

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 16/08/2021.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO
DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Caroline Nunes Silveira

**Avaliação da estabilidade do RNA viral do ZIKA vírus em
diferentes compartimentos biológicos**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestra em Pesquisa e
Desenvolvimento (Biotecnologia Médica)

Orientadora: Profa. Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto
Coorientador: Dr. Leonardo Nazário de Moraes

**Botucatu
2019**

Caroline Nunes Silveira

Avaliação da estabilidade do RNA viral do ZIKA vírus
em diferentes compartimentos biológicos

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestra em Pesquisa e Desenvolvimento
(Biotecnologia Médica).

Orientadora: Profa. Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto
Coorientador: Dr. Leonardo Nazário de Moraes

Botucatu
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Nunes, Caroline.

Avaliação da estabilidade do RNA viral do ZIKA vírus em diferentes compartimentos biológicos / Caroline Nunes. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Rejane Maria Tommasini Grotto

Coorientador: Leonardo Nazário de Moraes

Capes: 20202008

1. Vírus da Zika. 2. Plasma rico em plaquetas. 3. Vírus de RNA. 4. Flavivírus. 5. Reação em cadeia da polimerase.

Palavras-chave: Plaquetas; Vírus Zika ; qPCR.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho....

Aos meus pais, Renilson e Damaris, e minha família que com muito carinho e apoio me ajudaram para que essa etapa da minha vida fosse concluída. Obrigada a todos!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela ajuda durante todos os caminhos percorridos até aqui, sem Deus nada seria possível.

Meus pais e minha família.

Aos amigos do laboratório de biologia molecular do hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu, por todos abraços, conselhos e incentivos recebidos durante essa etapa da minha vida, essas amizades levarei para sempre.

A minha orientadora Rejane e ao meu coorientador Leonardo obrigada pela ajuda, pelo conhecimento compartilhado, paciência e compreensão durante esse período em que passamos juntos.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 17/07711-0) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

EPÍGRAFE

**“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”**

Albert Einstein

RESUMO

O vírus Zika pertence a família **Flaviviridae**, gênero *Flavivirus* e tem seu genoma viral constituído de uma molécula de RNA de fita simples de polaridade positiva, com aproximadamente 10.700 pb. As interações de *Flavivirus* com compartimentos biológicos como as plaquetas foram relatadas pela literatura, sendo demonstrado que o vírus é carregado para outros tecidos e sua viabilidade é mantida por um maior tempo, no entanto, este tipo de estudo ainda não foi reportado para o ZIKV. O objetivo deste trabalho foi comparar a carga viral do vírus Zika entre o plasma rico em plaquetas (PRP) e o plasma pobre em plaquetas (PPP). As amostras utilizadas foram coletadas de doadores saudáveis e posteriormente incubadas com o vírus ZIKA à 37°C na presença de CO₂ durante 12 dias consecutivos, sendo retiradas alíquotas no momento do preparo e após 2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias de incubação. Os resultados demonstraram que a carga viral no PRP foi estatisticamente superior a do PPP depois de 12 dias de incubação com o vírus, sugerindo que as plaquetas podem carrear e preservar o vírus durante maior tempo comparado ao plasma isento de plaquetas.

