ANNA CLÁUDIA CALVIELLI CASTELO BRANCO

**Ativação de vilos placentários humanos com agonista de receptor
toll-like 4 na infecção *in vitro* por Zika vírus**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2018

RESUMO

BRANCO, ACCC. **Ativação de vilos placentários humanos com agonista de receptor toll-like 4 na infecção in vitro por Zika vírus.** 2018. 88 p. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

O Zika vírus (ZIKV) pertence à família flaviviridae que inclui espécies transmitidas principalmente por mosquitos *Aedes* sp. No Brasil, casos de microcefalia fetal foram associados à infecção congênita por ZIKV. Vários mecanismos de imunorregulação operantes durante a gestação como a inflamação gerada e resposta antiviral são vitais para o entendimento da infecção congênita do ZIKV. Desta forma, é proposto avaliar se a inflamação via ativação do receptor Toll-like 4 (TLR4-LPS) em vilos placentários humanos e em modelo murino interfere na infecção por ZIKV. Para isso, explantes de vilos placentários humanos de 3º trimestre foram ativados com LPS e posteriormente infectados com ZIKV. Nossos achados mostram que a ativação com LPS é capaz de aumentar a replicação de ZIKV em vilos placentários e de elevar a atividade enzimática da lactato desidrogenase, indicativo de ativação celular. A replicação viral foi inibida com o tratamento dos explantes com um antioxidante, Naringenina, mostrando potencial terapêutico. A ativação placentária com LPS inibiu a via IRF-3, diminuindo a atividade antiviral e aumentando a clivagem proteica do componente da via de autofagia LC3, sendo que estes mecanismos podem estar relacionados com o aumento da replicação viral. Em paralelo, foi detectado aumento da produção de citocinas inflamatórias e hiperplasia das células de Hofbauer nos explantes inflamados e infectados, indicando que estes macrófagos fetais podem ser um nicho de replicação viral. Em modelo murino, evidenciamos que a inoculação intravaginal de LPS em fêmeas prenhas previamente à infecção com ZIKV é capaz de promover o aumento de carga viral no cérebro das mães e da prole, com agravamento do quadro de microcefalia nos fetos. Em conjunto, os dados mostram que em modelo de explante placentário humano e, in vivo, em camundongos, a inflamação é fator predisponente da replicação do ZIKV. As estratégias imunomoduladoras mostram potencial terapêutico, atenuando a resposta inflamatória e a diminuição da replicação viral.

Palavras-chave: Zika vírus; inflamação; receptor Toll-like; células de Hofbauer; imunomodulação.

ABSTRACT

BRANCO, ACCC. **Activation of human placental villi with toll-like receptor 4 agonist during *in vitro* infection by Zika virus.** 2018. 88 p. Dissertation (Masters thesis in Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The Zika virus (ZIKV) belongs to the flaviviridae family that includes species transmitted mainly by mosquitoes *Aedes sp.* In Brazil, cases of fetal microcephaly were associated with ZIKV congenital infection. Several mechanisms of immunoregulation operative during gestation as the inflammation generated and antiviral response are vital for the understanding of congenital ZIKV infection. Thus, it is proposed to evaluate whether inflammation via Toll-like receptor 4 (TLR4-LPS) activation in human and murine placental villi interferes with ZIKV infection. For this, human placental explants of 3rd trimester were activated with LPS and later infected with ZIKV. Our findings show that LPS activation is capable of increasing ZIKV replication in placental villi and elevating the enzymatic activity of lactate dehydrogenase, indicative of cellular activation. Viral replication was inhibited with the treatment of explants with an antioxidant, Naringenin, showing therapeutic potential. LPS placental activation inhibited the IRF-3 pathway, decreasing antiviral activity and increasing protein cleavage of the autophagy pathway component LC3, and these mechanisms may be related to increased viral replication. In parallel, increased production of inflammatory cytokines and Hofbauer cell hyperplasia were detected in inflamed and infected explants, indicating that these fetal macrophages may be a niche for viral replication. In the murine model, we demonstrated that the intravaginal inoculation of LPS in pregnant females prior to infection with ZIKV is able to promote the increase of viral load in the brains of mothers and offspring, with worsening of the microcephaly in fetuses. Together, the data show that in the model of human placental explant and, *in vivo*, in mice, inflammation is a predisposing factor of ZIKV replication. Immunomodulatory strategies show therapeutic potential, attenuating the inflammatory response and decreasing viral replication.

Keywords: Zika virus; inflammation; Toll-like receptor; Hofbauer cells; immunomodulation.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Infecção por Zika vírus

O Zika vírus (ZIKV) é um vírus de grande importância médica global que pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*. Esta família comporta patógenos já bem conhecidos pela humanidade, como vírus da febre amarela, vírus da dengue (DENV), vírus do oeste do Nilo (WNV) e vírus da encefalite japonesa (JEV) (Briant, Desprès et al. 2014). De forma geral, são caracterizados por serem envelopados e apresentarem um genoma de RNA de simples fita (ssRNA), com aproximadamente 11kb de comprimento (Oliveira, Mohana-Borges et al. 2017). Este genoma codifica uma única poliproteína (flanqueada por duas regiões não-traduzidas 5' e 3') que é expressa e clivada em três proteínas estruturais (C, E e prM), que constituem o capsídeo, e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), envolvidas no complexo de replicação viral (Klema, Padmanabhan et al. 2015).

A primeira descrição do ZIKV foi em 1947, identificado na floresta de Zika, na Uganda (DICK, KITCHEN et al. 1952). A princípio, o vírus era restrito a alguns países da África e Ásia, e, em função de diferenças genotípicas, foram determinadas até o momento duas linhagens de ZIKV: africana e asiática (Faria, Azevedo et al. 2016). Em 2007, foram relatados os primeiros surtos epidêmicos de ZIKV na Micronésia e na Polinésia Francesa (Chan, Choi et al. 2016). Sua introdução no Brasil, cuja análise genotípica indica ser derivado da variedade asiática, pode ter ocorrido durante eventos realizados em 2014, como a Copa do Mundo e o Torneio de Canoagem (Musso 2015).

