



**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).

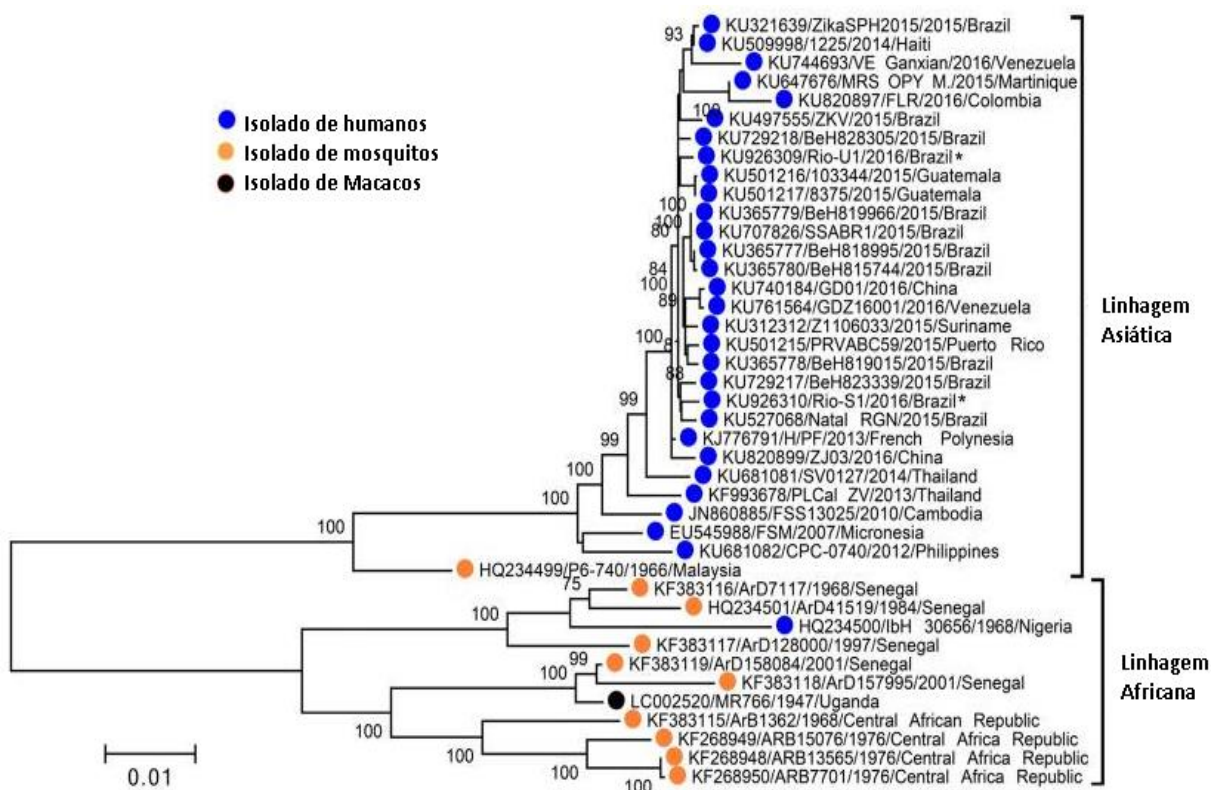


Figura 1. Linhagens do ZIKV identificadas. Os pontos em azul, laranja e preto correspondem a linhagens encontradas em amostras de humanos, mosquitos e macacos respectivamente. Modificada de Wang et al.2016 (24).

1.3 Tropismo Viral e Receptores

A infecção causada pelo ZIKV se inicia com a ligação do vírus aos receptores das células do hospedeiro, o que permite a entrada na célula. Esse processo é mediado pela proteína E que está envolvida na ligação e fusão com a membrana da célula e consecutivamente, o RNA viral é liberado na célula do hospedeiro (29).

O ZIKV é capaz de infectar diferentes tipos celulares, dentre estas as células progenitoras neuronais embrionárias humanas (hNPCs), células astrogliais e microglias, neurônios, fibroblastos, queratinócitos, células de Sertori, espermatozoides, células da placenta (Hofbauer, trofoblastos e células endoteliais), retina (células endoteliais da retina, pericitoretinianos e células epiteliais pigmentadas da retina), células dendríticas imaturas e maduras, monócitos (CD14+ e CD16+) e células renais mesangiais e podócitos glomerulares(30-35). Embora as células hNPCs sejam as mais susceptíveis à infecção pelo vírus, estudos sugerem que com o decorrer do tempo o vírus sofreu alterações genéticas que possibilitaram a infecção de células cerebrais e neurais (29).