ABSTRACT

The Zika virus belongs to the **Flaviviridae family**, *Flavivirus* genus, and the viral genome consists of the molecule single-stranded, positive-sense RNA of approximately 10,700 bp. The interaction of Flavivirus with biological compartments such as platelets has been reported in the literature, and have shown that the virus is carried to other tissues and its viability is maintained for a longer time. However, this kind of evaluation was not reported for ZIKV yet. The aim of this study was to compare the viral load of Zika virus between platelet rich plasma (PRP) and platelet poor plasma (PPP). The samples were collected from healthy donors and subsequently incubated with ZIKA virus at 37 ° C with CO₂ atmosphere for 12 consecutive days. Aliquots were evaluated at the zero time and after 2, 4, 6, 8, 10 and 12 days of incubation Results showed that the viral load in PRP is statistically higher than in PPP after 12 days of incubation with the virus, suggesting that platelets can carry and preserve the virus longer than in platelet-free plasma.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	09
1.1 Aspectos epidemiológicos do Zika vírus (zikh)	09
1.2 Vírus Zika	10
1.3 Tropismo Viral e Receptores.....	12
1.4 Vias de transmissão.....	13
1.5 Testes Diagnósticos	14
1.6 Complicações decorrentes da infecção pelo ZIKV.....	14
1.7 Compartimento biológico para ZIKV: as plaquetas	15
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo geral	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1. Amostras Biológicas	15
3.2. Amostra de zikh.....	16
3.3. Obtenção de plasma rico e pobre em plaquetas.....	16
3.4. Viabilidade das plaquetas em cultura após 0 a 09 dias	16
3.4.1. Contagem de Plaquetas	16
3.4.2. Viabilidade de plaquetas após 0 a 14 dias de incubação.....	17
3.4.3. Análise de fosfatidilserina por citometria de fluxo	18
3.4.4. Esfregaço do plasma.....	18
3.5. Experimento para avaliação da degradação do RNA viral.....	18
3.5.1. Incubação com o Vírus.....	18
3.5.2. Extração de RNA.....	18
3.5.3. Transcrição Reversa	19
3.5.4. PCR em Tempo Real	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 Contagem de Plaquetas	20
4.2 Esfregaços Plasmáticos	21
4.3 Análise de fosfatidilserina por citometria de fluxo	23
4.4 PCR em Tempo Real (qPCR) precedida de Transcrição Reversa para detecção do ZIKV depois da incubação plaquetas-vírus.	26
5. CONCLUSÃO	29
6. REFERÊNCIAS	30

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos epidemiológicos do Zika vírus (ZIKV)

O Zika Vírus (ZIKV) foi relatado pela primeira vez em macaco Rhesus em abril de 1947 na Floresta Zika, na África. Durante um estudo sobre a observação da presença do vírus da febre amarela em macacos na floresta Zika, a fim de implantar o programa “Macaco Rhesus Sentinela”, sendo que o programa foi inicialmente implantado no ano de 1946 na cidade de Bwamba localizada em Uganda, África (1,2).

Nesse estudo os macacos eram mantidos em gaiolas e a sua temperatura corporal monitorada diariamente. Durante esse processo foi observado um aumento da temperatura corporal de um dos macacos, sem a presença de outros sintomas. A fim de descobrir o que havia gerado o aumento da temperatura corporal, os pesquisadores coletaram uma amostra de sangue do macaco três dias após o surgimento do sintoma, para a realização de testes laboratoriais (1,2). Após processamento inicial da amostra o soro foi inoculado em ratos via intraperitoneal e intracerebral, e em outro macaco Rhesus via subcutânea. Os ratos inoculados intracerebral apresentaram sinais de doença no 10º dia pós inoculação, e os inoculados via intraperitoneal e, o macaco não apresentaram manifestações. O vírus foi isolado dos cérebros dos ratos com sintomas, e se observou a presença de um vírus até então não descrito (1,2).

Em outro estudo sobre a febre amarela, no ano de 1948 foi relatada a presença do ZIKV, em mosquitos *Aedes africanus* (1,2), e posteriormente em *Aedes luteocephalus* e *Aedes aegypti* (3,4).

Em humanos o primeiro isolado do vírus ocorreu na Nigéria no ano de 1954 (2,5). Em 1963 no continente Asiático foram relatados casos na Tailândia, Federação da Malásia e Vietnã do Norte (6). Seguido de relatos na Malásia em 1969, e a presença em mosquitos em 1977 na Indonésia (3,7).

Entretanto em 2007 nas ilhas Yap na Micronésia ocorreu o primeiro surto da infecção fora dos continentes Africanos e Asiáticos. Durante o surto demonstrou-se que o mosquito *Aedes hensilli* foi o transmissor do vírus, sendo o vetor encontrado em maior quantidade na ilha e, este havia sido associado com a transmissão do vírus Dengue (8,9).

Casos também foram relatados em Camboja no ano de 2010 (10), nas Filipinas em 2012 (11) e na Tailândia de 2012 à 2014 (12). Em 2013 e 2014 na Polinésia Francesa houve registros de 5.895 pacientes com suspeita de infecção pelo ZIKV em alguns centros de atendimento, mas uma estimativa de que ocorreram 19.000 casos (7,13,14). Os primeiros relatos do vírus nas américas ocorreram em Nova Caledônia, nas Ilhas Cook e na Ilha de Páscoa em 2014 (15-18).