Os casos no Brasil exibiram um pico de ocorrência em 2016 quando o Ministério da Saúde registrou 216.201 casos. Contudo, em 2017, esse número

caiu para 17.594 e, em 2018, foram registrados até o momento 6.371 casos (Boletim Epidemiológico, Brasil, agosto 2018). Os casos brasileiros foram considerados os mais graves já relatados na América Latina, principalmente devido à associação entre a infecção durante a gestação e a indução de microcefalia em recém-natos (Carod-Artal 2016). A Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou um alerta em dezembro de 2015 sobre o problema epidemiológico no país e a associação entre a infecção viral e malformações congênitas, além da ocorrência de síndromes neurológicas (Who, 2015). Um boletim do Ministério da Saúde brasileiro informou, em julho de 2016, a confirmação de 1.749 casos de microcefalia sugestivos de infecção congênita por ZIKV.

O ZIKV também pode ser considerado um arbovírus, termo que engloba diversas categorias de vírus não relacionados, mas que são transmitidos por vetores artrópodes, como mosquitos do gênero *Aedes* sp. como *A. aegypti*, *A. albopictus* e *A. Africanus*, *Culex* sp. e *Anopheles* sp. (Epelboin, Talaga et al. 2017).

De forma similar a outras arboviroses, a patogênese da infecção pelo ZIKV se inicia pela sua inoculação no hospedeiro através da picada do mosquito-vetor durante o repasto sanguíneo. Assim, a pele é um sítio anatômico primário de infecção e, de fato, foi constatado que fibroblastos, queratinócitos e células dendríticas (DCs) imaturas da epiderme são permissivas ao vírus (Hamel, Dejarnac et al. 2015). Ainda, a inflamação induzida pela picada do mosquito promove o recrutamento de fagócitos, que podem carrear o vírus, favorecendo sua disseminação pelo organismo (Pinggen, Bryden et al. 2016). A invasão da célula pelos flavivírus ocorre por vias

endocíticas ativadas pela interação da proteína E da partícula viral com receptores de superfície da célula alvo (Perera-Lecoin, Meertens et al. 2013). Dentro da célula, o vírus estabelece um complexo de replicação no retículo endoplasmático usando as proteínas NS. Após a replicação do RNA viral e expressão das proteínas estruturais, a partícula viral imatura é montada e transportada ao complexo golgiense, onde é maturada e liberada por exocitose (Roby, Setoh et al. 2015).

Embora a transmissão por artrópodes seja a via clássica de infecção, outras vias alternativas que independem do vetor tem sido descritas, como por exemplo pelo Centro de Controle de Doenças (CDC) dos EUA, que descreveu quatorze relatos de suspeita de transmissão sexual por ZIKV, dos quais três foram confirmados com exames laboratoriais (Hills, Russell et al. 2016). Posteriormente, a presença de ZIKV foi identificada também no sêmen de paciente na Itália (Venturi, Zammarchi et al. 2016). Apesar do RNA viral ser encontrado no material biológico dos pacientes após vários meses da infecção inicial, foi identificado, em um grupo de pacientes de Porto Rico, que o ZIKV, na sua forma infectiva, pode perdurar por até 38 dias no sêmen (Medina, Torres et al. 2018). Outros meios de transmissão independentes do vetor tem sido estudados, como transfusão sanguínea, urina, saliva e leite materno (Grishott, Puhan et al. 2016), ainda que o potencial infectante destes materiais não esteja bem definido.

Em adultos, a maioria das infecções pelo ZIKV é benigna e auto-limitada, caracterizada por um quadro febril agudo ou mesmo assintomático. Os sintomas, quando ocorrem, são inespecíficos, destacando-se como manifestações mais comuns: exantema macular ou papular, febre,

artrite/artralgia, conjuntivite não purulenta, mialgia, dor de cabeça, dor retrorbital, edema e vômito. No entanto, um número diminuto de pacientes desenvolve a síndrome de Guillain-Barré, observada como uma neuropatia axonal motora (Oehler, Watrin et al. 2014).

Apesar da relevância da doença em adultos, o acometimento neonatal é a grande problemática da infecção pelo ZIKV. Na síndrome congênita, a principal manifestação é a microcefalia, definida como uma redução da circunferência occipitofrontal. Também se observam lesões cerebrais, má formação do cerebelo, tronco encefálico, tálamo e comprometimento ocular, como calcificações e atrofia macular. Quando não inviabilizam o feto ou acarretam na morte prematura do recém-nato, as más formações neurológicas geram um déficit cognitivo permanente (Adamski, Bertolli et al. 2018).

A microcefalia indica que o ZIKV interfere no desenvolvimento neurológico e modelos *in vitro* mostraram que o vírus consegue infectar progenitores neuronais, desregulando os ciclos de replicação celular e induzindo apoptose destas populações (Tang 2016). Ainda, as células remanescentes parecem comportar-se como reservatórios do vírus, sem que haja ativação imunológica significativa – o que indica que a infecção poderá ter repercussões mesmo após vários meses do contato (Hanners, Eitson et al. 2016). Células endoteliais microvasculares cerebrais infectadas pelo ZIKV se mantêm íntegras, indicando que, possivelmente, a migração do vírus pela monocamada cerebral se dá através de mecanismos como endocitose/exocitose, sem rompimento da barreira (Papa, Meuren et al. 2017).

Embora os dados com modelos humanos sejam limitados ao sistema *in vitro*, modelos experimentais com camundongos corroboraram a relação entre

a infecção pelo ZIKV e a indução da microcefalia fetal (Cugola, Fernandes et al. 2016, Lazear, Stringer et al. 2016, Li, Saucedo-Cuevas et al. 2016). Modelos em primatas não humanos, como estudos em macacos Rhesus, comprovaram que a infecção por ZIKV durante o primeiro trimestre da gestação acarreta em danos neurológicos nos fetos (Martinot, Abbink et al. 2018).

1.2 Transmissão vertical do ZIKV

Desde que foi estabelecida a relação do ZIKV com o acometimento fetal, uma das principais questões a ser respondida são os mecanismos de passagem transplacentária. A placenta é o órgão materno-fetal que começa a ser desenvolvido a partir da implantação do blastocisto, responsável pela nutrição do feto, troca gasosa, eliminação de resíduos, funções endócrinas e também imunológicas. Em algumas infecções importantes, como por exemplo por HIV, já foi demonstrado que a placenta atua combatendo o vírus, através da produção de gonadotrofina coriônica humana (hCG), que atua inibindo a transcrição reversa do HIV em linfócitos e monócitos e também inibe a transmissão viral em trofoblastos infectados (Spector 2001).

