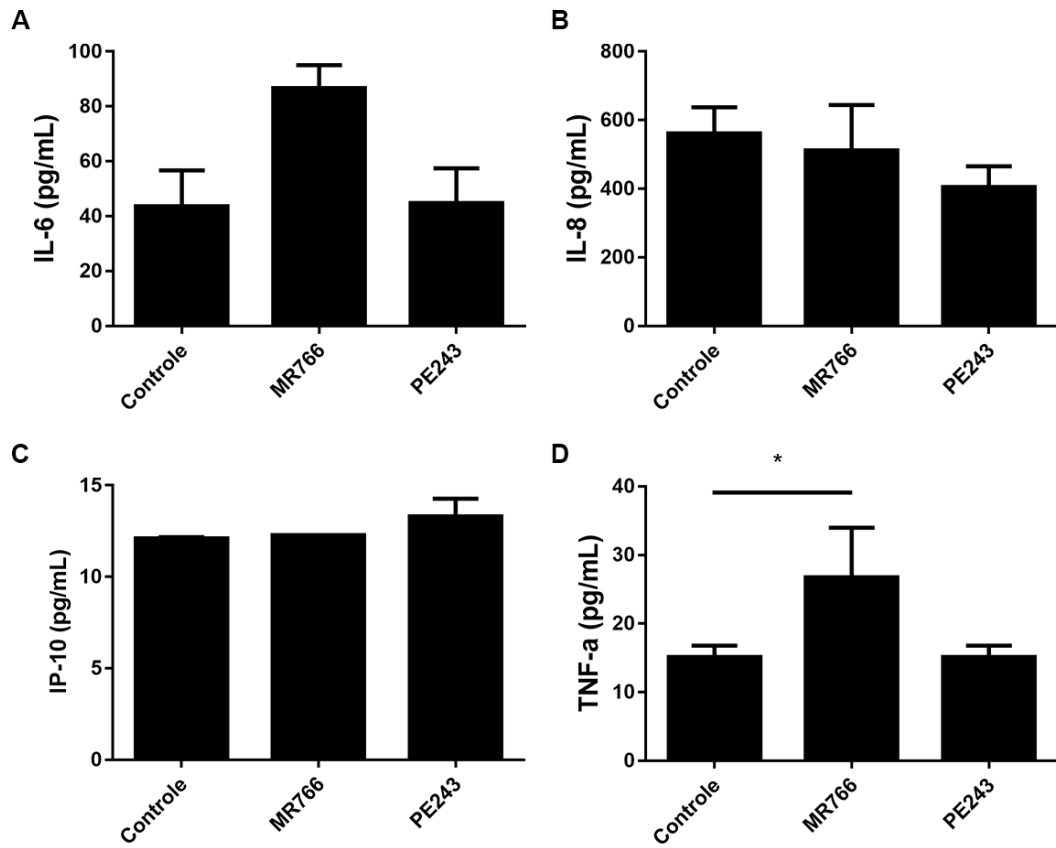
Legenda: Níveis relativos de mRNA de IFN- α (A), IFN- α 1 (B), IFN- λ 1 (C), IFN- λ 4 (D), IDO1 (E), IFIT5 (F), RIG-I (G) e ISG15 (H) em grupo controle não infectado e infectado com a cepa PE243 e MR766 do ZIKV. n = 3; Dados analisados por one-way ANOVA, seguido do pós-teste de Dunnett em relação ao controle.

Figura 14 - Análise da produção de interferons em células HTR-8/SVneo.



Legenda: Quantificação por citometria de fluxo de IFN- α 2 (A), IFN- β (B), IFN- γ (C), IFN- λ 1 (D), IFN- λ 2/3 (E) em sobrenadantes coletados de células HTR-8/SVneo controles ou infectadas 24hpi com as cepas virais MR766 e PE243. n = 5; Dados analisados por one-way ANOVA, seguido do pós-teste de Dunnett em relação ao controle.

Figura 15 - Avaliação da produção de citocinas inflamatórias em células HTR-8/SVneo.



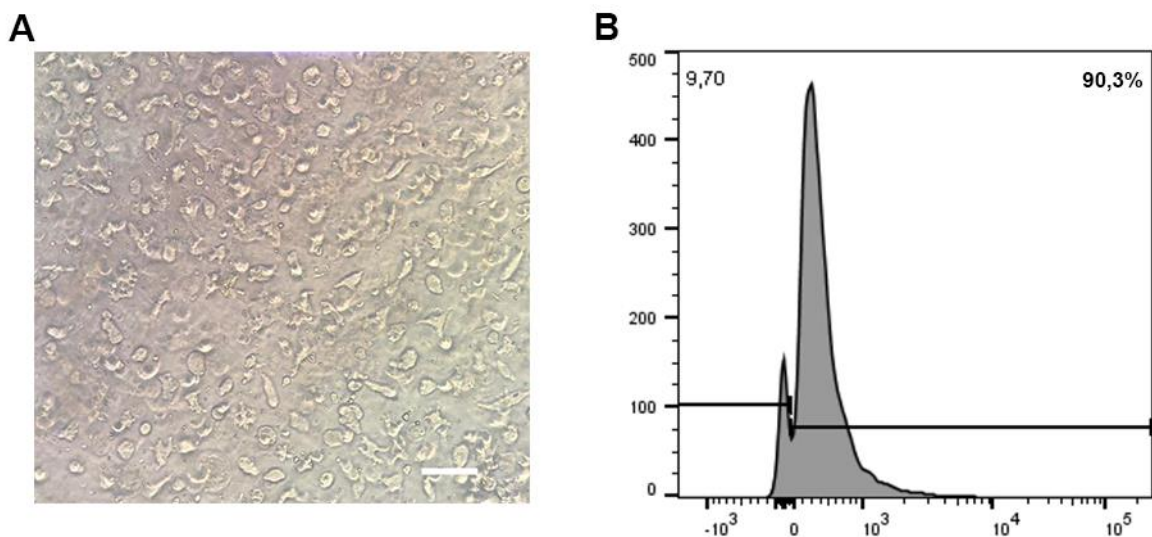
Legenda: Quantificação por citometria de fluxo de IL-6 (A), IL-8 (B), IP-10 (C), TNF- α (D) em sobrenadantes coletados de células HTR-8/SVneo controles ou infectadas 24 hpi com as cepas virais MR766 e PE243. IL-1 β , IL-12p70, GM-CSF e IL-10 não foram detectadas. * $p < 0,05$. $n = 8$; Dados analisados por one-way ANOVA, seguido do pós-teste de Dunnett em relação ao controle.

5.3 Células do Citotrofoblasto Extraviloso (CTEV)

5.3.1 Susceptibilidade a Infecção pelo ZIKV

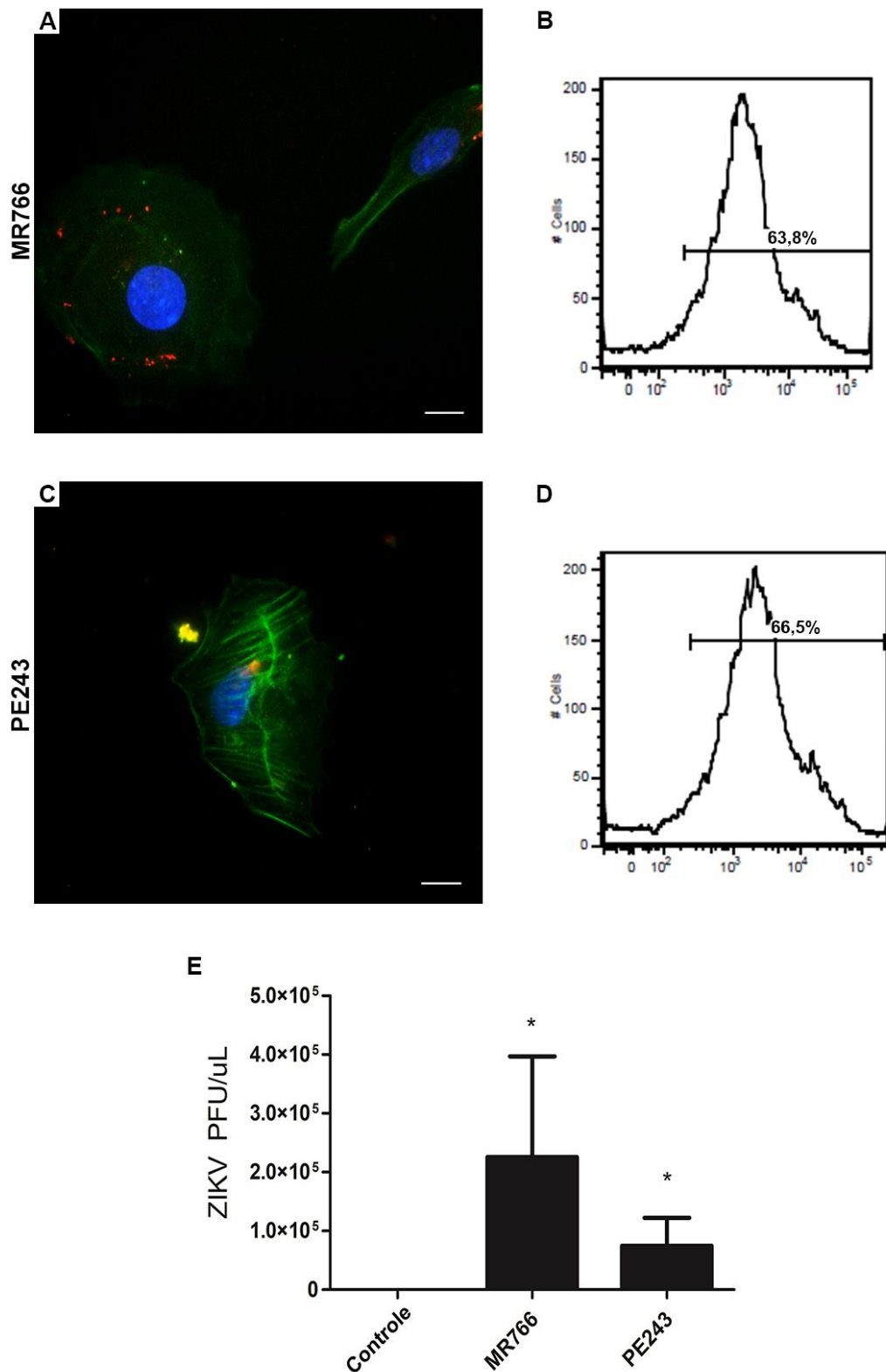
O isolamento de células do CTEV de placentas a termo foi realizado e as células mantidas em cultura (Fig. 16A) foram inicialmente testadas quanto a eficácia do isolamento por citometria de fluxo, que apresentou 75,25% de positividade das células para HLA-G ($\pm 6,2\%$), um marcador conhecido de CTEV, confirmando a pureza da técnica (Fig. 16B). Posteriormente, a capacidade do ZIKV de infectar e se replicar nesse tipo celular foi avaliada por imunofluorescência, citometria de fluxo e RT-qPCR, demonstrando pela primeira vez a susceptibilidade das células CTEV de placentas a termo a diferentes cepas do ZIKV. Enquanto a proteína NS1 do ZIKV foi imunolocalizada no citoplasma e na região perinuclear de células infectadas por 24 h, essas apresentaram uma maior preservação do citoesqueleto após a infecção com ambas as cepas (Fig. 17A e 17C), o que diferiu nas células HTR-8SV/neo. Também foi possível observar que em média 56,3% ($\pm 10,7$) das células foram infectadas pela cepa MR766 e 58,2% ($\pm 4,53$) foram infectadas pela cepa PE243 (Fig. 17B e 17D). A replicação viral em células CTEV também foi confirmada em ambas as cepas por RT-qPCR, sendo de $2,26 \pm 1,71 \times 10^5$ ($p = 0,022$) para a cepa MR766 e de $0,75 \pm 0,38 \times 10^5$ ($p = 0,045$) para a cepa PE243 em relação ao controle não infectado (Fig. 17E).