Estima-se que o vírus chegou ao território brasileiro no ano de 2014, com a apresentação dos primeiros casos de infecção em 2015 na cidade de Natal, Rio Grande do Norte (19,20).

1.2 Vírus Zika

O ZIKV pertencente à família **Flaviviridae**, gênero *Flavivirus*, possui genoma viral constituído de uma molécula de RNA de fita simples de polaridade positiva, com aproximadamente 10.700 pb (21), material genético é envolto por uma membrana lipídica denominada de envelope viral e por um capsídeo proteico. Essas estruturas estão presentes em outros vírus pertencentes a esta família, como os vírus da Dengue, Febre amarela e Febre do Oeste do Nilo. O RNA do ZIKV é traduzido em uma única poliproteína que se divide em três proteínas estruturais, sendo elas: C (capsídeo), prM/M (pré membrana) e E (envelope); e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (22).

As funções de cada proteína mencionada são: Proteína E: proteína da superfície viral responsável por interagir com a membrana do hospedeiro, fazendo com que ocorra a interação vírus-membrana celular; Proteína M: fragmento da proteína prM é importante na maturação viral quando está na forma infecciosa; Proteína C: responsável pela formação de uma Riboproteína, e também pode contribuir na montagem dos vírions (forma viral infecciosa) e as proteínas não estruturais que estão associadas a replicação viral (23).

A primeira variante do vírus isolado em Uganda na África (MR 766) foi sequenciada em 2007 (21). Depois ocorreram o sequenciamento de outras linhagens como as encontradas na República Centro Africana, Senegal, Nigéria, Micronésia, Malásia, Camboja, entre outras.

No Brasil segundo estudos, foram identificadas 11 variantes do ZIKV são elas: ZKV/2015, BeH828305/2015, Rio-U1/2016, BeH819966/2015, SSABR1/2015, BeH818995/2015, BeH815744/2015, BeH819015/2015, BeH823339/2015, Rio-S1/2016 e Natal RGN/2015, como demonstrado na figura 1 (24).

Um estudo de filogenia demonstrou que existem grandes diferenças entre as linhagens Asiáticas e Africanas, formando dois grupos. Estudos demonstraram que existe uma maior prevalência da linhagem Asiática nos surtos relatados (8, 25, 26), sendo também a linhagem relacionada com os surtos recentes (27, 28).