Alguns estudos recentes elucidaram mecanismos existentes que ajudam a explicar a transmissão vertical do ZIKV. O vírus pode atingir o feto por translocação placentária, através de células infectadas ou vírions livres (Fig. 1), ou também veiculado por microvesículas secretadas, como por exemplo, os exossomas (Zhang, Li et al. 2016). Embora os achados mostrem que trofoblastos isolados de placentas a termo exibem resistência natural à infecção pelo ZIKV devido à secreção constitutiva de interferon (IFN) tipo III (Bayer, Lennemann et al. 2016), dados obtidos de modelos experimentais

mostram que a placenta (e o consequente acometimento fetal) pode ser eficientemente infectada no começo da gestação (Miner, Cao et al. 2016).

Além disso, também foi observado que as células de Hofbauer (HBC, macrófagos placentários) podem funcionar como um nicho replicativo para o ZIKV (Quicke, Bowen et al. 2016), indicando que as células imunes exercem um papel importante na patogênese da infecção. Recentemente, foi descrito que mesmo em camundongos sem deficiência genética de IFN tipo I, que conseguem controlar a infecção por ZIKV, a presença viral causa danos fetais e patologias associadas à placenta (Szaba, Tighe et al. 2018). Foi evidenciado também um mecanismo de aumento de replicação de ZIKV em HBCs e explantes placentários humanos sensibilizados com anticorpos anti-DENV, conhecido como aumento dependente de anticorpos (ADE), o que corrobora com dados epidemiológicos do aumento de transmissão vertical de ZIKV em zonas endêmicas de DENV (Zimmerman, Quicke et al. 2018).

Rotas potenciais de transmissão vertical do Zika Vírus

Figura 1: Rotas potenciais de transmissão vertical do Zika Vírus. Esquema representativo da interface materno-fetal e possíveis rotas para infecção fetal de Zika vírus e sua disseminação no útero. O desenho indica o lado materno (decídua) e fetal (vilo), com a passagem viral através de vírions livres ou células infectadas (citotrofoblastos, CTBs e sinciciotrofoblastos, STBs), durante os trimestres gestacionais. Modificado de: Takako Tabata, 2016.

Em síntese, o surto epidêmico recente por ZIKV, aliado à problemática da infecção congênita associada a casos de microcefalia fetal, aumentou os estudos deste vírus por cientistas de todo o mundo, na tentativa da maior compreensão de sua fisiopatologia, tropismo neurológico e também passagem transplacentária, que, em muitas outras infecções, pode funcionar como barreira protetora.

1.3 Interação materno-fetal

Vários aspectos de imunidade inata ou adaptativa na interação materno-fetal tem sido documentados em revisões por nosso grupo de pesquisa, nas quais exploramos a resposta imunológica neonatal na vigência de infecções, uso de adjuvantes para potencializar a resposta vacinal de neonatos e na proteção de infantes pela vacinação materna (de Brito, Goldoni et al. 2009, Rigato, Fusaro et al. 2009, Sato 2012). A gestação é um dos fenômenos imunológicos mais interessantes de regulação da resposta alogênica, considerando que o sistema imune materno reconhece os aloantígenos paternos no feto, mas não os rejeita. Um mecanismo complexo de tolerância tem sido proposto na gestação, em especial na interface materno-fetal desde as observações de Peter Medawar (1953) há mais de 60 anos.

Em humanos, as células placentárias, como o trofoblasto viloso, estão ancoradas na decídua materna e se diferenciam em sinciotrofoblasto, citotrofoblasto e trofoblasto extra-viloso (EVT). Os trofoblastos vilosos são banhados pelo sangue materno, liberam exossomas placentários, micropartículas, células tronco fetais e hormônios essenciais ao curso da gestação, como o β -hCG. Os EVTs que infiltram a decídua entram em contato direto com as células imunes maternas, não expressam moléculas clássicas de reconhecimento antigênico do sistema de antígenos leucocitários humanos (HLA), mas expressam moléculas não clássicas como HLA-G, HLA-C, HLA-E e HLA-F (Takahashi, Takizawa et al. 2014). O HLA-G, por exemplo, liga-se ao receptor inibidor KIR2DL4 das células Natural Killer (NK), protegendo o trofoblasto da citotoxicidade mediada por estas células (Rizzo, Melchiorri et al. 2007).

Outra população celular presente na face fetal placentária são as HBCs, macrófagos residentes com fenótipo regulador M2 (Selkov, Selutin et al. 2013). Elas expressam marcadores específicos de macrófagos, como CD14, CD68, marcadores de perfil M2 como CD163 e possuem papel essencial no controle da resposta inflamatória.

São vários os mecanismos que promovem o ambiente tolerogênico placentário, tais como: a enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) que degrada o triptofano, o controle da ativação de células NK uterinas (uNK), a produção de níveis elevados de progesterona, a expressão de moléculas não clássicas de HLA (HLA-G), a presença de células mieloides supressoras (MDSC), macrófagos de perfil M2 e células T reguladoras, e o aumento nos níveis de citocinas reguladoras, como TGF- β e IL-10, e de moléculas inibidoras

do sistema complemento (Pérez Leirós and Ramhorst 2013, Svensson-Arvelund, Mehta et al. 2015, Köstlin, Hofstädter et al. 2016). Assim, o estado tolerogênico ocorre em gestações saudáveis tanto na interface materno-fetal quanto também sistemicamente, pois os antígenos fetais são circulantes e, portanto, podem exercer influência em tecidos maternos extrauterinos.

Contudo, na presença de intercorrências gestacionais como pré-eclâmpsia, diabetes gestacional, infecções virais, bacterianas, entre outras, pode haver quebra da tolerância e mecanismos inflamatórios ou antivirais tornam-se operantes. Estes mecanismos, ainda que essenciais no combate a infecções congênitas, seja no tecido placentário, seja nos outros tecidos uterinos, também podem gerar dano ao feto como efeito colateral. A imunidade inata e sua regulação, atuando em diferentes aspectos da ativação celular e na resposta antiviral, são alguns dos componentes fundamentais para entender a patologia e suscetibilidade às infecções virais, em especial do ZIKV.