Figura 16 - Isolamento de Células do CTEV.



Legenda: A – Células CTEV em cultura na hora 0, logo após o plaqueamento (barra de escala representa 100 μm para ampliação de 200x); B – Análise por citometria de fluxo da pureza celular pela expressão de HLA-G1. n = 5.

Figura 17 - Infecção do CTEV pelo ZIKV.

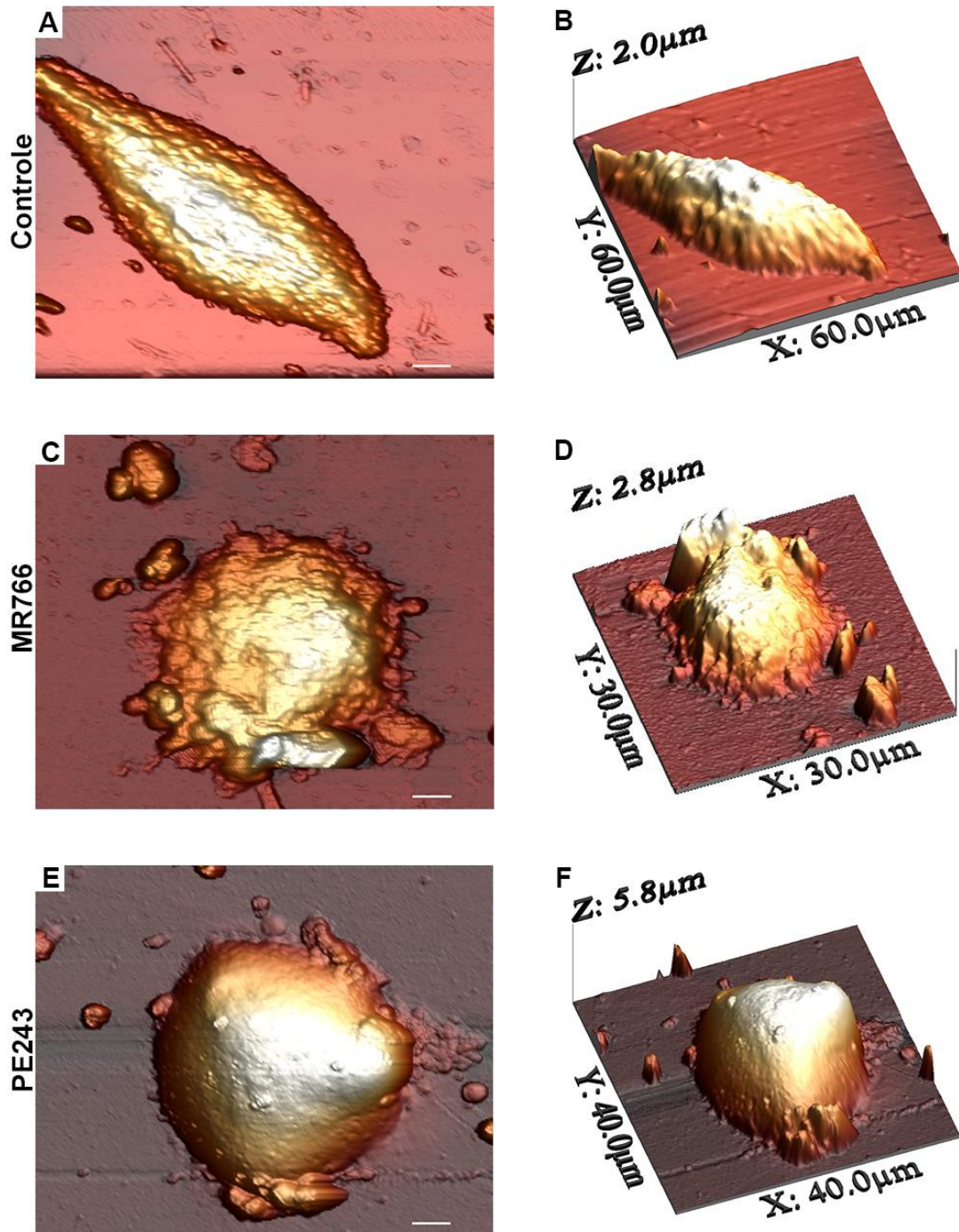


Legenda: A e C – Imunofluorescência em células CTEV infectadas por 24h com as cepas MR766 e PE243, respectivamente (barras de escala representam 10 μ m para ampliações de 1000x); B e D – Representação da quantificação por citometria de fluxo das células CTEV infectadas com as cepas MR766 e PE243; E - Análise por RT-qPCR da carga viral no sobrenadante das culturas de CTEV para confirmar replicação viral. Verde – Faloidina; Vermelho – proteína NS1 do ZIKV; Azul - DAP-I. n = 3, * $p < 0,05$, por one-way ANOVA, seguido do pós-teste de Dunnett em relação ao controle.

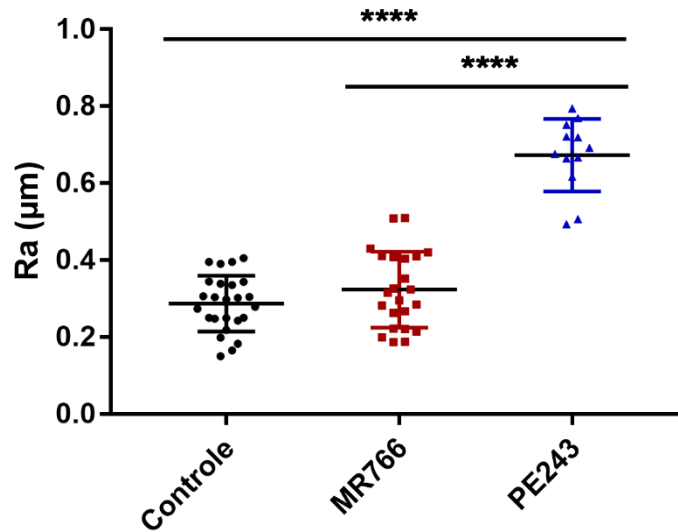
5.3.2 Efeitos da infecção por ZIKV na morfologia e topografia celular

As análises morfológicas e topográficas do CTEV por AFM exibiram células controles grandes, com uma superfície celular lisa e citoplasma sem deformações (Fig. 18A), com dimensões em média de 70 μm (Fig. 18B). Após a infecção com a cepa MR766, as células CTEV apresentaram consideráveis diferenças morfológicas, apresentando aspecto rugoso, região nuclear deformada e citoplasma em retração, características de um processo de deterioração celular (Fig. 18C), além disso, suas medidas topográficas demonstraram um perfil menor, com dimensões em média de 30 μm (Fig. 18D). Já as células infectadas com a cepa PE243 apresentaram regiões de elevada rugosidade e grandes protusões de membrana (Fig. 18E), menor diâmetro comparado as células controle (em média 40 μm), porém, foram as células de maior altura da região nuclear entre os grupos analisados (Fig. 18F). Além disso, a rugosidade média das células também se mostrou aumentada no grupo infectado pela cepa PE243 ($p < 0,0001$) (Fig. 19).

Figura 18 - Análise morfológica/topográfica das células CTEV por AFM.



Legenda: A e B – Células controle; C e D – Células infectadas com a cepa MR766; E e F – Células infectadas com a cepa PE243. Microscópio de Força Atômica Multiview 4000™ (Nanonics, Israel), combinado com microscópio óptico (BXFM, Olympus, Japão). As barras de escala representam 10 μm para ampliações de 1000x. n = 3.

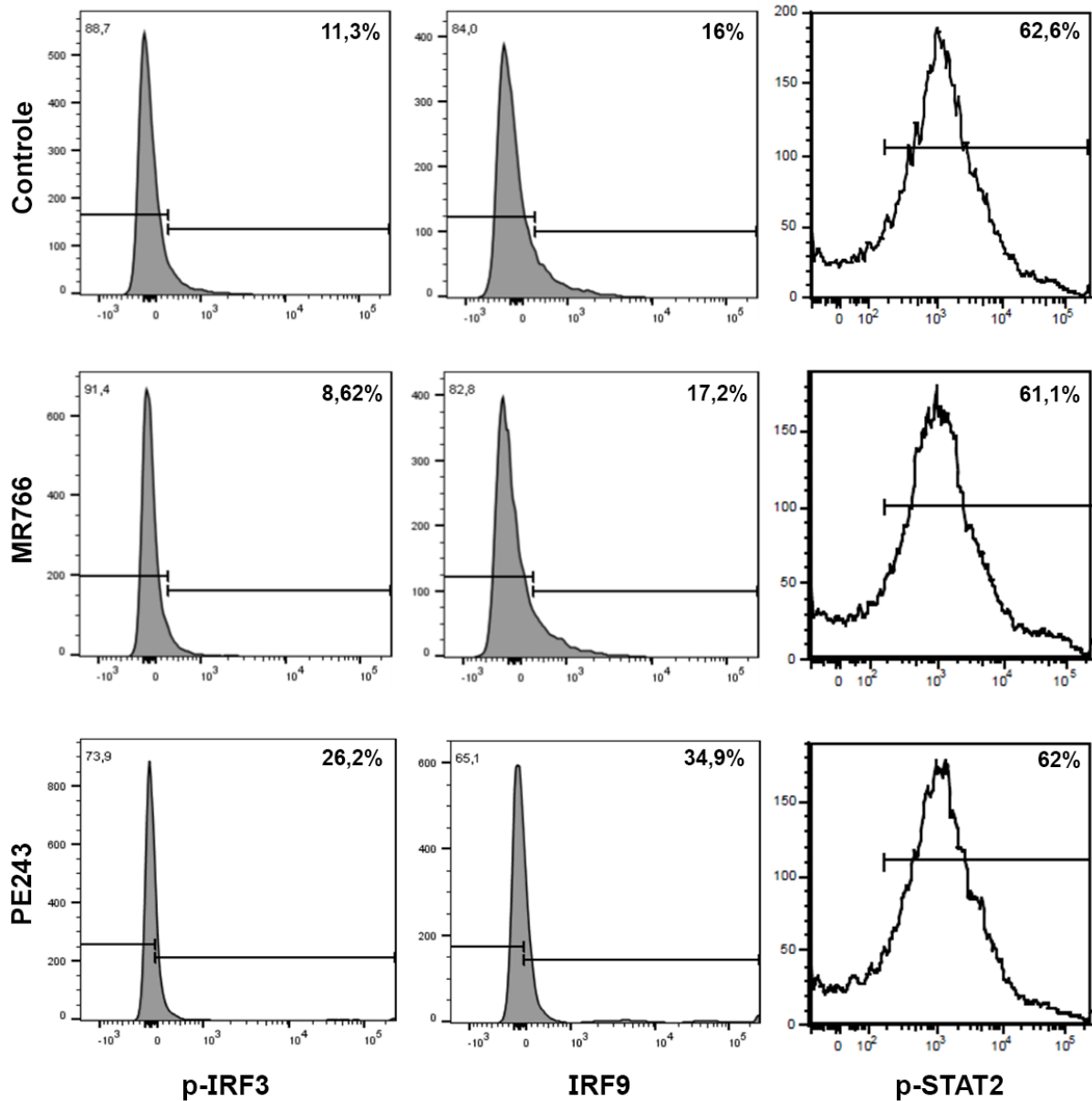
Figura 19 - Rugosidade média das células CTEV.