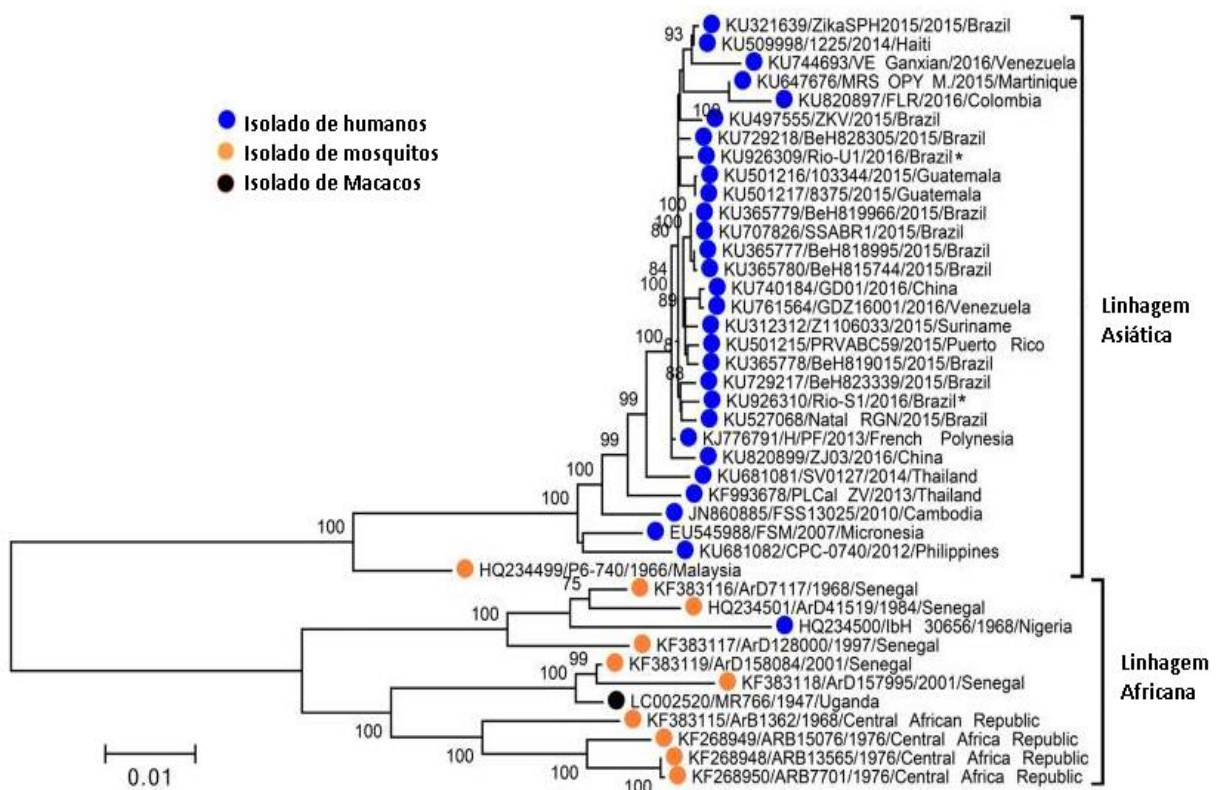


Figura 1. Linhagens do ZIKV identificadas. Os pontos em azul, laranja e preto correspondem a linhagens encontradas em amostras de humanos, mosquitos e macacos respectivamente. Modificada de Wang et al.2016 (24).

6. REFERÊNCIAS

1. Dick GW., Kitchen S., Haddock A. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* . 1952 Sep;46(5):509–20.
2. Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. *Clin Microbiol Rev*. 2016 Jul;29(3):487–524.
3. Marchette NJ, Garcia R, Rudnick A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *Am J Trop Med Hyg*. 1969 May;18(3):411–5.
4. Lee VH, Moore DL. Vectors of the 1969 yellow fever epidemic on the Jos Plateau, Nigeria. *Bull World Health Organ*. 1972;46(5):669–73.
5. Macnamara FN. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1954 Mar;48(2):139–45.
6. Pond WL. Arthropod-borne virus antibodies in sera from residents of south-east asia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1963 Sep;57:364–71.
7. Subissi L, Dub T, Besnard M, Mariteragi-Helle T, Nhan T, Lutringer-Magnin D, et al. Zika Virus Infection during Pregnancy and Effects on Early Childhood Development, French Polynesia, 2013-2016. *Emerg Infect Dis*. 2018 Oct;24(10):1850–8.
8. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis*. 2008 Aug;14(8):1232–9.
9. Duffy MR, Chen T-H, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med*. 2009 Jun;360(24):2536–43.
10. Heang V, Yasuda CY, Sovann L, Haddock AD, Travassos da Rosa AP, Tesh RB, et al. Zika Virus Infection, Cambodia, 2010. *Emerg Infect Dis*. 2012 Feb;18(2):349–51.
11. Alera MT, Hermann L, Tac-An IA, Klungthong C, Rutvisuttinunt W, Manasatienkij W, et al. Zika Virus Infection, Philippines, 2012. *Emerg Infect Dis*. 2015 Apr;21(4):722–4.
12. Buathong R, Hermann L, Thaisomboonsuk B, Rutvisuttinunt W, Klungthong C, Chinnawirotpisan P, et al. Detection of Zika Virus Infection in Thailand, 2012-2014. *Am J Trop Med Hyg*. 2015 Aug;93(2):380–3.