1.4 Inflamação e infecção viral

Na resposta aos flavivírus, os Receptores Reconhecedores de Padrões (PRRs) estão envolvidos tanto na entrada do vírus na célula hospedeira quanto na resposta inflamatória. A primeira etapa do processo é a adesão das partículas virais à célula-alvo mediada pelas interações eletrostáticas de glicoproteína da superfície do vírus (particularmente a glicoproteína E) com açúcares da superfície celular (glicosaminoglicanas, como proteoglicanos sulfatados) – o que permite o acúmulo de partículas virais suficientes para deflagrar a interação com receptores primários (Perera-Lecoin, Meertens et al. 2013).

Uma das famílias de PRRs são os receptores tipo Toll (TLR). Em humanos, são caracterizados 10 tipos de TLRs e suas vias de sinalização são reguladas por moléculas adaptadoras intracelulares, tais como MyD88, MAL, TRIF, TRAM e SARM (O'Neill 2007). A maioria dos TLRs, com exceção do TLR3, sinaliza via MyD88, iniciando a ativação de uma série de quinases e outras proteínas que culminam na ativação do fator de transcrição NF- κ B. Outros adaptadores como os membros da família de fatores de transcrição IRF (fator regulador de IFN), particularmente os IRFs 1, 3, 5 e 7 são ativados pelas vias de MyD88 ou de TRIF e são cruciais para produção de IFN tipo I (Fig. 2).

Figura 2: Receptores tipo Toll (TLRs) e suas vias de sinalização.

Representação esquemática dos TLRs extracelulares e intracelulares, com suas respectivas moléculas adaptadoras e vias de sinalização. Modificado de: Luke A. J. O'Neill, 2013.

No sistema nervoso, a ativação de TLRs pode contribuir no processo de neuroinflamação e neurodegeneração de patologias como infecções, derrame e doenças neurodegenerativas. O TLR7 é capaz de regular a resposta imune inata a retrovírus e na infecção por WNV do sistema nervoso central, enquanto o TLR9 favorece a infecção por vírus herpes simplex no cérebro (Sørensen, Reinert et al. 2008, Welte, Reagan et al. 2009).

No ambiente uterino, as células epiteliais expressam de TLR1 a TLR9 e produzem grandes quantidades de IL-6 e IL-8, que auxiliam na imunovigilância e também atuam no relaxamento do colo de útero durante o trabalho de parto. Já os trofoblastos primários de primeiro trimestre expressam como TLRs funcionais TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, e TLR9, o que sugere que estes podem ter um papel na inflamação precoce da placenta (Tangerås, Stødle et al. 2014). A ativação via TLR2, por exemplo, é capaz de promover apoptose dos trofoblastos, agindo como vigilante nas infecções bacterianas intrauterinas e nas complicações da gestação como a restrição de crescimento intrauterino (Abrahams, Bole-Aldo et al. 2004, Huppertz, Kadyrov et al. 2006). De maneira similar, o reconhecimento de ssRNA viral por TLR8 induz a resposta de IFN tipo I nos trofoblastos de primeiro trimestre de gestação, o que promove um processo inflamatório que culmina em sua apoptose (Aldo, Mulla et al. 2010). Ainda, as HBCs, através ativação de TLR3 e TLR4, também contribuem para a inflamação deste microambiente (Young, Tang et al. 2015).

Além da indução de inflamação, os TLRs podem regular a fisiologia placentária por outros mecanismos. Por exemplo, o lipopolissacáride (LPS) bacteriano, um agonista de TLR4, é também um ativador de autofagia. A autofagia consiste em um mecanismo importante para a degradação e reciclagem de componentes celulares (por exemplo, proteínas, organelas, mas também patógenos intracelulares) em compartimentos lisossomais, exercendo atividade homeostática e antimicrobiana. No entanto, tem sido relatado que alguns arbovírus são capazes de subverter o processo de autofagia para facilitar sua replicação (Lee and Gao 2008, Krejbich-Trotot, Gay et al. 2011, Li, Liang et al. 2012). No caso de DENV, o principal mecanismo que o vírus induz a autofagia é pela ativação de mecanismo de stress do retículo endoplasmático (ER), que promove o aumento na formação de autofagossomos, e, como consequência, aumento na produção e maturação das partículas virais (Datan, Roy et al. 2016). Na infecção por ZIKV, foi evidenciado em células placentárias que a inibição farmacológica do processo de autofagia é capaz de limitar a transmissão viral vertical em modelo murino (Cao, Parnell et al. 2017), o que ressalta a importância deste mecanismo na patogênese da infecção.

Infecções virais na placenta podem alterar a resposta a outros microorganismos, e, desta forma, aumentar o risco de nascimento pré-termo pela indução de uma resposta inflamatória (Mor 2016). Neste sentido, a administração de fármacos anti-inflamatórios associados a antibióticos pode ser uma opção terapêutica viável para prevenir nascimentos pré-termo e alterações fetais em mulheres com risco de inflamação intrauterina (Ng, Ireland et al. 2015). Um exemplo promissor é o antibiótico azitromicina, que pode ser usado de forma segura durante a gestação e seria capaz de diminuir a

replicação viral, protegendo o feto da infecção por ZIKV (Retallack, Di Lullo et al. 2016). Assim, há um interesse crescente em intervenções terapêuticas com alvo no bloqueio da produção de mediadores proinflamatórios e/ou a administração exógena de antiinflamatórios.