Legenda: Gráfico da distribuição da rugosidade média (Ra) entre os grupos das células CTEV controle; infectadas com a cepa MR766; e infectadas com a cepa PE243. $p < 0,0001$; $n = 30$ células de 3 pacientes para cada grupo.

5.3.3 Efeitos da infecção pelo ZIKV na sinalização e resposta antiviral

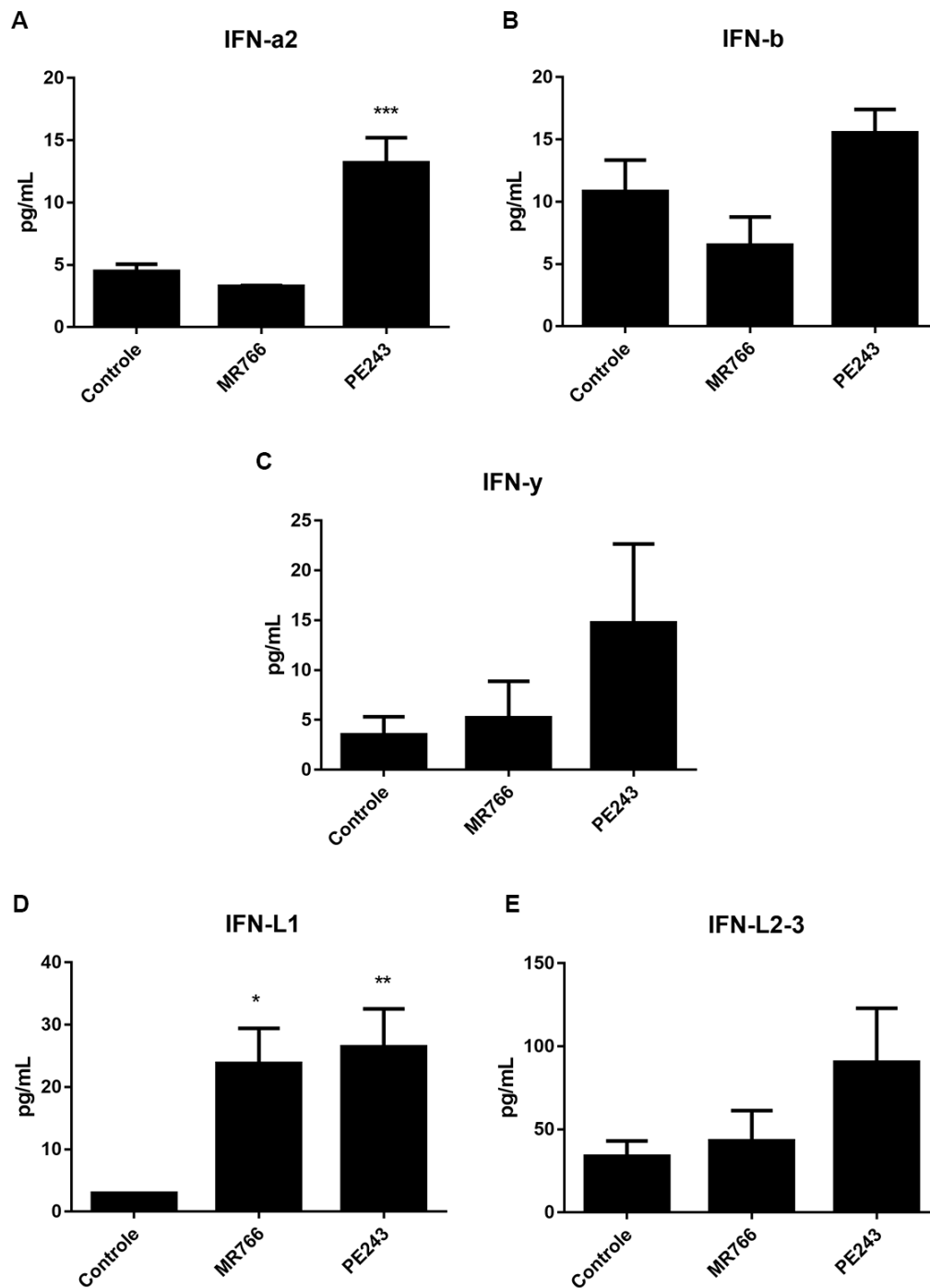
Considerando os mecanismos de evasão imune do ZIKV, analisamos a sinalização de p-IRF3, IRF9 e p-STAT2 em células CTEV não infectadas e infectadas com ambas as cepas virais por citometria de fluxo. A análise dessas vias mostrou um expressivo aumento dos níveis relativos de IRF3 fosforilada em células infectadas com a cepa PE243, quando comparado ao controle (11,3% no grupo controle para 26,2% no grupo infectado), assim como de IRF9 (16% no grupo controle para 34,9% no grupo infectado). Enquanto a infecção pela cepa MR766 não apresentou ativação dessas vias. Curiosamente, não houve alteração na sinalização de p-STAT2 em nenhuma cepa viral quando comparado ao controle (Fig. 20). Com relação a produção de interferons e citocinas envolvidas na inflamação por células CTEV, observamos secreção aumentada de IFN- α 2 ($13,18 \pm 2,02$ pg/mL; $p = 0,0003$), IFN- λ 1 ($26,4 \pm 6,13$ pg/mL; $p = 0,0016$) e IL-6 ($2752 \pm 623,4$ pg/mL; $p = 0,007$) na infecção por PE243, enquanto só houve aumento de IFN- λ 1 ($23,75 \pm 5,67$ pg/mL; $p = 0,013$) na infecção por MR766. Em contrapartida, IFN- β , IFN- γ , IFN- λ 2/3, IL-8, GM-CSF e IL-10 não apresentaram mudanças significativas entre o grupo controle e infectados por ambas as cepas virais (Fig. 21 e Fig. 22).

Figura 20 - Avaliação das vias de sinalização envolvidas na resposta antiviral em células CTEV.



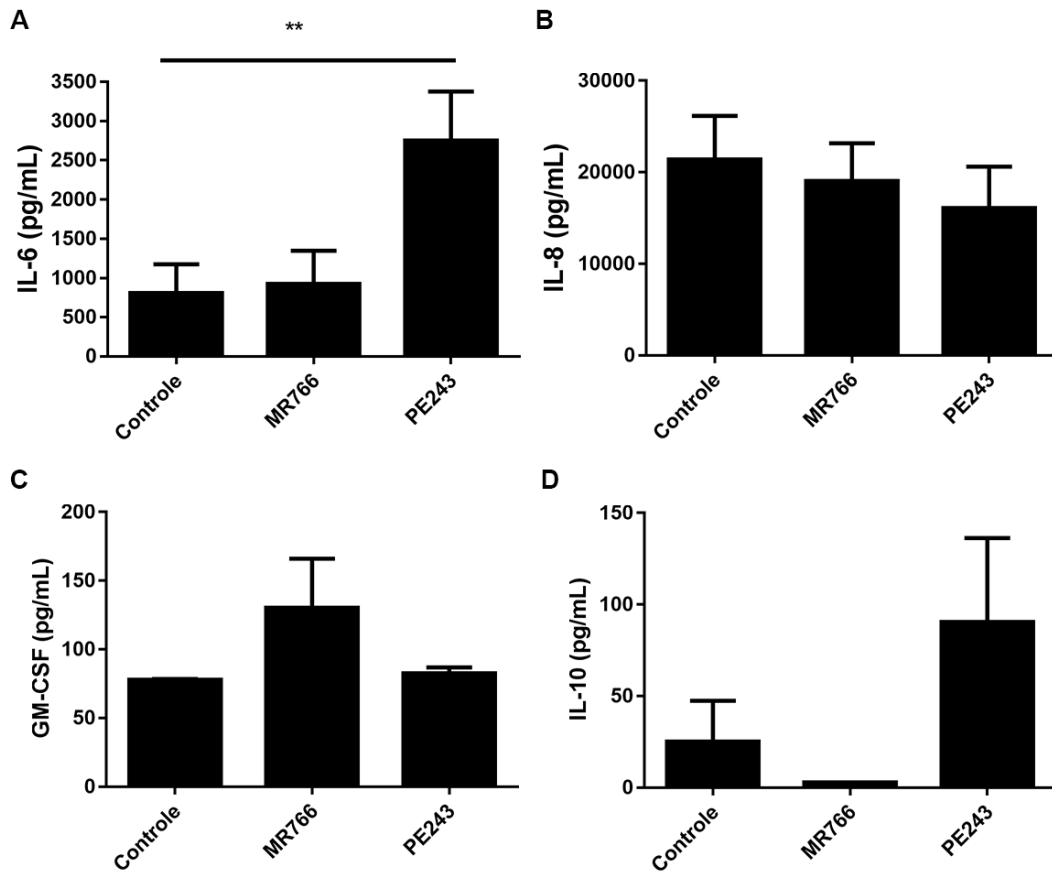
Legenda: Citometria de fluxo para p-IRF3 (primeira coluna), IRF9 (segunda coluna) e p-STAT2 (terceira coluna) em células controle (primeira linha), células infectadas com MR766 (segunda linha) e células infectadas com PE243 (terceira linha). n = 3.

Figura 21 - Avaliação da produção de interferons em células CTEV.



Legenda: Quantificação por citometria de fluxo de IFN- α 2 (A), IFN- β (B), IFN- γ (C), IFN- λ 1 (D), IFN- λ 2/3 (E) em sobrenadantes coletados de células CTEV controles ou infectadas 24hpi com as cepas virais MR766 e PE243. n = 4; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,0005, segundo análise por one-way ANOVA, seguido do pós-teste de Dunnett em relação ao controle.

Figura 22 - Avaliação da produção de citocinas inflamatórias em células CTEV.



Legenda: Quantificação por citometria de fluxo de IL-6 (A), IL-8 (B), GM-CSF (C), IL-10 (D) em sobrenadantes coletados de células CTEV controles ou infectadas 24hpi com as cepas virais MR766 e PE243 IL-1 β , IL-12p70, TNF- α e IP-10 não foram detectadas. ** $p < 0,01$. $n = 4$; Dados analisados por one-way ANOVA, seguido do pós-teste de Dunnett em relação ao controle.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, analisamos aspectos morfológicos, imunológicos e moleculares associados à infecção placentária por duas cepas virais do ZIKV em diferentes modelos experimentais. A cepa asiática (PE243) mostrou-se capaz de infectar e se replicar eficientemente em todos os modelos estudados; enquanto a cepa africana (MR766) infectou as células HTR-8/SVneo e as células CTEV de termo, mas não foi capaz de infectar significativamente os explantes placentários a termo.