13. Cao-Lormeau V-M, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry A-L, Mallet H-P, et al. Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg Infect Dis.* 2014 Jun;20(6):1084–6.
14. Besnard M, Eyrolle-Guignot D, Guillemette-Artur P, Lastère S, Bost-Bezeaud F, Marcelis L, et al. Congenital cerebral malformations and dysfunction in fetuses and newborns following the 2013 to 2014 Zika virus epidemic in French Polynesia. *Euro Surveill.* 2016 Mar;21(13):30181.
15. Roth A, Mercier A, Lepers C, Hoy D, Duituturaga S, Benyon E, et al. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections - an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012-2014. *Euro Surveill.* 2014 Oct;19(41).
16. Bulletin hebdomadaire international du 5 au 11 mars 2014. N°442.2014. Disponible en <<http://invs.santepubliquefrance.fr//Publications-et-outils/Bulletin-hebdomadaire-international/Tous-les-numeros/2014/Bulletin-hebdomadaire-international-du-5-au-11-mars-2014.-N-442>>.
17. Dupont-Rouzeyrol M, O'Connor O, Calvez E, Daurès M, John M, Grangeon J-P, et al. Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. *Emerg Infect Dis.* 2015 Feb;21(2):381–2.
18. Tognarelli J, Ulloa S, Villagra E, Lagos J, Aguayo C, Fasce R, et al. A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. *Arch Virol.* 2016 Mar;161(3):665–8.
19. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. 2015;
20. Zika virus outbreaks in the Americas. *Relev Epidemiol Hebd.* 2015 Nov;90(45):609–10.
21. Kuno G, Chang G-JJ. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch Virol.* 2007 Apr;152(4):687–96.
22. Bos S, Viranaicken W, Turpin J, El-Kalamouni C, Roche M, Krejbich-Trotot P, et al. The structural proteins of epidemic and historical strains of Zika virus differ in their ability to initiate viral infection in human host cells. *Virology.* 2018 Mar;516:265–73.
23. Brand C, Bisailon M, Geiss BJ. Organization of the Flavivirus RNA replicase complex. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2017;8(6).

24. Wang L, Valderramos SG, Wu A, Ouyang S, Li C, Brasil P, et al. From Mosquitos to Humans: Genetic Evolution of Zika Virus. *Cell Host Microbe*. 2016 May 11 ;19(5):561–5.
25. Haddow AD, Schuh AJ, Yasuda CY, Kasper MR, Heang V, Huy R, et al. Genetic Characterization of Zika Virus Strains: Geographic Expansion of the Asian Lineage. Olson KE, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012 Feb;6(2):e1477.
26. Berthet N, Nakouné E, Kamgang B, Selekon B, Descorps-Declère S, Gessain A, et al. Molecular characterization of three Zika flaviviruses obtained from sylvatic mosquitoes in the Central African Republic. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2014 Dec;14(12):862–5.
27. Lessler J, Chaisson LH, Kucirka LM, Bi Q, Grantz K, Salje H, et al. Assessing the global threat from Zika virus. *Science (80-)*. 2016 Aug;353(6300):aaf8160–aaf8160.
28. Lanciotti RS, Lambert AJ, Holodniy M, Saavedra S, Signor LDCC. Phylogeny of Zika Virus in Western Hemisphere, 2015. *Emerg Infect Dis*. 2016 May;22(5):933–5.
29. Lee I, Bos S, Li G, Wang S, Gadea G, Desprès P, et al. Probing Molecular Insights into Zika Virus–Host Interactions. *Viruses* . 2018 May 2 ;10(5):233.
30. Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, et al. Biology of ZIKV Infection in Human Skin Cells. Diamond MS, editor. *J Virol*. 2015 Sep;89(17):8880–96.
31. Tang H, Hammack C, Ogden SC, Wen Z, Qian X, Li Y, et al. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell*. 2016 May;18(5):587–90.
32. Michlmayr D, Andrade P, Gonzalez K, Balmaseda A, Harris E. CD14+CD16+ monocytes are the main target of Zika virus infection in peripheral blood mononuclear cells in a paediatric study in Nicaragua. *Nat Microbiol*. 2017 Nov;2(11):1462–70.
33. Bagasra O, Addanki KC, Goodwin GR, Hughes BW, Pandey P, McLean E. Cellular Targets and Receptor of Sexual Transmission of Zika Virus. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM*. 2017;25(10):679–86.
34. Roach T, Alcendor DJ. Zika virus infection of cellular components of the blood-retinal barriers: implications for viral associated congenital ocular disease. *J Neuroinflammation*. 2017 Dec;14(1):43.