A geração de inflamação no ambiente da placenta, seja por disbiose da microbiota, ou por infecções bacterianas ou virais é um fator determinante para o curso da gestação. A inflamação de trofoblastos é capaz de induzir sua apoptose e levar ao nascimento pré termo. Em outros tipos celulares, como as células neuronais, a resposta inflamatória, através da ativação de receptores da imunidade inata, pode potencializar a infecção de flavivirus. Até o momento, não foi avaliado o papel da inflamação provocada por ativação de TLRs em vilos placentários humanos na infecção por ZIKV. O entendimento deste processo é importante não só para evitar o nascimento pré termo, como também para atenuar os efeitos deletérios no desenvolvimento fetal durante a infecção por ZIKV.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- A inflamação induzida por LPS, em explantes de vilos placentários humanos, favorece a replicação de ZIKV, com aumento da atividade enzimática de LDH, clivagem de LC3 e inibição de IRF-3, em conjunto sugerindo que a ativação da via autofágica é um dos mecanismos que promovem replicação viral na resposta ao LPS;

- Os explantes de vilos placentários estimulados com LPS e infectados com ZIKV mostraram uma importante hiperplasia das células de Hofbauer, podendo indicar um nicho replicativo; o tratamento com a naringenina foi eficaz em inibir a replicação viral;

- De maneira translacional, o modelo murino, enfatiza que a inflamação por LPS é capaz de agravar a infecção por ZIKV na gestação, agravando malformações no sistema nervoso central, como a microcefalia fetal.

REFERÊNCIAS*

Abrahams, V. M., P. Bole-Aldo, Y. M. Kim, S. L. Straszewski-Chavez, T. Chaiworapongsa, R. Romero and G. Mor (2004). "Divergent trophoblast responses to bacterial products mediated by TLRs." J Immunol **173**(7): 4286-4296.

Adamski, A., J. Bertolli, C. Castañeda-Orjuela, O. J. Devine, M. A. Johansson, M. A. G. Duarte, S. C. Tinker, S. L. Farr, M. M. M. Reyes, V. T. Tong, O. E. P. Garcia, D. Valencia, D. A. C. Ortiz, M. A. Honein, D. J. Jamieson, M. L. O. Martínez and S. M. Gilboa (2018). "Estimating the numbers of pregnant women infected with Zika virus and infants with congenital microcephaly in Colombia, 2015-2017." J Infect.

Aldo, P. B., M. J. Mulla, R. Romero, G. Mor and V. M. Abrahams (2010). "Viral ssRNA induces first trimester trophoblast apoptosis through an inflammatory mechanism." Am J Reprod Immunol **64**(1): 27-37.

Baldwin, E. A., M. Walther-Antonio, A. M. MacLean, D. M. Gohl, K. B. Beckman, J. Chen, B. White, D. J. Creedon and N. Chia (2015). "Persistent microbial dysbiosis in preterm premature rupture of membranes from onset until delivery." PeerJ **3**: e1398.

Barboza, R., F. A. Lima, A. S. Reis, O. J. Murillo, E. P. M. Peixoto, C. L. Bandeira, W. L. Fotoran, L. R. Sardinha, G. Wunderlich, E. Bevilacqua, M. R. D. Lima, J. M. Alvarez, F. T. M. Costa, L. A. Gonçalves, S. Epiphany and C. R. F. Marinho (2017). "TLR4-Mediated Placental Pathology and Pregnancy Outcome in Experimental Malaria." Sci Rep **7**(1): 8623.

Bayer, A., N. J. Lennemann, Y. Ouyang, J. C. Bramley, S. Morosky, E. T. Marques, S. Cherry, Y. Sadovsky and C. B. Coyne (2016). "Type III Interferons Produced by Human Placental Trophoblasts Confer Protection against Zika Virus Infection." Cell Host Microbe **19**(5): 705-712.

Briant, L., P. Desprès, V. Choumet and D. Missé (2014). "Role of skin immune cells on the host susceptibility to mosquito-borne viruses." Virology **464-465**: 26-32.

Cao, B., L. A. Parnell, M. S. Diamond and I. U. Mysorekar (2017). "Inhibition of autophagy limits vertical transmission of Zika virus in pregnant mice." J Exp Med **214**(8): 2303-2313.

Carod-Artal, F. J. (2016). "[Epidemiology and neurological complications of infection by the Zika virus: a new emerging neurotropic virus. Reply]." Rev Neurol **63**(3): 143-144.

Chan, J. F., G. K. Choi, C. C. Yip, V. C. Cheng and K. Y. Yuen (2016). "Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease." J Infect **72**(5): 507-524.

Chen, Y. C., S. Y. Wang and C. C. King (1999). "Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism." J Virol **73**(4): 2650-2657.

Cheng, J. C., H. M. Chang and P. C. K. Leung (2017). "TGF- β 1 Inhibits Human Trophoblast Cell Invasion by Upregulating Connective Tissue Growth Factor Expression." Endocrinology **158**(10): 3620-3628.

Cugola, F. R., I. R. Fernandes, F. B. Russo, B. C. Freitas, J. L. Dias, K. P. Guimarães, C. Benazzato, N. Almeida, G. C. Pignatari, S. Romero, C. M. Polonio, I. Cunha, C. L. Freitas, W. N. Brandão, C. Rossato, D. G. Andrade, D. e. P. Faria, A. T. Garcez, C. A. Buchpigel, C. T. Braconi, E. Mendes, A. A. Sall, P. M. Zanotto, J. P. Peron, A. R. Muotri and P. C. Beltrão-Braga (2016). "The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models." Nature **534**(7606): 267-271.

Dang, J., S. K. Tiwari, G. Lichinchi, Y. Qin, V. S. Patil, A. M. Eroshkin and T. M. Rana (2016). "Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3." Cell Stem Cell **19**(2): 258-265.

Datan, E., S. G. Roy, G. Germain, N. Zali, J. E. McLean, G. Golshan, S. Harbajan, R. A. Lockshin and Z. Zakeri (2016). "Dengue-induced autophagy, virus replication and protection from cell death require ER stress (PERK) pathway activation." Cell Death Dis **7**: e2127.

de Brito, C. A., A. L. Goldoni and M. N. Sato (2009). "Immune adjuvants in early life: targeting the innate immune system to overcome impaired adaptive response." Immunotherapy **1**(5): 883-895.

Deeks, S. G., S. R. Lewin and D. V. Havlir (2013). "The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease." Lancet **382**(9903): 1525-1533.

DICK, G. W., S. F. KITCHEN and A. J. HADDOW (1952). "Zika virus. I. Isolations and serological specificity." Trans R Soc Trop Med Hyg **46**(5): 509-520.

Epelboin, Y., S. Talaga, L. Epelboin and I. Dusfour (2017). "Zika virus: An updated review of competent or naturally infected mosquitoes." PLoS Negl Trop Dis **11**(11): e0005933.