Nossos resultados também mostraram um aumento da secreção de IL-6 e IL-8 em explantes placentários após a infecção com a cepa asiática, mas nenhuma alteração na secreção de IFN ou de moléculas angiogênicas. Nas células HTR-8/SVneo, a infecção pelo ZIKV ocasionou alterações morfológicas e topográficas, mas não provocou mudanças na expressão gênica e na secreção de IFNs, apresentando apenas um aumento na secreção de TNF- α após a infecção com a cepa africana.

Enquanto as células CTEV, apresentaram um aumento expressivo da secreção de IFN- α 2 e IL-6, frente a infecção com PE243, e também de IFN- λ 1, após infecção com ambas as cepas, assim como consideráveis alterações morfológicas. Já a sinalização de algumas moléculas analisadas nas células CTEV foram diferentes apenas na infecção por PE243, que aumentou a expressão de p-IRF3 e IRF9 (Fig. 23). Assim, nossos resultados mostraram um interessante padrão diferencial na resposta antiviral entre diferentes modelos experimentais e cepas virais.

O desenvolvimento e estudo de diferentes modelos de pesquisa são essenciais para um melhor entendimento da fisiopatologia do ZIKV e para tradução dos resultados da pesquisa básica para a clínica. Apesar da sua contribuição para aquisição de novos *insights* sobre a infecção, o modelo animal apresenta diversas limitações como as diferenças anatômicas com a placenta humana e a incapacidade do ZIKV de degradar STAT2 murino, em contraste com o que acontece em humanos. Portanto, a infecção e a viremia não são sustentadas, necessitando de modelos murinos deficientes na sinalização de IFN tipo I para que ocorra a infecção. Por outro lado, o estudo de modelos *in vitro*, bidimensionais, como células primárias e linhagens celulares ou tridimensionais, como explante do tecido, são consideradas ferramentas importantes e econômicas na investigação da patogênese do ZIKV (PENA et al., 2018; ALVES et al., 2018).

O modelo de explantes placentários permite mimetizar a arquitetura do tecido e características morfológicas e funcionais da barreira placentária (MILLER et al., 2005), composta por vilosidades coriônicas, que conseguem prevenir potencialmente as respostas inflamatórias e a passagem de patógenos para o compartimento fetal, sendo conhecidos poucos vírus que possuem a capacidade de causar infecção congênita, devido a adaptações moleculares que possibilitam sua passagem para o feto (BENIRSCHKE; BURTON; BAERGEN, 2012; PETITT et al., 2017).

Estudos da infecção por ZIKV *ex vivo* mostraram que explantes de vilosidades coriônicas de placentas de primeiro trimestre foram suscetíveis à infecção tanto pela cepa africana como pela asiática (TABATA et al., 2016; WEISBLUM et al., 2017). Já as placentas a termo exibiram maior resistência à infecção quando comparadas ao primeiro trimestre, possivelmente devido a produção de IFN tipo III, especialmente IFN- λ 1, pelo sinciotrofoblasto (BAYER et al., 2016). No entanto, nossos resultados mostraram que explantes de vilosidades coriônicas a termo não foram infectadas pela cepa africana do ZIKV, mas foram suscetíveis à cepa asiática.

Corroborando com esse dado, diversos estudos já relataram que diferentes cepas asiáticas do ZIKV conseguem infectar e se replicar eficientemente em placentas de segundo e terceiro trimestre de gestação (JURADO et al., 2016; PLATT et al. 2018; HERMANNNS et al., 2018; RIBEIRO et al., 2018), apresentando a capacidade de contornar as defesas placentárias, atravessar a barreira materno-fetal e provocar anormalidades congênitas (FRANÇA et al., 2016). Além disso, a infecção pelo ZIKV ocorreu mesmo com a expressão existente de IFN-III nos explantes controles e, após a infecção, não houve aumento dessa expressão, mostrando que o ZIKV provavelmente bloqueia as vias de sinalização envolvidas na produção de IFN, em consonância com outros estudos que justificam essa capacidade supressora por meio da proteína NS5 viral e da degradação de STAT2 (KUMAR et al., 2016; CHAUDHARY et al., 2017)

Os meios conhecidos pelos quais os vírus podem atravessar a barreira hematoplacentária incluem: a transcitose mediada por FcRn, originalmente usada para transferência de anticorpos maternos para a circulação fetal, um mecanismo do qual os patógenos se aproveitam para atravessar barreiras, como acontece com o vírus da hepatite B (BHAT; ANDERSON, 2007; LEÓN-JUÁREZ et al., 2017; CHIU et al., 2020); rompimento da integridade da barreira através do dano sincicial inflamatório, como acontece na infecção com o vírus da rubéola, citomegalovírus e vírus da encefalite japonesa (COYNE; LAZEAR, 2016; AL-OBAIDI et al.,

2017; MITTAL et al., 2017; ARORA et al., 2017); infecção via células imunes; e mecanismos para bloquear a produção trofoblástica de IFN- λ 1 (OLAGNIER et al., 2016).

Além da barreira hematoplacentária, as células CTEV também são consideradas um caminho possível para infecção da placenta e passagem para circulação fetal, considerando que são direcionados por vários patógenos para facilitar a transmissão vertical, como o Citomegalovírus, *Toxoplasma gondii* e infecções bacterianas (ROBBINS et al., 2012; DELORME-AXFORD; SADOVSKY; COYNE, 2014; ARORA et al., 2017). No presente trabalho evidenciamos que as cepas africana e asiática do ZIKV infectam e se replicam eficientemente na linhagem celular HTR-8/SVneo, algo que já foi mostrado em estudos anteriores (BAYER et al., 2016; MUTHURAJ et al., 2020). No entanto, de forma inédita, nossos resultados mostraram infecção e replicação eficiente do ZIKV em um modelo de células CTEV isoladas de placenta a termo, embora aparentemente se apresentem menos suscetíveis do que as células HTR-8/SVneo de primeiro trimestre, o que sugere a presença de mecanismos de resistência no final da gestação que estão ausentes no início.

Também vale ressaltar a diferença entre as cepas virais quanto ao fenótipo celular infeccioso, que apresentou maior destruição estrutural na infecção com a cepa asiática do que com a cepa africana, refletindo a maior taxa de infecção e replicação dessa cepa, e que possivelmente está associada a maior capacidade de transmissão e efeitos deletérios gestacionais. Interessante também observar como a análise por AFM demonstrou morfologicamente alterações de morte celular com grande precisão, como já demonstrado em outros estudos (MOLONEY; MCDONNELL; O'SHEA, 2004; FANTNER et al., 2010; TIWARI et al., 2014; BOTELHO et al., 2019).

No entanto, a literatura diverge quanto a virulência das linhagens virais. Alguns estudos demonstram uma maior capacidade destrutiva e lítica da cepa africana em células trofoblásticas, quando comparada com a cepa asiática (SHERIDAN et al., 2018), assim como patologia clínica mais grave e letalidade maior em modelo animal (SMITH et al., 2018), enquanto outros relatam que tanto a cepa asiática quanto a cepa africana têm virulência semelhante ou associam os defeitos congênitos da infecção pela cepa asiática a uma maior virulência (LAZEAR et al., 2016; JUN et al., 2017). A inconsistência entre os estudos pode estar relacionada às diferenças inerentes dentro de linhagens específicas ou modelos experimentais, mas de toda forma, são necessários maiores estudos para investigar o potencial virulento das cepas virais.

Para uma análise mais sensível e minuciosa do efeito citopático do ZIKV nas células trofoblásticas, utilizamos o AFM, que consiste em um método que oferece a análise de amostras em meio líquido ou ar através da varredura de sua superfície, por meio de estruturas mecânicas que favorecem percepção máxima da amostra, fornecendo imagens topográficas com resolução a nível atômico (MCELFRESH et al., 2002; ALLISON et al., 2010).

Corroborando com nossas análises por AFM que evidenciaram consideráveis alterações morfológicas e topográficas após a infecção com ambas as cepas do ZIKV, estudos que utilizam essa técnica em células infectadas por outros vírus, demonstraram perfis de alterações como deformação citoplasmática, depressões na região nuclear das células, mudanças na altura e comprimento das células, superfície rugosa e surgimento de protuberâncias membranares, podendo estar correlacionados com fábricas virais e morte celular (LEE; NG, 2004; MOLONEY; MCDONNELL; O'SHEA, 2004; TIWARI et al., 2014). Ademais, a microscopia de força atômica nos permite investigar a rugosidade da membrana em grande detalhe. Esse dado é importante, pois traz informações sobre diversos mecanismos como motilidade, adesão, contato intracelular, além de ser um indicador do estado da célula, bem como de modificações morfológicas e funcionais (ANTONIO et al., 2012).

Além dos efeitos deletérios da infecção direta, a resposta imunológica pode desempenhar um papel crucial na patogênese do ZIKV (WEISBLUM et al., 2017). Em outros modelos experimentais, a infecção pelo ZIKV foi associada ao aumento da expressão de sensores imunes inatos e ISGs (HAMEL et al., 2015). Em nosso estudo analisamos a resposta imunológica placentária através da expressão de diferentes IFN e citocinas nos diferentes modelos experimentais. Os IFN são uma parte crucial da capacidade do hospedeiro de responder eficientemente a infecções virais, mas o ZIKV já mostrou capacidade de suprimir essa resposta em diversos tipos celulares, como em células A549 de carcinoma pulmonar, células Vero (epitelial de rim de macaco verde africano), em fibroblastos humanos primários e na linhagem celular trofoblástica JEG-3 (GRANT et al., 2016; KUMAR et al., 2016; CHAUDHARY et al., 2017; PARDY; VALBON; RICHER, 2019).

Nossos resultados mostraram que não houve expressão gênica diferencial de IFNA, IFNAR1, IFNL1, IFNL4, IDO1, IFIT5, RIG1 e ISG15, assim como da produção das citocinas IFN- α 2, IFN- β , IFN- γ , IFN- λ 1 e IFN- λ 2-3 entre o grupo controle e infectado com ZIKV tanto em explantes placentários quanto na linhagem celular HTR-8/SVneo. Consistente com esse dado, Bowen e colaboradores (2017) relataram que o ZIKV antagonizou a tradução de genes IFN durante a infecção em células dendríticas humanas, resultando em secreção mínima de IFN

tipo I e III. E em outro modelo celular, a infecção com ZIKV bloqueou a indução de IFN tipo I e inibiu a sinalização do receptor de IFN tipo I (IFNAR) (HERTZOG et al., 2018).