Diferentes tipos de receptores foram descritos com os quais o ZIKV pode interagir com células humanas como as células dendríticas (DC-SIGN), encontrado na pele, mucosa e órgãos linfoides; macrófagos; células de Hofbauer na placenta e macrófagos no pulmão (36), AXL, presente em células endoteliais humanas, células tronco neuronais, micróglia, astrócitos, células precursoras de oligodendrócitos, células placentárias (29), Tyro3, presente em oligodendrócitos (formam a bainha de mielina) (37), TIM-1, é uma proteína de membrana do tipo I, marcador de doença renal (38), TLR-3, localizado no retículo endoplasmático e endossomos do sistema nervoso central (SNC) em astrócitos, oligodendrócitos, em cérebros embrionários (39,40), RIG-I, receptor de reconhecimento de padrões citosólicos (PRR) de neurônios (41,42,43) MDA5, encontrado em células do sistema imune, macrófagos e células dendríticas (43), TLR-8, expresso em células dendríticas derivadas de células mielóides, monócitos e linfócitos (44).

1.4 Vias de transmissão

A principal via de transmissão do ZIKV é por meio da picada do mosquito do gênero *Aedes*. O vírus se encontra na saliva do mosquito e quando ocorre o contato entre a saliva com um animal ou o homem, ocorre a transmissão (2). O vírus foi isolado de *Aedes africanus*, *Aedes aegypti*, *Aedes vitattus*, *Aedes furcifer*, *Aedes apicoargenteus* e *Aedes luteocephalus* (29,45).

O ciclo de transmissão por essa via dos artrópodes (mosquitos) ocorre de dois modos, através do ciclo silvestre, onde o macaco é o infectado pelo vírus, devido a transmissão do vírus feita pela picada do mosquito no macaco. O ciclo urbano ou suburbano é quando a transmissão ocorre através da infecção do mosquito, quando este pica o homem contaminado, e o mosquito após se alimentar do sangue adquire a infecção e transmite para um homem saudável, este ciclo causa a infecção ao homem com maior frequência, gerando assim grandes surtos (46).

Outras vias de transmissão foram descritas, como a transmissão vertical mãe-filho durante a gestação ou trabalho de parto (47).

Via sexual, ocorrendo a transmissão através do contato com o sêmen infectado com o Zika vírus, podendo o vírus permanecer nesse compartimento por um período de seis meses após a infecção. O vírus possui tropismo por células presentes no órgão reprodutor masculino, portanto esta é uma via que pode se expandir a infecção pelo Zika, e afetar bancos de espermatozoides e óvulos (48).

A transmissão por transfusão sanguínea foi reportada em 2013 pela primeira vez, (49). Estudos relataram a contaminação após transfusão de concentrado de plaquetas (50,51). Essa contaminação via transfusão poderia ser evitada com o uso de testes diagnósticos para a confirmação da infecção, evitando desse modo a transfusão de bolsas de sangue e hemoderivados contaminados. Existe a possibilidade de se transfundir uma bolsa contaminada com ZIKV sem que este seja detectado nos testes laboratoriais que antecedem a transfusão. Os testes laboratoriais de triagem sorológica de doadores de sangue no Brasil, não inclui o teste para ZIKV, somente quando o doador apresenta ou relata sintomas durante a entrevista de doação que um teste para zika é realizado (52). Portanto, utilizar testes laboratoriais que identifiquem a presença do vírus na triagem sorológica de banco de

sangue é importante, garantindo assim a não ocorrência de infecção por hemocomponentes.

Embora outras vias de transmissão da infecção como saliva, leite materno e líquido amniótico foram sugeridas estudos recentes demonstraram que ainda não existem subsídios para sua fundamentação (48, 53-56).

1.5 Testes Diagnósticos

Os testes laboratoriais mais utilizados para a detecção de ZIKV em amostra de pacientes são baseados em ensaios sorológicos (ELISA). No entanto, esse tipo de teste pode gerar reação cruzada com outros vírus do gênero *Flavivirus*, o que pode ser considerada uma limitação da metodologia. O teste molecular, como a PCR em Tempo Real (qPCR), é capaz de detectar o RNA viral em diferentes fluidos biológicos, com alta especificidade, no entanto sua limitação é o curto período de viremia, sendo capaz de detectar RNA viral circulante entre três e cinco dias no plasma ou soro de pacientes infectados (8,57,58). Na urina foi relatado que o vírus se mantém detectável por mais tempo que no plasma (59), e no sêmen foi detectado o vírus até 93 dias após os sintomas terem sido apresentados (60,61). Portanto, escolher o tipo de amostra (material biológico) que será utilizada para a realização do teste é de grande importância, devido ao período de viremia variar nos diferentes compartimentos.