Faria, N. R., R. D. S. D. Azevedo, M. U. G. Kraemer, R. Souza, M. S. Cunha, S. C. Hill, J. Thézé, M. B. Bonsall, T. A. Bowden, I. Rissanen, I. M. Rocco, J. S. Nogueira, A. Y. Maeda, F. G. D. S. Vasami, F. L. L. Macedo, A. Suzuki, S. G. Rodrigues, A. C. R. Cruz, B. T. Nunes, D. B. A. Medeiros, D. S. G. Rodrigues, A. L. N. Queiroz, E. V. P. da Silva, D. F. Henriques, E. S. T. da Rosa, C. S. de Oliveira, L. C. Martins, H. B. Vasconcelos, L. M. N. Casseb, D. B. Simith, J. P. Messina, L. Abade, J. Lourenço, L. C. J. Alcantara, M. M. de Lima, M. Giovanetti, S. I. Hay, R. S. de Oliveira, P. D. S. Lemos, L. F. de Oliveira, C. P. S. de Lima, S. P. da Silva, J. M. de Vasconcelos, L. Franco, J. F. Cardoso, J. L. D. S. Vianez-Júnior, D. Mir, G. Bello, E. Delatorre, K. Khan, M. Creatore, G. E. Coelho, W. K. de Oliveira, R. Tesh, O. G. Pybus, M. R. T. Nunes and P. F. C. Vasconcelos (2016). "Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings." Science **352**(6283): 345-349.

Frabasile, S., A. C. Koishi, D. Kuczera, G. F. Silveira, W. A. Verri, C. N. Duarte Dos Santos and J. Bordinon (2017). "The citrus flavanone naringenin impairs dengue virus replication in human cells." Sci Rep **7**: 41864.

Grischott, F., M. Puhan, C. Hatz and P. Schlagenhauf (2016). "Non-vector-borne transmission of Zika virus: A systematic review." Travel Med Infect Dis **14**(4): 313-330.

Hamel, R., O. Dejarnac, S. Wichit, P. Ekchariyawat, A. Neyret, N. Luplertlop, M. Perera-Lecoin, P. Surasombatpattana, L. Talignani, F. Thomas, V. M. Cao-

Lormeau, V. Choumet, L. Briant, P. Desprès, A. Amara, H. Yssel and D. Missé (2015). "Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells." J Virol **89**(17): 8880-8896.

Hanners, N. W., J. L. Eitson, N. Usui, R. B. Richardson, E. M. Wexler, G. Konopka and J. W. Schoggins (2016). "Western Zika Virus in Human Fetal Neural Progenitors Persists Long Term with Partial Cytopathic and Limited Immunogenic Effects." Cell Rep **15**(11): 2315-2322.

Hills, S. L., K. Russell, M. Hennessey, C. Williams, A. M. Oster, M. Fischer and P. Mead (2016). "Transmission of Zika Virus Through Sexual Contact with Travelers to Areas of Ongoing Transmission - Continental United States, 2016." MMWR Morb Mortal Wkly Rep **65**(8): 215-216.

Huppertz, B., M. Kadyrov and J. C. Kingdom (2006). "Apoptosis and its role in the trophoblast." Am J Obstet Gynecol **195**(1): 29-39.

Kameda, T., N. Matsuzaki, K. Sawai, T. Okada, F. Saji, T. Matsuda, T. Hirano, T. Kishimoto and O. Tanizawa (1990). "Production of interleukin-6 by normal human trophoblast." Placenta **11**(3): 205-213.

Kauma, S. W., K. Herman, Y. Wang and S. W. Walsh (1993). "Differential mRNA expression and production of interleukin-6 in placental trophoblast and villous core compartments." Am J Reprod Immunol **30**(2-3): 131-135.

Klema, V. J., R. Padmanabhan and K. H. Choi (2015). "Flaviviral Replication Complex: Coordination between RNA Synthesis and 5'-RNA Capping." Viruses **7**(8): 4640-4656.

Krejbich-Trotot, P., B. Gay, G. Li-Pat-Yuen, J. J. Hoarau, M. C. Jaffar-Bandjee, L. Briant, P. Gasque and M. Denizot (2011). "Chikungunya triggers an autophagic process which promotes viral replication." Virology **8**: 432.

Kuss, S. K., G. T. Best, C. A. Etheredge, A. J. Pruijssers, J. M. Frierson, L. V. Hooper, T. S. Dermody and J. K. Pfeiffer (2011). "Intestinal microbiota promote enteric virus replication and systemic pathogenesis." Science **334**(6053): 249-252.

Köstlin, N., K. Hofstädter, A. L. Ostermeir, B. Spring, A. Leiber, S. Haen, H. Abele, P. Bauer, J. Pollheimer, D. Hartl, C. F. Poets and C. Gille (2016). "Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Accumulate in Human Placenta and Polarize toward a Th2 Phenotype." J Immunol **196**(3): 1132-1145.

Lappas, M. (2014). "GSK3 β is increased in adipose tissue and skeletal muscle from women with gestational diabetes where it regulates the inflammatory response." PLoS One **9**(12): e115854.

Lazear, H. M., E. M. Stringer and A. M. de Silva (2016). "The Emerging Zika Virus Epidemic in the Americas: Research Priorities." JAMA **315**(18): 1945-1946.

Lee, J. A. and F. B. Gao (2008). "Regulation of Abeta pathology by beclin 1: a protective role for autophagy?" J Clin Invest **118**(6): 2015-2018.

Li, H., L. Saucedo-Cuevas, S. Shresta and J. G. Gleeson (2016). "The Neurobiology of Zika Virus." Neuron **92**(5): 949-958.

Li, J. K., J. J. Liang, C. L. Liao and Y. L. Lin (2012). "Autophagy is involved in the early step of Japanese encephalitis virus infection." Microbes Infect **14**(2): 159-168.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method." Methods **25**(4): 402-408.

Lulu, S. S., A. Thabitha, S. Vino, A. M. Priya and M. Rout (2016). "Naringenin and quercetin--potential anti-HCV agents for NS2 protease targets." Nat Prod Res **30**(4): 464-468.