O IFN tipo III está associado a proteção da placenta humana da infecção pelo ZIKV por meio de sua liberação constitutiva em células trofoblásticas humanas a termo, principalmente pelo sinciciotrofoblasto (BAYER et al., 2016). No entanto, o nosso modelo composto por vilosidades coriônicas a termo foi susceptível a infecção e conseqüentemente apesar de ter apresentado expressão constitutiva de IFN tipo III, não apresentou aumento após a infecção com o ZIKV. Em outro estudo, com explantes placentários humanos a termo, que também foram susceptíveis ao ZIKV, foi mostrado um leve aumento na expressão de IFN- λ 1 e IFN- λ 4 após 24 e 72 horas da infecção com uma cepa brasileira do ZIKV (RIBEIRO et al., 2018), distinta da cepa utilizada no presente estudo e em um tempo de incubação viral menor do que o tempo utilizado nesse estudo, o que poderia explicar o bloqueio mais robusto na expressão de IFN- λ visto em nossos resultados.

Em contraste com o sinciciotrofoblasto, células citotrofoblásticas, isoladas de tecido viloso, suportam a replicação viral e não produzem secreção detectável de IFN tipo III durante a infecção por ZIKV (QUICKE et al., 2016; TABATA et al., 2016), consistente com nossos resultados nas células HTR-8/SVneo, provavelmente por conta do bloqueio da sinalização de IFN. Interessante ressaltar que nas CTEV de placentas a termo houve ativação de IRF3 e IRF9 após a infecção viral, assim como aumento na produção de IFN- α 2 e IFN- λ 1, evidenciando que as células de termo podem ter maior resistência aos mecanismos de escape do vírus.

Também analisamos o gene da IDO1, um conhecido modulador da imunidade inata, que em células dendríticas de pacientes com infecção aguda por ZIKV foi regulado positivamente, e quando inibido resultou na regulação negativa das respostas de IFN, sugerindo um papel protetor dessa molécula contra o ZIKV (SUN et al., 2017). Apesar da escassez de estudos relacionados a IDO1 na infecção placentária do ZIKV, nossos dados mostraram que não houve expressão diferencial após a infecção, sugerindo que o ZIKV também pode estar bloqueando a ativação da resposta imune por IDO1.

O que também pode ser observado na expressão de IFIT5, que apesar de não ter se apresentado diferencialmente nas células da placenta após a infecção com ZIKV, em outras infecções virais apresenta aumento nos níveis de mRNA, atuando na resposta antiviral da célula hospedeira em resposta a ativação de RIG-I (ZHANG et al., 2013). Nas células trofoblásticas humanas, RIG-I contribui para a indução de IFN-I, auxiliando no controle da replicação do

ZIKV (MA et al., 2018). Assim, são gerados estímulos para os receptores de reconhecimento de padrão RIG-I e MDA5, e a proteína NS5 viral bloqueia a subsequente resposta antiviral antagonizando a sinalização de RLR e os fatores de transcrição STAT que estão envolvidos na sinalização de IFNAR (HERTZOG et al., 2018). Desse modo, apesar de RIG-I e MDA5 conseguirem reconhecer o RNA do ZIKV no citoplasma, as proteínas virais conseguem bloquear a detecção viral, o que é consistente com nossos resultados, e se associa a uma resposta de IFN virtualmente indetectável (PARDY; VALBON; RICHER, 2019), o que também foi encontrado em nossos experimentos com explantes e células HTR-8/SVneo.

Quando o reconhecimento viral pelos receptores ocorre adequadamente, a sinalização de IFN tipo I estabelece um estado antiviral robusto por meio da indução de ISGs, que restringem a replicação viral e se espalham dentro do hospedeiro (BOWEN; ZIMMERMAN; SUTHAR, 2018). Logo, ISG15 é importante para a defesa antiviral contra ZIKV, o que foi fortemente sugerido por SINGH e colaboradores (2019), ao observar que o silenciamento de ISG15 aumenta a infectividade do ZIKV, enquanto a suplementação reduz a infecção em células epiteliais de córnea. Nossos dados mostraram que ISG15 também é afetado pelos mecanismos de evasão imunológica do ZIKV na placenta, e este não apresenta expressão diferencial após a infecção por ZIKV nos modelos estudados.

Com relação aos mecanismos de evasão imunológica, as proteínas não estruturais do ZIKV permitem a supressão da sinalização mediada por IFN e desse modo os níveis de IFNs produzidos para restringir a infecção podem ser neutralizados pelo ZIKV, enquanto também induzem inflamação e outras respostas do hospedeiros que podem ter efeitos deletérios na gravidez (RIBEIRO et al., 2018). A análise do soro de gestantes com infecção por ZIKV apresentou elevação significativa das concentrações de IL-6, IL-8, TNF- α , IL-17, IFN- α , IFN- γ e IL-10, indicando uma modificação do perfil inflamatório, favorecendo um perfil regulatório por aumentar a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias essenciais para a resposta antiviral (CAMACHO-ZAVALA, et al., 2021). Em explantes placentários de termo infectados, Ribeiro e colaboradores (2018) mostraram expressão gênica aumentada de IL-1 β , IL-6 e TNF- α , no entanto, no nosso estudo ao quantificar o nível de citocinas secretadas observamos aumento apenas de IL-6 e IL-8, configurando o real perfil inflamatório frente a infecção pelo ZIKV, mas que necessita de maiores estudos que elucidem seus efeitos a nível gênico e proteico.

Já em células HTR-8/SVneo, LUO e colaboradores (2018) evidenciaram uma produção aumentada de IL-6, IL-8 e TNF- α após 96h da infecção com a cepa asiática do ZIKV, embora

nossos resultados não tenham mostrado aumento significativo dessas citocinas após 24h de infecção com a cepa PE243, o que ressalta que o tempo de análise pós-infecção é um fator determinante para o processo inflamatório mediado pelo ZIKV, que aumenta progressivamente. No entanto, a cepa africana já apresentou uma produção elevada de TNF- α nesse modelo celular em 24 hpi, e em células CTEV a termo foi possível observar aumento da produção de IL-6 também 24hpi, apenas em células infectadas com a cepa asiática. As diferenças encontradas aqui podem ser explicadas pelas distintas condições de cultura e os diferentes isolados virais utilizados nos estudos. Enquanto o uso da cepa MR766 adaptada em laboratório é congruente entre a grande maioria dos estudos, a asiática apresenta uma ampla variedade de cepas sujeitas a particularidades funcionais (TRIPATHI et al., 2017). Ainda assim, nossos resultados trazem informações adicionais importantes sobre o perfil inflamatório mediado pelo ZIKV em diferentes modelos placentários.

Ainda com relação a produção de citocinas, nossos resultados em consonância com os dados da literatura ressaltam uma resposta imunológica com perfil levemente pró-inflamatório frente ao ZIKV, com a produção afetada pelo bloqueio das proteínas virais, assim provocando inflamação desbalanceada e disfunção da permeabilidade vascular, o que contribui para a patogênese viral e apresenta impacto negativo para gestação e para o neurodesenvolvimento fetal. Isso sugere que a estratégia imunomoduladora mediada pelo ZIKV durante a gravidez pode ser a causa subjacente de resultados deletérios na gestação (GINSBERG et al., 2017; FOO et al., 2018).

É conhecido que além da neurogênese, o ZIKV prejudica a angiogênese (GARCEZ et al., 2018; LI et al., 2021). Segundo dados de um estudo *in vivo* com camundongos, a infecção com ZIKV provocou redução da densidade dos vasos no tecido placentário, ao mesmo tempo que no córtex cerebral em desenvolvimento aumentou a expressão geral de moléculas angiogênicas, incluindo FGF-b e angiopoietina, mas sem aumento de PlGF e VEGF (GARCEZ et al., 2018). Nossos resultados não mostraram diferenças na produção de moléculas ligadas a angiogênese, mas sim em moléculas relacionadas com disfunção endotelial na gestação: IL-6 e IL-8.

A IL-6 possui níveis aumentados em pacientes com pré-eclâmpsia devido a um aumento do número de corpos apoptóticos placentários (LOCKWOOD et al., 2008; PENG et al., 2010). Essa citocina promove aumento na expressão do receptor de angiotensina II e vasoconstrição, aumentando a trombogênese, a permeabilidade vascular, o recrutamento de leucócitos e ativação endotelial, induzindo sua disfunção (WASSMANN et al., 2004; ROLDÁN et al., 2003;

DIDION, 2017). Já a IL-8 também está aumentada em pacientes com pré-eclâmpsia, conhecida por atrair neutrófilos e induzir aumento de permeabilidade vascular, representa um papel importante na disfunção vascular (VALÉNCIA-ORTEGA et al., 2019; PINHEIRO et al., 2013).

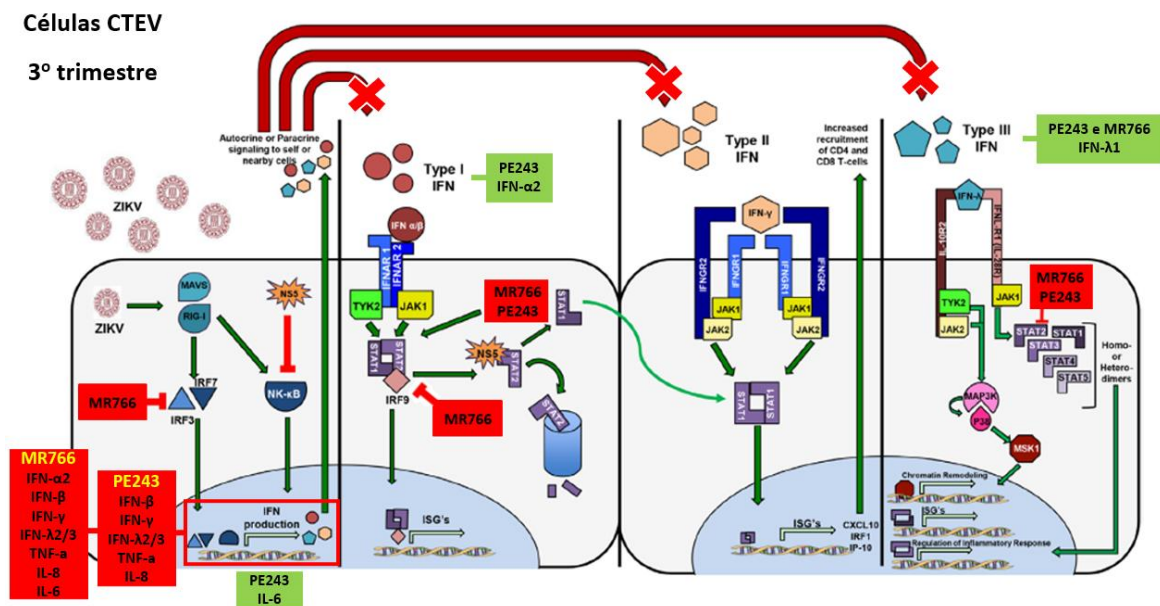
Considerando a expressão diferencial de interferons em células CTEV, nossos resultados mostraram ainda que apesar da cepa africana do ZIKV ter sido capaz de inibir a fosforilação de IRF3 e STAT2, assim como a ativação de IRF9, as células CTEV infectadas com a cepa asiática apresentaram aumento da expressão de p-IRF3 e IRF9. Corroborando com nossos dados, diversos outros estudos com linhagens africanas e asiáticas mostraram que a proteína NS5 do ZIKV medeia a degradação proteossomal de STAT2 (KUMAR et al., 2016; GRANT et al., 2016; HERTZOG et al., 2018). Enquanto, Österlund e colaboradores (2019) mostraram que em células dendríticas, a linhagem asiática do ZIKV foi capaz de ativar fracamente a forma fosforilada de IRF3, enquanto a cepa africana não ativou, exibindo maior potencial evasivo dessa última.