35. Salam AP, Horby P. Isolation of viable Zika virus from spermatozoa. *Lancet Infect Dis.* 2018 Feb;18(2):144.
36. Zhang F, Ren S, Zuo Y. DC-SIGN, DC-SIGNR and LSECtin: C-Type Lectins for Infection. *Int Rev Immunol.* 2014 Jan 24;33(1):54–66.
37. Akkermann R, Aprico A, Perera AA, Bujalka H, Cole AE, Xiao J, et al. The TAM receptor Tyro3 regulates myelination in the central nervous system. *Glia* . 2017 Apr ;65(4):581–91.
38. Su EW, Lin JY, Kane LP. TIM-1 and TIM-3 proteins in immune regulation. *Cytokine.* 2008 Oct ;44(1):9–13.
39. Zayed RA, Omran D, Mokhtar DA, Zakaria Z, Ezzat S, Soliman MA, et al. Association of Toll-Like Receptor 3 and Toll-Like Receptor 9 Single Nucleotide Polymorphisms with Hepatitis C Virus Infection and Hepatic Fibrosis in Egyptian Patients. *Am J Trop Med Hyg.* 2017 Jan 16;96(3):16–0644.
40. Shi H, Gabarin N, Hickey E, Askalan R. TLR-3 receptor activation protects the very immature brain from ischemic injury. *J Neuroinflammation.* 2013 Aug 21 ;10:104.
41. Xu X, Wan H, Nie L, Shao T, Xiang L, Shao J. RIG-I: a multifunctional protein beyond a pattern recognition receptor. *Protein Cell* . 2018 Mar 8 ;9(3):246–53.
42. Kell AM, Gale M. RIG-I in RNA virus recognition. *Virology* . 2015 May ;479–480:110–21.
43. Sadler AJ. The role of MDA5 in the development of autoimmune disease. *J Leukoc Biol* . 2017 Oct 3 ;103(2):jlb.4MR0617-223R.
44. Huen AO, Rook AH. Toll receptor agonist therapy of skin cancer and cutaneous T-cell lymphoma. *Curr Opin Oncol* . 2014 Mar ;26(2):237–44.
45. Hayes EB. Zika Virus Outside Africa. *Emerg Infect Dis.* 2009 Sep ;15(9):1347–50.
46. Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, Honein MA. Zika Virus. Baden LR, editor. *N Engl J Med.* 2016 Apr;374(16):1552–63.
47. Faizan MI, Abdullah M, Ali S, Naqvi IH, Ahmed A, Parveen S. Zika Virus-Induced Microcephaly and Its Possible Molecular Mechanism. *Intervirology.* 2016;59(3):152–8.
48. Sakkas H, Bozidis P, Giannakopoulos X, Sofikitis N, Papadopoulou C. An Update on Sexual Transmission of Zika Virus. *Pathogens.* 2018 Aug;7(3):66.

49. Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K, et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro Surveill.* 2014 Apr;19(14).
50. Barjas-Castro ML, Angerami RN, Cunha MS, Suzuki A, Nogueira JS, Rocco IM, et al. Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. *Transfusion.* 2016 Jul;56(7):1684–8.
51. Cunha MS, Esposito DLA, Rocco IM, Maeda AY, Vasami FGS, Nogueira JS, et al. First Complete Genome Sequence of Zika Virus (Flaviviridae, Flavivirus) from an Autochthonous Transmission in Brazil. *Genome Announc.* 2016 Apr;4(2).
52. Magnus MM, Espósito DLA, Costa VA da, Melo PS de, Costa-Lima C, Fonseca BAL da, et al. Risk of Zika virus transmission by blood donations in Brazil. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2018 Jul;40(3):250–4.
53. Besnard M, Lastere S, Teissier A, Cao-Lormeau V, Musso D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveill.* 2014 Apr;19(13).
54. Chan JFW, Choi GKY, Yip CCY, Cheng VCC, Yuen K-Y. Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease. *J Infect.* 2016 May;72(5):507–24.
55. Mann TZ, Haddad LB, Williams TR, Hills SL, Read JS, Dee DL, et al. Breast milk transmission of flaviviruses in the context of Zika virus: A systematic review. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2018 Jul;32(4):358–68.
56. Blohm GM, Lednicky JA, Márquez M, White SK, Loeb JC, Pacheco CA, et al. Evidence for Mother-to-Child Transmission of Zika Virus Through Breast Milk. *Clin Infect Dis.* 2018 Mar;66(7):1120–1.
57. Zanoluca C, Melo VCA de, Mosimann ALP, Santos GIV dos, Santos CND dos, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015 Jun;110(4):569–72
58. Calvet GA, Santos FB dos, Sequeira PC. Zika virus infection: epidemiology, clinical manifestations and diagnosis. *Curr Opin Infect Dis.* 2016 Oct;29(5):459–66.
59. Gourinat A-C, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M. Detection of Zika Virus in Urine. *Emerg Infect Dis.* 2015 Jan;21(1):84–6.