Martinot, A. J., P. Abbink, O. Afacan, A. K. Prohl, R. Bronson, J. L. Hecht, E. N. Borducchi, R. A. Larocca, R. L. Peterson, W. Rinaldi, M. Ferguson, P. J. Didier, D. Weiss, M. G. Lewis, R. A. De La Barrera, E. Yang, S. K. Warfield and D. H. Barouch (2018). "Fetal Neuropathology in Zika Virus-Infected Pregnant Female Rhesus Monkeys." Cell.

Medina, F. A., G. Torres, J. Acevedo, S. Fonseca, L. Casiano, C. M. De León-Rodríguez, G. A. Santiago, K. Doyle, T. M. Sharp, L. I. Alvarado, G. Paz-Bailey and J. L. Muñoz-Jordán (2018). "Duration of Infectious Zika Virus in Semen and Serum." J Infect Dis.

Miner, J. J., B. Cao, J. Govero, A. M. Smith, E. Fernandez, O. H. Cabrera, C. Garber, M. Noll, R. S. Klein, K. K. Noguchi, I. U. Mysorekar and M. S. Diamond (2016). "Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise." Cell **165**(5): 1081-1091.

Mocarski, E. S. (2002). "Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion." Trends Microbiol **10**(7): 332-339.

Mor, G. (2016). "Placental Inflammatory Response to Zika Virus may Affect Fetal Brain Development." Am J Reprod Immunol **75**(4): 421-422.

Musso, D. (2015). "Zika Virus Transmission from French Polynesia to Brazil." Emerg Infect Dis **21**(10): 1887.

Ng, P. Y., D. J. Ireland and J. A. Keelan (2015). "Drugs to block cytokine signaling for the prevention and treatment of inflammation-induced preterm birth." Front Immunol **6**: 166.

O'Keeffe, G. W. (2017). "A new role for placental IL-6 signalling in determining neurodevelopmental outcome." Brain Behav Immun **62**: 9-10.

O'Neill, L. A. (2007). "TAMpering with toll-like receptor signaling." Cell **131**(6): 1039-1041.

Oehler, E., L. Watrin, P. Larre, I. Leparç-Goffart, S. Lastere, F. Valour, L. Baudouin, H. Mallet, D. Musso and F. Ghawche (2014). "Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013." Euro Surveill **19**(9).

Oliveira, E. R. A., R. Mohana-Borges, R. B. de Alencastro and B. A. C. Horta (2017). "The flavivirus capsid protein: Structure, function and perspectives towards drug design." Virus Res **227**: 115-123.

Papa, M. P., L. M. Meuren, S. V. A. Coelho, C. G. O. Lucas, Y. M. Mustafá, F. Lemos Matassoli, P. P. Silveira, P. S. Frost, P. Pezzuto, M. R. Ribeiro, A.

Tanuri, M. L. Nogueira, L. Campanati, M. T. Bozza, H. A. Paula Neto, P. M. Pimentel-Coelho, C. P. Figueiredo, R. S. de Aguiar and L. B. de Arruda (2017). "Zika Virus Infects, Activates, and Crosses Brain Microvascular Endothelial Cells, without Barrier Disruption." Front Microbiol **8**: 2557.

Perera-Lecoin, M., L. Meertens, X. Carnec and A. Amara (2013). "Flavivirus entry receptors: an update." Viruses **6**(1): 69-88.

Pingen, M., S. R. Bryden, E. Pondeville, E. Schnettler, A. Kohl, A. Merits, J. K. Fazakerley, G. J. Graham and C. S. McKimmie (2016). "Host Inflammatory Response to Mosquito Bites Enhances the Severity of Arbovirus Infection." Immunity **44**(6): 1455-1469.

Pérez Leirós, C. and R. Ramhorst (2013). "Tolerance induction at the early maternal-placental interface through selective cell recruitment and targeting by immune polypeptides." Am J Reprod Immunol **69**(4): 359-368.

Quicke, K. M., J. R. Bowen, E. L. Johnson, C. E. McDonald, H. Ma, J. T. O'Neal, A. Rajakumar, J. Wrammert, B. H. Rimawi, B. Pulendran, R. F. Schinazi, R. Chakraborty and M. S. Suthar (2016). "Zika Virus Infects Human Placental Macrophages." Cell Host Microbe **20**(1): 83-90.

Retallack, H., E. Di Lullo, C. Arias, K. A. Knopp, M. T. Laurie, C. Sandoval-Espinosa, W. R. Mancía Leon, R. Krencik, E. M. Ullian, J. Spatazza, A. A. Pollen, C. Mandel-Brehm, T. J. Nowakowski, A. R. Kriegstein and J. L. DeRisi (2016). "Zika virus cell tropism in the developing human brain and inhibition by azithromycin." Proc Natl Acad Sci U S A **113**(50): 14408-14413.

Rigato, P. O., A. E. Fusaro, J. R. Victor and M. N. Sato (2009). "Maternal immunization to modulate the development of allergic response and pathogen infections." Immunotherapy **1**(1): 141-156.

Rizzo, R., L. Melchiorri, M. Stignani and O. R. Baricordi (2007). "HLA-G expression is a fundamental prerequisite to pregnancy." Hum Immunol **68**(4): 244-250.

Robinson, C. M., P. R. Jesudhasan and J. K. Pfeiffer (2014). "Bacterial lipopolysaccharide binding enhances virion stability and promotes environmental fitness of an enteric virus." Cell Host Microbe **15**(1): 36-46.

Roby, J. A., Y. X. Setoh, R. A. Hall and A. A. Khromykh (2015). "Post-translational regulation and modifications of flavivirus structural proteins." J Gen Virol **96**(Pt 7): 1551-1569.

Rosenberg, A. Z., W. Yu, D. A. Hill, C. A. Reyes and D. A. Schwartz (2017). "Placental Pathology of Zika Virus: Viral Infection of the Placenta Induces Villous Stromal Macrophage (Hofbauer Cell) Proliferation and Hyperplasia." Arch Pathol Lab Med **141**(1): 43-48.

Sato, M. N. (2012). "Maternal antibodies as an immunotherapeutic strategy in the newborn." Immunotherapy **4**(7): 659-662.

Schwartz, D. A. (2017). "Autopsy and Postmortem Studies Are Concordant: Pathology of Zika Virus Infection Is Neurotropic in Fetuses and Infants With Microcephaly Following Transplacental Transmission." Arch Pathol Lab Med **141**(1): 68-72.