A resposta antiviral do hospedeiro ao ZIKV, consiste na ativação de MAVS após reconhecimento viral por RIG-I ou MDA5, que recruta TBK1 e o inibidor da proteína quinase serina /treonina kappa- B quinase epsilon (IKK ϵ), que fosforila e ativa IRF3 e IRF7, bem como o fator nuclear kappa-B (NF κ B). Após a translocação nuclear, o IRF3 promove a transcrição do IFN tipo I e III e ativa diretamente a transcrição do gene antiviral efetor, enquanto o NF κ B promove a indução precoce do IFN tipo I e conduz a produção de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, IFN tipo I secretado se liga ao receptor IFNAR e promovem a fosforilação de JAK1 e Tyk2, ativando STAT1/2. Esse heterodímero irá então se associar com IRF-9, formando ISGF3, e translocar para o núcleo para se ligar a sequências específicas, produzindo ISGs e genes efetores antivirais (BOWEN; ZIMMERMAN; SUTHAR, 2018).

Quanto ao aumento de IRF9 em células infectadas com a cepa asiática, ainda que considerando a degradação de STAT2, necessária para a formação do complexo funcional STAT1-STAT2-IRF9, são necessários maiores estudos para identificar sua função na resposta antiviral. Assim, os resultados evidenciam que CTEV é capaz de manter parte da resposta antiviral, sendo resistente aos mecanismos de evasão imunológica do ZIKV e consequentemente apresentando extrema importância para a proteção fetal. Esse resultado precisa de maiores investigações sobre tal mecanismo de resistência placentária, que pode ser direcionado terapêuticamente e aplicado em outros períodos gestacionais contra a infecção pelo ZIKV.

A degradação ou inativação de qualquer uma dessas moléculas que regulam o reconhecimento à patógenos pode levar a respostas de IFN prejudicadas durante a infecção por ZIKV, o que é ocasionado pelas estratégias de evasão do ZIKV (ÖSTERLUND et al., 2019), os quais parecem estar funcionando nos diferentes modelos estudados. No entanto, o novo modelo experimental proposto, de células CTEV de final de gestação, conseguiu ao menos responder ao ZIKV, mostrando algum tipo de resistência maior aos mecanismos de evasão virais. Desse modo, análises adicionais são necessárias para entender os mecanismos moleculares exatos pelos quais essas células mantêm a resposta antiviral ao ZIKV, sendo de extrema importância para entender melhor a patogenicidade do ZIKV na gestação e identificar possíveis alvos terapêuticos que impeçam os resultados adversos fetais e que possam ser aplicados no primeiro trimestre.

Figura 23 - Alterações imunológicas e moleculares associadas à infecção por ZIKV em células CTEV de terceiro trimestre.



Legenda: Em células CTEV, a infecção pela cepa africana MR766 bloqueia a ativação de IRF3, IRF9 e STAT2, impedindo a produção de IFN-α2, IFN-β, IFN-γ, IFN-λ2/3, TNF-α, IL-8 e IL-6, enquanto IFN-λ1 é produzido. A cepa asiática PE243 bloqueia a ativação de STAT2, impedindo a produção de IFN-β, IFN-γ, IFN-λ2/3, TNF-α e IL-8, enquanto induz a produção de IFN-α2, IFN-λ1 e IL-6. Fonte: Adaptado de BEAVER et al., 2018.

7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados neste trabalho, é possível concluir que:

1. O ZIKV possui mecanismos que parecem estar bloqueando a resposta antiviral induzida por IFN e promove um perfil inflamatório em explantes placentários e ao menos parcialmente nas células CTEV;
2. A infecção pelo ZIKV é capaz de alterar o citoesqueleto de actina, a morfologia e a topografia de células trofoblásticas;
3. Ambas as cepas de ZIKV infectam células CTEV de fim de gestação, mas somente a cepa PE243 infectou explantes;
4. O modelo de células CTEV responde diferencialmente a infecção, mantendo a ativação de vias de sinalização envolvidas na resposta antiviral, principalmente à cepa asiática, e a produção de alguns IFN, apresentando mecanismos que podem facilitar a comunicação com leucócitos e dificultar a passagem do vírus pela placenta.

REFERÊNCIAS

- ALIOTA, M. T. et al. Zika in the Americas, year 2: What have we learned? What gaps remain? A report from the Global Virus Network. *Antiviral research*, v. 144, p. 223-246, 2017.
- ALLISON, D. P. et al. Atomic force microscopy of biological samples. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, v. 2, n. 6, p. 618-634, 2010.
- AL-OBAIDI, M. M. J. et al. Japanese encephalitis virus disrupts blood-brain barrier and modulates apoptosis proteins in THBMEC cells. *Virus research*, v. 233, p. 17-28, 2017.
- ALVES, M. P. et al. Research models and tools for the identification of antivirals and therapeutics against Zika virus infection. *Viruses*, v. 10, n. 11, p. 593, 2018.
- ANTONIO, P. D. et al. Scale-independent roughness value of cell membranes studied by means of AFM technique. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 1818, n. 12, p. 3141-3148, 2012.
- ARORA, N. et al. Microbial vertical transmission during human pregnancy. *Cell host & microbe*, v. 21, n. 5, p. 561-567, 2017.
- AVELINO-SILVA, V. I. et al. Potential effect of Zika virus infection on human male fertility?. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 60, 2018.
- BAER, A.; KEHN-HALL, K. Viral concentration determination through plaque assays: using traditional and novel overlay systems. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, n. 93, p. e52065, 2014.
- BAERGEN, R. N. *Manual of pathology of the human placenta*. Springer Science & Business Media, 2011.
- BAILEY, M. J. et al. Human antibodies targeting Zika virus NS1 provide protection against disease in a mouse model. *Nature communications*, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2018.
- BAYER, A. et al. Type III interferons produced by human placental trophoblasts confer protection against Zika virus infection. *Cell host & microbe*, v. 19, n. 5, p. 705-712, 2016.
- BEAVER, J. T. et al. Evolution of two major Zika virus lineages: implications for pathology, immune response, and vaccine development. *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 1640, 2018.
- BENIRSCHKE, K.; BURTON, G. J.; BAERGEN, R. N. *Pathology of the human placenta*. 6. ed. Heidelberg, Germany: Springer, 2012.
- BHAT, P.; ANDERSON, D. A. Hepatitis B virus translocates across a trophoblastic barrier. *Journal of virology*, v. 81, n. 13, p. 7200-7207, 2007.
- BORBELY, A. U. et al. The term basal plate of the human placenta as a source of functional extravillous trophoblast cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 12, n. 1, p. 7, 2014.
- BOTELHO, R. M. et al. Biomechanical and functional properties of trophoblast cells exposed to Group B Streptococcus in vitro and the beneficial effects of uvaol treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, v. 1863, n. 9, p. 1417-1428, 2019.

- 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, 2017.
- BOWEN, J. R.; ZIMMERMAN, M. G.; SUTHAR, M. S. Taking the defensive: Immune control of Zika virus infection. *Virus research*, v. 254, p. 21-26, 2018.
- BOYD, J. D.; HAMILTON, W. J. *The Human Placenta*. Heffer, Cambridge, 1970.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes Aegypti* (dengue, chikungunya e zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 19, 2020. *Boletim Epidemiológico* nº 20, volume 51, 2020.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 45, 2017. *Boletim Epidemiológico* nº 38, volume 48, 2017.
- BRITO, C. A. et al. Persistent detection of Zika virus RNA from an infant with severe microcephaly—a case report. *BMC infectious diseases*, v. 18, n. 1, p. 1-9, 2018.
- BULMER, J. N.; WILLIAMS, P. J.; LASH, G. E. Immune cells in the placental bed. *International Journal of Developmental Biology*, v. 54, n. 2-3, p. 281-294, 2009.
- BURTON, G. J.; FOWDEN, A. L.; THORNBURG, K. L. Placental origins of chronic disease. *Physiological reviews*, v. 96, n. 4, p. 1509-1565, 2016.
- BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. What is the placenta?. *American journal of obstetrics and gynecology*, v. 213, n. 4, p. S6. e1-S6. e4, 2015.
- CAIRES-JÚNIOR, L. C. et al. Discordant congenital Zika syndrome twins show differential in vitro viral susceptibility of neural progenitor cells. *Nature communications*, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2018.
- CAMACHO-ZAVALA, E. et al. Pregnant Women Infected with Zika Virus Show Higher Viral Load and Immunoregulatory Cytokines Profile with CXCL10 Increase. *Viruses*, v. 13, n. 1, p. 80, 2021.
- CAO, B.; DIAMOND, M. S.; MYSOREKAR, I. U. Maternal-fetal transmission of Zika virus: routes and signals for infection. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, v. 37, n. 7, p. 287-294, 2017.
- CAROD-ARTAL, F. J. Neurological complications of Zika virus infection. *Expert review of anti-infective therapy*, v. 16, n. 5, p. 399-410, 2018.
- CHAUDHARY, V. et al. Selective activation of type II interferon signaling by Zika virus NS5 protein. *Journal of virology*, v. 91, n. 14, 2017.
- CHIRAMEL, A. I.; BEST, S. M. Role of autophagy in Zika virus infection and pathogenesis. *Virus research*, v. 254, p. 34-40, 2018.
- CHIU, C. et al. The mechanism of the Zika virus crossing the placental barrier and the blood-brain barrier. *Frontiers in microbiology*, v. 11, p. 214, 2020.
- COSTA, M. L.; NOBREGA, G. M.; TAVARES, A. A. Key Infections in the Placenta. *Obstetrics and Gynecology Clinics*, v. 47, n. 1, p. 133-146, 2020.
- COYNE, C. B.; LAZEAR, H. M. Zika virus—reigniting the TORCH. *Nature Reviews Microbiology*, v. 14, n. 11, p. 707-715, 2016.