O padrão ouro dos testes diagnósticos para o ZIKV é o teste de neutralização viral por redução de placa (PRNT), que consiste em um teste sorológico específico utilizando anticorpos, o resultado se baseia na redução da formação do efeito citoplasmático (formação de placa), embora apresente desvantagens significativas como o longo tempo para o preparo, recursos humanos treinados e laboratórios altamente qualificados (57).

1.6 Complicações decorrentes da infecção pelo ZIKV.

Das infecções causadas pelo ZIKV, aproximadamente 80%, são assintomáticas e, quando sintomática, os sintomas são inespecíficos e similares às infecções causadas por outros vírus como Dengue e Chikungunya (62). Os portadores da infecção também podem apresentar sintomas mais específicos e

graves da doença, como a Síndrome de *Guillain- Barré* em adultos e a microcefalia em recém-nascidos (57, 62, 63).

Durante o período em que ocorreu o surto de infecção pelo ZIKV no Brasil, houve um aumento nos números de casos da Síndrome de Guillain-Barré e Microcefalia, ambas as doenças podem ser associadas ao ZIKV (64).

1.7 Compartimento Biológico para ZIKV: as Plaquetas

Considerando os diferentes tipos celulares nos quais já foi descrita a presença do vírus e, a transmissão do vírus pelo sangue e hemoderivados um estudo recente de Grotto e colaboradores (em andamento, dados não publicados) demonstrou a presença do ZIKV em plaquetas.

As plaquetas humanas são fragmentos citoplasmáticos anucleados presentes na circulação resultante da fragmentação de megacariócitos na medula óssea (65).

A literatura demonstra que, em pacientes infectados com o Vírus da Hepatite C (VHC) o tempo de degradação do vírus nas plaquetas é menor do que no plasma, sugerindo que o vírus permaneça por mais tempo no sangue quando este está associado as plaquetas (66).

Assim, considerando que o ZIKV é também um Flavivirus e, que não existem dados na literatura que avaliaram a degradação do RNA viral do ZIKV em plaquetas a proposta deste trabalho foi avaliar a degradação do RNA do ZIKV ao longo do tempo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a degradação do RNA viral do ZIKV em plaquetas de doadores saudáveis expostas *in vitro* ao vírus.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras biológicas

No presente estudo foram utilizadas 16 amostras de sangue periférico de doadores de sangue do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu-SP, UNESP. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, número do parecer 2.660.955.

Foram critérios de inclusão: doadores não detectados para ZIKV e Dengue Vírus e, sorologia não reagente para Vírus da Hepatite C (VHC), Vírus da Hepatite B (VHB), HIV e, Doença de Chagas e Sífilis.

3.2.Amostra de ZIKV

Sobrenadante de cultura de células C6/36 provenientes do mosquito *Aedes albopictus* contendo isolado de ZIKV foi fornecido pelo Laboratório Vectomics, do Laboratório Central Multiusuários (LACEM) da Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA), UNESP, campus de Botucatu. As variantes de ZIKV (BeH823339, GenBank KU729217) para esta preparação foram, gentilmente, cedidas pelo Professor Edison Durigon (Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo). Estas variantes foram originalmente isoladas pelo Instituto Evandro Chagas, Ceará, Brasil em 2015.

3.3.Obtenção de plasma rico e pobre em plaquetas

Depois da coleta de 5 mL de sangue total de cada doador em tubo do tipo Vacutainer® (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) contendo 1,5mg/mL do anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), as amostras foram centrifugadas a 1.027xg por 3 minutos. O plasma obtido, após a centrifugação, foi dividido em dois tubos os quais foram processados diferentemente. Um tubo foi chamado de Plasma Rico em Plaquetas (PRP), o qual não sofreu nenhum tipo de centrifugação, posteriormente a centrifugação inicial e, portanto, nele pode ser encontradas plaquetas (67). O segundo tubo foi centrifugado a 1.600xg por 5min (após a centrifugação inicial) e, o *pellet*, correspondente às plaquetas, foi desprezado e o sobrenadante transferido para um novo tubo, esse por sua vez, foi chamado de Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) (67).

3.4.Viabilidade das plaquetas em cultura após 0 a 09 dias

3.4.1.Contagem de Plaquetas

Afim de determinar a quantidade de plaquetas presentes em amostras de plasma rico (PRP) foi realizada a contagem automática de plaquetas utilizando o equipamento *Pentra DX Nexus SPS evolution*. (68), segundo recomendações do

fabricante. Esse sistema de quantificação avalia a impedância das células presentes no plasma, permitindo diferenciar e quantificar os tipos celulares.