60. Mansuy JM, Dutertre M, Mengelle C, Fourcade C, Marchou B, Delobel P, et al. Zika virus: high infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen? *Lancet Infect Dis*. 2016 Apr;16(4):405.
61. Mansuy JM, Pasquier C, Daudin M, Chapuy-Regaud S, Moinard N, Chevreau C, et al. Zika virus in semen of a patient returning from a non-epidemic area. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(8):894–5.
62. Musso D, Cao-Lormeau VM, Gubler DJ. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? *Lancet*. 2015 Jul;386(9990):243–4.
63. Kindhauser MK, Allen T, Frank V, Santhana RS, Dye C. Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. *Bull World Health Organ*. 2016 Sep;94(9):675-686C.
64. Heukelbach J, Alencar CH, Kelvin AA, De Oliveira WK, Pamplona de Góes Cavalcanti L. Zika virus outbreak in Brazil. *J Infect Dev Ctries*. 2016 Feb;10(02):116.
65. Michelson AD. Platelets. Elsevier; 2013. 1353 p.
66. Ariede JR, Pardini MI de MC, Silva GF, Grotto RMT, Ariede JR, Pardini MI de MC, et al. Platelets can be a biological compartment for the Hepatitis C Virus. *Brazilian J Microbiol*. 2015 Jun;46(2):627–9.
67. Dhurat R, Sukesh M. Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: A review and author's perspective. *J Cutan Aesthet Surg* . 2014 ;7(4):189.
68. Salignac S, Latger-Cannard V, Schlegel N, Lecompte TP. Platelet Counting. In: *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) . 2013 . p. 193–205.
69. Holinstat M. Normal platelet function. *Cancer Metastasis Rev* . 2017 Jun 30 ;36(2):195–8.
70. Nurden AT. The biology of the platelet with special reference to inflammation, wound healing and immunity. *Front Biosci Landmark Ed* . 2018 Jan 1 ;23:726–51.
71. Bonaccio M. Does platelet count count? *Thromb Res* . 2016 Dec 1 ;148:143–4.
72. Zhou S, Liang X, Wang N, Shao L, Yu W, Liu M. Association of human platelet antigen polymorphisms with platelet count and mean platelet volume. *Hematology* . 2018 Sep 14 ;23(8):517–21.
73. Latger-Cannard V, Fenneteau O, Salignac S, Lecompte TP, Schlegel N. Platelet morphology analysis. *Methods Mol Biol* . 2013 ;992:207–25.

74. Sorrentino S, Studt J-D, Horev MB, Medalia O, Sapra KT. Toward correlating structure and mechanics of platelets. *Cell Adh Migr* . 2016 ;10(5):568–75.
75. Paz-Bailey G, Rosenberg ES, Doyle K, Munoz-Jordan J, Santiago GA, Klein L, et al. Persistence of Zika Virus in Body Fluids — Final Report. *N Engl J Med* . 2018 Sep 27;379(13):1234–43.
76. Hamaia S, Li C, Allain JP. The dynamics of hepatitis C virus binding to platelets and 2 mononuclear cell lines. *Blood*. 2001; 98(8):2293–300.
77. Zahn A, Jennings N, Ouwehand WH, Allain J-P. Hepatitis C virus interacts with human platelet glycoprotein VI. *J Gen Virol*. 2006; 87(Pt 8):2243–51.
78. Hottz ED, Oliveira MF, Nunes PCG, Nogueira RMR, Valls-de-Souza R, Da Poian AT, et al. Dengue induces platelet activation, mitochondrial dysfunction and cell death through mechanisms that involve DC-SIGN and caspases. *J Thromb Haemost*. 2013;11(5):951–62.