- DANG, J. et al. Zika virus depletes neural progenitors in human cerebral organoids through activation of the innate immune receptor TLR3. *Cell stem cell*, v. 19, n. 2, p. 258-265, 2016.
- DELORME-AXFORD, E.; SADOVSKY, Y.; COYNE, C. B. The placenta as a barrier to viral infections. *Annual review of virology*, v. 1, p. 133-146, 2014.
- DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*, v. 46, n. 5, p. 509-520, 1952.
- DIDION, S. P. Cellular and oxidative mechanisms associated with interleukin-6 signaling in the vasculature. *International journal of molecular sciences*, v. 18, n. 12, p. 2563, 2017.
- DONNELLY, L.; CAMPLING, G. Functions of the placenta. *Anaesthesia & intensive care medicine*, v. 15, n. 3, p. 136-139, 2014.
- DOWD, K. A. et al. Broadly neutralizing activity of Zika virus-immune sera identifies a single viral serotype. *Cell reports*, v. 16, n. 6, p. 1485-1491, 2016.
- DRIGGERS, R. W. et al. Zika virus infection with prolonged maternal viremia and fetal brain abnormalities. *New England Journal of Medicine*, v. 374, n. 22, p. 2142-2151, 2016.
- DUFFY, M. R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, federated states of Micronesia. *New England Journal of Medicine*, v. 360, n. 24, p. 2536-2543, 2009.
- FANTNER, G. E. et al. Kinetics of antimicrobial peptide activity measured on individual bacterial cells using high-speed atomic force microscopy. *Nature nanotechnology*, v. 5, n. 4, p. 280-285, 2010.
- FOO, S. et al. Biomarkers and immunoprofiles associated with fetal abnormalities of ZIKV-positive pregnancies. *JCI insight*, v. 3, n. 21, 2018.
- FRANÇA, G. V. A. et al. Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. *The lancet*, v. 388, n. 10047, p. 891-897, 2016.
- GALÁN-HUERTA, K. A. et al. The Zika virus disease: An overview. *Medicina universitaria*, v. 18, n. 71, p. 115-124, 2016.
- GINSBERG, Y. et al. Maternal inflammation, fetal brain implications and suggested neuroprotection: a summary of 10 years of research in animal models. *Rambam Maimonides medical journal*, v. 8, n. 2, 2017.
- GOEIJENBIER, M. et al. Zika virus and the current outbreak: an overview. *Neth J Med*, v. 74, n. 3, p. 104-9, 2016.
- GRANT, A. et al. Zika virus targets human STAT2 to inhibit type I interferon signaling. *Cell host & microbe*, v. 19, n. 6, p. 882-890, 2016.
- GRIFONI, A. et al. Prior Dengue virus exposure shapes T cell immunity to Zika virus in humans. *Journal of virology*, v. 91, n. 24, 2017.
- GRISCHOTT, F. et al. Non-vector-borne transmission of Zika virus: A systematic review. *Travel medicine and infectious disease*, v. 14, n. 4, p. 313-330, 2016.

- GUTTMACHER, A. E.; MADDOX, Y. T.; SPONG, C. Y. The Human Placenta Project: placental structure, development, and function in real time. *Placenta*, v. 35, n. 5, p. 303-304, 2014.
- HADDOW, A. D. et al. Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 6, n. 2, p. e1477, 2012.
- HAMEL, R. et al. Biology of Zika virus infection in human skin cells. *Journal of virology*, v. 89, n. 17, p. 8880-8896, 2015.
- HANPRASERTPONG, T. Microcephaly: Significance and how to approach during the zika era. *Thai Journal of Obstetrics and Gynaecology*, p. 2-5, 2017.
- HERMANNNS, K. et al. Zika virus infection in human placental tissue explants is enhanced in the presence of dengue virus antibodies in-vitro. *Emerging microbes & infections*, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2018
- HERTZOG, J. et al. Infection with a Brazilian isolate of Zika virus generates RIG-I stimulatory RNA and the viral NS5 protein blocks type I IFN induction and signaling. *European journal of immunology*, v. 48, n. 7, p. 1120-1136, 2018.
- IVASHKIV, L. B.; DONLIN, L. T. Regulation of type I interferon responses. *Nature reviews Immunology*, v. 14, n. 1, p. 36-49, 2014.
- JONES, C. J. P. et al. A re-appraisal of the morphophenotype and basal lamina coverage of cytotrophoblasts in human term placenta. *Placenta*, v. 29, n. 2, p. 215-219, 2008.
- JUN, S. et al. Suggested mechanisms for Zika virus causing microcephaly: what do the genomes tell us?. *BMC bioinformatics*, v. 18, n. 14, p. 81-92, 2017.
- JURADO, K. A. et al. Zika virus productively infects primary human placenta-specific macrophages. *JCI insight*, v. 1, n. 13, 2016.
- KAZMI, S. S. et al. A review on Zika virus outbreak, epidemiology, transmission and infection dynamics. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, v. 27, n. 1, p. 1-11, 2020.
- KEMP, B. et al. Invasive depth of extravillous trophoblast correlates with cellular phenotype: a comparison of intra-and extrauterine implantation sites. *Histochemistry and cell biology*, v. 117, n. 5, p. 401-414, 2002.
- KHAIBOULLINA, S. et al. Zika virus transmission through blood tissue barriers. *Frontiers in microbiology*, v. 10, p. 1465, 2019.
- KUMAR, A. et al. Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling. *EMBO reports*, v. 17, n. 12, p. 1766-1775, 2016.
- LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging infectious diseases*, v. 14, n. 8, p. 1232, 2008.
- LAZEAR, H. M. et al. A mouse model of Zika virus pathogenesis. *Cell host & microbe*, v. 19, n. 5, p. 720-730, 2016.

- LEE, I. et al. Probing molecular insights into Zika virus–host interactions. *Viruses*, v. 10, n. 5, p. 233, 2018.
- LEE, J. K.; SHIN, O. S. Advances in Zika virus–host cell interaction: Current knowledge and future perspectives. *International journal of molecular sciences*, v. 20, n. 5, p. 1101, 2019.
- LEE, J. W. M.; NG, M. A nano-view of West Nile virus-induced cellular changes during infection. *Journal of Nanobiotechnology*, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2004.
- LEMKE, G.; COHEN, T. B. TAM receptors and the clearance of apoptotic cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1209, p. 23, 2010.
- LEÓN-JUÁREZ, M. et al. Cellular and molecular mechanisms of viral infection in the human placenta. *Pathogens and disease*, v. 75, n. 7, 2017.
- LI, C. et al. Zika virus disrupts neural progenitor development and leads to microcephaly in mice. *Cell stem cell*, v. 19, n. 1, p. 120-126, 2016.
- LI, J. et al. Interferon lambda inhibits herpes simplex virus type I infection of human astrocytes and neurons. *Glia*, v. 59, n. 1, p. 58-67, 2011.
- LI, Y. et al. Zika virus induces neuronal and vascular degeneration in developing mouse retina. *Acta neuropathologica communications*, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2021.
- LIANG, B. et al. Host and viral mechanisms of congenital Zika syndrome. *Virulence*, v. 10, n. 1, p. 768-775, 2019.
- LIANG, Q. et al. Zika virus NS4A and NS4B proteins deregulate Akt-mTOR signaling in human fetal neural stem cells to inhibit neurogenesis and induce autophagy. *Cell stem cell*, v. 19, n. 5, p. 663-671, 2016.
- LOCKWOOD, C. J. et al. Matrix metalloproteinase 9 (MMP9) expression in preeclamptic decidua and MMP9 induction by tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta in human first trimester decidual cells. *Biology of reproduction*, v. 78, n. 6, p. 1064-1072, 2008.
- LOGSDON, E. A. et al. A systems biology view of blood vessel growth and remodelling. *Journal of cellular and molecular medicine*, v. 18, n. 8, p. 1491-1508, 2014.
- LOKE, Y. W.; KING, A. *Human implantation: cell biology and immunology*. Cambridge University Press, 1995.
- LOKE, Y. W.; KING, A.; BURROWS, T. D. Decidua in human implantation. *Human reproduction*, v. 10, n. suppl_2, p. 14-21, 1995.
- LOREGGER, T.; POLLHEIMER, J.; KNÖFLER, M. Regulatory transcription factors controlling function and differentiation of human trophoblast - a review. *Placenta*, v. 24, p. S104-S110, 2003.
- LUO, H. et al. Zika, dengue and yellow fever viruses induce differential anti-viral immune responses in human monocytic and first trimester trophoblast cells. *Antiviral research*, v. 151, p. 55-62, 2018.
- MA, J. et al. Zika virus non-structural protein 4A blocks the RLR-MAVS signaling. *Frontiers in microbiology*, v. 9, 2018.

MACHADO-PEREIRA, M. et al. Vascular inter-regulation of inflammation: molecular and cellular targets for CNS therapy. *Journal of Neurochemistry*, v. 140, n. 5, p. 692-702, 2017.

MALLET, H. P.; VIAL, A. L.; MUSSO, D. Bilan de l'épidémie à virus Zika survenue en Polynésie française entre octobre 2013 et mars 2014. De la description de l'épidémie aux connaissances acquises après l'évènement. *Bull Epidémiol Hebd*, v. 20, n. 21, p. 367-73, 2015.

MANSUY, J. et al. Peripheral plasma and semen cytokine response to zika virus in humans. *Emerging infectious diseases*, v. 25, n. 4, p. 823, 2019.

MARQUES, V. M. et al. Neurological complications of congenital Zika virus infection. *Pediatric neurology*, v. 91, p. 3-10, 2019.

MARZUSCH, K.; DIETL, J. Immunologische Aspekte im Rahmen der regelrechten und gestörten Schwangerschaft beim Menschen. Publ.: Universitäts-Frauenklinik Tübingen, Tübingen, 1994.

MCARTHUR, M. A. Zika virus: recent advances towards the development of vaccines and therapeutics. *Viruses*, v. 9, n. 6, p. 143, 2017.

MCELFRESH, M. et al. Combining constitutive materials modeling with atomic force microscopy to understand the mechanical properties of living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99, n. suppl 2, p. 6493-6497, 2002.

MÉCHARLES, S. et al. Acute myelitis due to Zika virus infection. *The Lancet*, v. 387, n. 10026, p. 1481, 2016.

MEERTENS, L. et al. Axl mediates ZIKA virus entry in human glial cells and modulates innate immune responses. *Cell reports*, v. 18, n. 2, p. 324-333, 2017.

MILLER, R. K. et al. Human placental explants in culture: approaches and assessments. *Placenta*, v. 26, n. 6, p. 439-448, 2005.

MINER, J. J.; DIAMOND, M. S. Zika virus pathogenesis and tissue tropism. *Cell host & microbe*, v. 21, n. 2, p. 134-142, 2017.

MITTAL, R. et al. Zika virus: an emerging global health threat. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 7, p. 486, 2017.

MOLONEY, M.; MCDONNELL, L.; O'SHEA, H. Atomic force microscopy analysis of enveloped and non-enveloped viral entry into, and egress from, cultured cells. *Ultramicroscopy*, v. 100, n. 3-4, p. 163-169, 2004.

MONTENEGRO, C. A. B.; FILHO, J. R. Rezende. *Obstetrícia fundamental*. 12ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

MOR, G. Placental Inflammatory Response to Zika Virus may Affect Fetal Brain Development. *American journal of reproductive immunology (New York, NY: 1989)*, v. 75, n. 4, p. 421-422, 2016.

MUTHURAJ, P. G. et al. Zika virus infection induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in placental trophoblasts. *The FASEB Journal*, v. 34, n. S1, p. 1-1, 2020.