Selkov, S. A., A. V. Selutin, O. M. Pavlova, N. N. Khromov-Borisov and O. V. Pavlov (2013). "Comparative phenotypic characterization of human cord blood monocytes and placental macrophages at term." Placenta **34**(9): 836-839.

Shimoya, K., A. Moriyama, N. Matsuzaki, I. Ogata, M. Koyama, C. Azuma, F. Saji and Y. Murata (1999). "Human placental cells show enhanced production of interleukin (IL)-8 in response to lipopolysaccharide (LPS), IL-1 and tumour necrosis factor (TNF)-alpha, but not to IL-6." Mol Hum Reprod **5**(9): 885.

Simoni, M. K., K. A. Jurado, V. M. Abrahams, E. Fikrig and S. Guller (2017). "Zika virus infection of Hofbauer cells." Am J Reprod Immunol **77**(2).

Spector, S. A. (2001). "Mother-to-infant transmission of HIV-1: the placenta fights back." J Clin Invest **107**(3): 267-269.

Straley, M. E., K. L. Togher, A. M. Nolan, L. C. Kenny and G. W. O'Keeffe (2014). "LPS alters placental inflammatory and endocrine mediators and inhibits fetal neurite growth in affected offspring during late gestation." Placenta **35**(8): 533-538.

Sul, O. J., H. J. Park, H. J. Son and H. S. Choi (2017). "Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Autophagy Is Responsible for Enhanced Osteoclastogenesis." Mol Cells **40**(11): 880-887.

Svensson-Arvelund, J., R. B. Mehta, R. Lindau, E. Mirrasekhian, H. Rodriguez-Martinez, G. Berg, G. E. Lash, M. C. Jenmalm and J. Ernerudh (2015). "The human fetal placenta promotes tolerance against the semiallogeneic fetus by inducing regulatory T cells and homeostatic M2 macrophages." J Immunol **194**(4): 1534-1544.

Szaba, F. M., M. Tighe, L. W. Kummer, K. G. Lanzer, J. M. Ward, P. Lanthier, I. J. Kim, A. Kuki, M. A. Blackman, S. J. Thomas and J. S. Lin (2018). "Zika virus infection in immunocompetent pregnant mice causes fetal damage and placental pathology in the absence of fetal infection." PLoS Pathog **14**(4): e1006994.

Sørensen, L. N., L. S. Reinert, L. Malmgaard, C. Bartholdy, A. R. Thomsen and S. R. Paludan (2008). "TLR2 and TLR9 synergistically control herpes simplex virus infection in the brain." J Immunol **181**(12): 8604-8612.

Tabata, T., M. Petitt, J. Fang-Hoover, M. Zydek and L. Pereira (2016). "Persistent Cytomegalovirus Infection in Amniotic Membranes of the Human Placenta." Am J Pathol **186**(11): 2970-2986.

Takahashi, H., T. Takizawa, S. Matsubara, A. Ohkuchi, T. Kuwata, R. Usui, H. Matsumoto, Y. Sato, H. Fujiwara, A. Okamoto and M. Suzuki (2014). "Extravillous trophoblast cell invasion is promoted by the CD44-hyaluronic acid interaction." Placenta **35**(3): 163-170.

Tang, B. L. (2016). "Zika virus as a causative agent for primary microencephaly: the evidence so far." Arch Microbiol **198**(7): 595-601.

Tangerås, L. H., G. S. Stødle, G. D. Olsen, A. H. Leknes, A. S. Gundersen, B. Skei, A. J. Vikdal, L. Ryan, B. Steinkjer, M. F. Myklebost, M. Langaas, R. Austgulen and A. C. Iversen (2014). "Functional Toll-like receptors in primary first-trimester trophoblasts." J Reprod Immunol **106**: 89-99.

Venturi, G., L. Zammarchi, C. Fortuna, M. E. Remoli, E. Benedetti, C. Fiorentini, M. Trotta, C. Rizzo, A. Mantella, G. Rezza and A. Bartoloni (2016). "An

autochthonous case of Zika due to possible sexual transmission, Florence, Italy, 2014." Euro Surveill **21**(8): 30148.

Wang, J., X. Feng, Y. Zeng, J. Fan, J. Wu, Z. Li, X. Liu, R. Huang, F. Huang, X. Yu and X. Yang (2013). "Lipopolysaccharide (LPS)-induced autophagy is involved in the restriction of Escherichia coli in peritoneal mesothelial cells." BMC Microbiol **13**: 255.

Welte, T., K. Reagan, H. Fang, C. Machain-Williams, X. Zheng, N. Mendell, G. J. Chang, P. Wu, C. D. Blair and T. Wang (2009). "Toll-like receptor 7-induced immune response to cutaneous West Nile virus infection." J Gen Virol **90**(Pt 11): 2660-2668.

Young, O. M., Z. Tang, T. Niven-Fairchild, S. Tadesse, G. Krikun, E. R. Norwitz, G. Mor, V. M. Abrahams and S. Guller (2015). "Toll-like receptor-mediated responses by placental Hofbauer cells (HBCs): a potential pro-inflammatory role for fetal M2 macrophages." Am J Reprod Immunol **73**(1): 22-35.

Zhang, X. L., N. Topley, T. Ito and A. Phillips (2005). "Interleukin-6 regulation of transforming growth factor (TGF)-beta receptor compartmentalization and turnover enhances TGF-beta1 signaling." J Biol Chem **280**(13): 12239-12245.

Zhang, Z. W., Z. L. Li and S. Yuan (2016). "The Role of Secretory Autophagy in Zika Virus Transfer through the Placental Barrier." Front Cell Infect Microbiol **6**: 206.

Zimmerman, M. G., K. M. Quicke, J. T. O'Neal, N. Arora, D. Machiah, L. Priyamvada, R. C. Kauffman, E. Register, O. Adekunle, D. Swieboda, E. L. Johnson, S. Cordes, L. Haddad, R. Chakraborty, C. B. Coyne, J. Wrammert and

M. S. Suthar (2018). "Cross-Reactive Dengue Virus Antibodies Augment Zika Virus Infection of Human Placental Macrophages." Cell Host Microbe **24**(5): 731-742.e736.