- NELSON, D. M. How the placenta affects your life, from womb to tomb. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, v. 213, n. 4, p. S12-S13, 2015.
- NGONO, A. E.; SHRESTA, S. Immune response to dengue and Zika. *Annual review of immunology*, v. 36, p. 279-308, 2018.
- NORONHA, L. et al. Zika virus damages the human placental barrier and presents marked fetal neurotropism. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 111, n. 5, p. 287-293, 2016.
- NOWAKOWSKI, T. J. et al. Expression analysis highlights AXL as a candidate Zika virus entry receptor in neural stem cells. *Cell stem cell*, v. 18, n. 5, p. 591-596, 2016.
- OJHA, C. R. et al. Complementary mechanisms potentially involved in the pathology of Zika Virus. *Frontiers in immunology*, v. 9, p. 2340, 2018.
- OLAGNIER, D. et al. Mechanisms of Zika virus infection and neuropathogenesis. *DNA and cell biology*, v. 35, n. 8, p. 367-372, 2016.
- ÖSTERLUND, P. et al. Asian and African lineage Zika viruses show differential replication and innate immune responses in human dendritic cells and macrophages. *Scientific reports*, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2019.
- PARDY, R. D.; VALBON, S. F.; RICHER, M. J. Running interference: Interplay between Zika virus and the host interferon response. *Cytokine*, v. 119, p. 7-15, 2019.
- PENA, L. J. et al. In vitro and in vivo models for studying Zika virus biology. *Journal of General Virology*, v. 99, n. 12, p. 1529-1550, 2018.
- PENG, B. et al. Phagocytosis of apoptotic trophoblast cells by human endometrial endothelial cells induces proinflammatory cytokine production. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 64, n. 1, p. 12-19, 2010.
- PEREIRA, L. Congenital viral infection: traversing the uterine-placental interface. *Annual review of virology*, v. 5, p. 273-299, 2018.
- PETITT, M. et al. Zika virus infection of first-trimester human placentas: utility of an explant model of replication to evaluate correlates of immune protection ex vivo. *Current opinion in virology*, v. 27, p. 48-56, 2017.
- PIJNENBORG, R. et al. The pattern of interstitial trophoblastic invasion of the myometrium in early human pregnancy. *Placenta*, v. 2, n. 4, p. 303-315, 1981.
- PINHEIRO, M. B. et al. Severe preeclampsia goes along with a cytokine network disturbance towards a systemic inflammatory state. *Cytokine*, v. 62, n. 1, p. 165-173, 2013.
- PLATT, D. J. et al. Zika virus-related neurotropic flaviviruses infect human placental explants and cause fetal demise in mice. *Science translational medicine*, v. 10, n. 426, 2018.
- POLLHEIMER, J. et al. Regulation of placental extravillous trophoblasts by the maternal uterine environment. *Frontiers in immunology*, v. 9, p. 2597, 2018.
- PRATA-BARBOSA, A. et al. Effects of Zika infection on growth. *Jornal de Pediatria (Versão em Português)*, v. 95, p. 30-41, 2019.
- PRISANT, N. et al. Zika virus genital tract shedding in infected women of childbearing age. *Clinical Infectious Diseases*, p. ciw669, 2016.

- PROENCA-MODENA, J. L. et al. Zika virus: lessons learned in Brazil. *Microbes and infection*, v. 20, n. 11-12, p. 661-669, 2018
- QUICKE, K. M. et al. Zika virus infects human placental macrophages. *Cell host & microbe*, v. 20, n. 1, p. 83-90, 2016.
- RASMUSSEN, S. A. et al. Zika virus and birth defects—reviewing the evidence for causality. *New England Journal of Medicine*, v. 374, n. 20, p. 1981-1987, 2016.
- REYNOLDS, M. R. et al. Vital signs: update on Zika virus-associated birth defects and evaluation of all US infants with congenital Zika virus exposure—US Zika Pregnancy Registry, 2016. *Morbidity and mortality weekly report*, v. 66, n. 13, p. 366, 2017.
- RIBEIRO, C. F. et al. Dengue infection in pregnancy and its impact on the placenta. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 55, p. 109-112, 2017.
- RIBEIRO, M. R. et al. Zika-virus-infected human full-term placental explants display pro-inflammatory responses and undergo apoptosis. *Archives of virology*, v. 163, n. 10, p. 2687-2699, 2018.
- RITTER, J. M.; MARTINES, R. B.; ZAKI, S. R. Zika virus: pathology from the pandemic. *Archives of pathology & laboratory medicine*, v. 141, n. 1, p. 49-59, 2017.
- ROBBINS, J. R. et al. Placental syncytiotrophoblast constitutes a major barrier to vertical transmission of *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog*, v. 6, n. 1, p. e1000732, 2010.
- ROBBINS, J. R. et al. Tissue barriers of the human placenta to infection with *Toxoplasma gondii*. *Infection and immunity*, v. 80, n. 1, p. 418-428, 2012.
- ROBY, J. A. et al. Post-translational regulation and modifications of flavivirus structural proteins. *Journal of General Virology*, v. 96, n. 7, p. 1551-1569, 2015.
- ROLDÁN, V. et al. Interleukin-6, endothelial activation and thrombogenesis in chronic atrial fibrillation. *European heart journal*, v. 24, n. 14, p. 1373-1380, 2003.
- ROSENFELD, C. S. The placenta-brain-axis. *Journal of neuroscience research*, v. 99, n. 1, p. 271-283, 2021.
- SAHOO, M.; JENA, S. D. L.; KUMAR, S. Virtual screening for potential inhibitors of NS3 protein of Zika virus. *Genomics & informatics*, v. 14, n. 3, p. 104, 2016.
- SARIOL, C. A.; NOGUEIRA, M. L.; VASILAKIS, N. A tale of two viruses: does heterologous flavivirus immunity enhance Zika disease?. *Trends in microbiology*, v. 26, n. 3, p. 186-190, 2018.
- SHERIDAN, M. A. et al. African and Asian strains of Zika virus differ in their ability to infect and lyse primitive human placental trophoblast. *PLoS One*, v. 13, n. 7, p. e0200086, 2018.
- SHERIDAN, M. A. et al. Vulnerability of primitive human placental trophoblast to Zika virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 114, n. 9, p. E1587-E1596, 2017.
- SHI, Y.; GAO, G. F. Structural biology of the Zika virus. *Trends in biochemical sciences*, v. 42, n. 6, p. 443-456, 2017.

- SIMONI, M. K. et al. Zika virus infection of Hofbauer cells. *American journal of reproductive immunology*, v. 77, n. 2, p. e12613, 2017.
- SINGH, P. K. et al. Interferon-stimulated gene 15 (ISG15) restricts Zika virus replication in primary human corneal epithelial cells. *The ocular surface*, v. 17, n. 3, p. 551-559, 2019.
- SINGH, R. K. et al. Zika virus—emergence, evolution, pathology, diagnosis, and control: current global scenario and future perspectives—a comprehensive review. *Veterinary Quarterly*, v. 36, n. 3, p. 150-175, 2016.
- SMITH, D. R. et al. African and Asian Zika virus isolates display phenotypic differences both in vitro and in vivo. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 98, n. 2, p. 432-444, 2018.
- SOARES, C. N. et al. Fatal encephalitis associated with Zika virus infection in an adult. *Journal of Clinical Virology*, v. 83, p. 63-65, 2016.
- STAPLES, J. E. et al. Interim guidelines for the evaluation and testing of infants with possible congenital Zika virus infection—United States, 2016. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 65, n. 3, p. 63-67, 2016.
- SUN, X. et al. Transcriptional changes during naturally acquired Zika virus infection render dendritic cells highly conducive to viral replication. *Cell reports*, v. 21, n. 12, p. 3471-3482, 2017.
- SYEDBASHA, M.; EGLI, A. Interferon lambda: modulating immunity in infectious diseases. *Frontiers in immunology*, v. 8, p. 119, 2017.
- TABATA, T. et al. Zika virus targets different primary human placental cells, suggesting two routes for vertical transmission. *Cell host & microbe*, v. 20, n. 2, p. 155-166, 2016.
- TAPPE, D. et al. Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. *Medical microbiology and immunology*, v. 205, n. 3, p. 269-273, 2016.
- TEIXEIRA, F. M. E. et al. Maternal-fetal interplay in Zika virus infection and adverse perinatal outcomes. *Frontiers in immunology*, v. 11, 2020.
- TIWARI, P. M. et al. Atomic force microscopic investigation of respiratory syncytial virus infection in HEp-2 cells. *Journal of microscopy*, v. 253, n. 1, p. 31-41, 2014.
- TRIPATHI, S. et al. A novel Zika virus mouse model reveals strain specific differences in virus pathogenesis and host inflammatory immune responses. *PLoS pathogens*, v. 13, n. 3, p. e1006258, 2017.
- TURRINI, F. et al. Zika Virus: a re-emerging pathogen with rapidly evolving public health implications. *New Microbiol*, v. 39, n. 2, p. 86-90, 2016.
- VALENCIA-ORTEGA, J. et al. Placental proinflammatory state and maternal endothelial dysfunction in preeclampsia. *Gynecologic and obstetric investigation*, v. 84, n. 1, p. 12-19, 2019.
- VAUSE, S.; SAROYA, D. K. Functions of the placenta. *Anaesthesia & intensive care medicine*, v. 6, n. 3, p. 77-80, 2005.
- WANG, Z. et al. Axl is not an indispensable factor for Zika virus infection in mice. *The Journal of general virology*, v. 98, n. 8, p. 2061, 2017.

- WASSMANN, S. et al. Interleukin-6 induces oxidative stress and endothelial dysfunction by overexpression of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation research*, v. 94, n. 4, p. 534-541, 2004.
- WEISBLUM, Y. et al. Zika virus infects early-and midgestation human maternal decidual tissues, inducing distinct innate tissue responses in the maternal-fetal interface. *Journal of virology*, v. 91, n. 4, 2017.
- WELLS, M. F. et al. Genetic ablation of AXL does not protect human neural progenitor cells and cerebral organoids from Zika virus infection. *Cell stem cell*, v. 19, n. 6, p. 703-708, 2016.
- WINTERHAGER, E.; KAUFMANN, P.; GRUEMMER, R. Cell-cell-communication during placental development and possible implications for trophoblast proliferation and differentiation. *Placenta*, 2000.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Screening, assessment and management of neonates and infants with complications associated with Zika virus exposure in utero. Geneva; 2016.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Zika epidemiology update. WHO: Jul 2019. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/diseases/zika/zika-epidemiology-update-july-2019.pdf?ua=1>, 2019a.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Zika: the continuing threat. *Bull World Health Organ*, v. 97, n. 1, p. 6-7, 2019b.
- WU, K. et al. Vertical transmission of Zika virus targeting the radial glial cells affects cortex development of offspring mice. *Cell research*, v. 26, n. 6, p. 645-654, 2016.
- WU, Y. et al. Zika virus evades interferon-mediated antiviral response through the co-operation of multiple nonstructural proteins in vitro. *Cell discovery*, v. 3, n. 1, p. 1-14, 2017.
- XIA, H. et al. An evolutionary NS1 mutation enhances Zika virus evasion of host interferon induction. *Nature communications*, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2018.
- YUAN, L. et al. A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. *Science*, v. 358, n. 6365, p. 933-936, 2017.
- ZHANG, B. et al. IFIT5 potentiates anti-viral response through enhancing innate immune signaling pathways. *Acta Biochim Biophys Sin*, v. 45, n. 10, p. 867-874, 2013.
- ZHU, Z. et al. Comparative genomic analysis of pre-epidemic and epidemic Zika virus strains for virological factors potentially associated with the rapidly expanding epidemic. *Emerging microbes & infections*, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2016.