3.4.2. Viabilidade de plaquetas após 0 a 14 dias de incubação

Para verificar a viabilidade das plaquetas foram analisados plasma rico e plasma rico diluído a 2×10^2 /mL em plasma pobre em plaquetas durante 9 dias de incubação com o vírus. A avaliação foi realizada conforme segue: 170 μ L de cada alíquota (Plasma rico e plasma rico diluído) foram adicionados em poços separados de placa de cultura de 96 poços (Figura 2). Em cada poço foi adicionado 1% de antibiótico-antimicótico, de forma que a concentração final fosse 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina e 0,25 μ g/mL de anfotericina B (Thermo Fisher, USA) e 15 μ L de cultura celular de ZIKV na diluição de 1:100. A placa foi incubada a 37°C na presença de 5% de CO₂. Uma alíquota por vez (plasma rico e diluído) foi removida da placa (figura 2) nos intervalos de 0, 2, 5, 7 e 9 dias, e analisadas por citometria de fluxo e em 0, 3, 5, 7, 10, 12 e 14 dias para análise em lâmina corada com *Giemsa e Maygrunwald*.

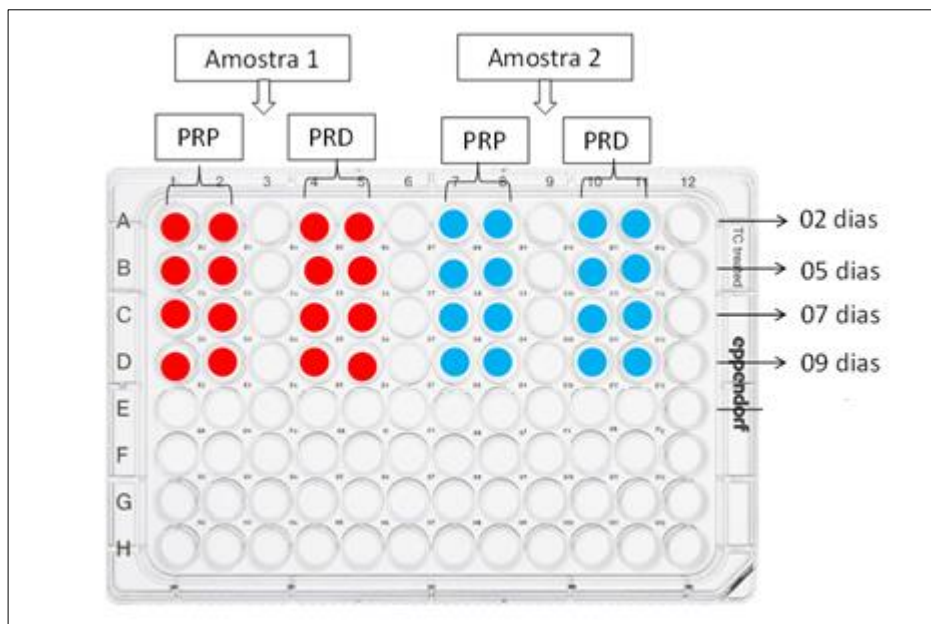


Figura 2. Esquema representativo do experimento de viabilidade das plaquetas ao longo do tempo. Em vermelho amostra 1, em azul amostra 2. PRP: Plasma Rico em Plaquetas, PRD: Plasma Rico em Plaquetas diluído em plasma pobre.

3.4.3. Análise de fosfatidilserina por citometria de fluxo

A viabilidade das plaquetas foi determinada utilizando kit FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Para marcação, foram utilizados 150 µl de plasma e adicionados 5 µl de anexina, em seguida incubados por 15 minutos a temperatura ambiente protegido de luz. Após a incubação, foram adicionados 350µl de Buffer 1x e prosseguido com a análise no Citômetro FACSCalibur™ (BD-Becton, EUA), utilizando o Software Cell Quest Pro® (BD-Becton-Dickinson, USA). Foram adquiridos 50.000 eventos para cada amostra.

3.4.4 Esfregaço do plasma

Para analisar a morfologia das plaquetas no decorrer do período de incubação, foram realizados esfregaços do plasma PRP em duplicata nos períodos citados acima, a coloração utilizada foi *Giemsa e Maygrunwald*, segundo recomendação do fabricante sendo observadas e analisadas em microscópio óptico.

3.5. Experimento para avaliação da degradação do RNA viral

3.5.1 Incubação com o Vírus

O experimento foi realizado da seguinte forma: 170 µL de cada plasma rico em plaquetas e 170 µL de cada Plasma pobre em plaquetas obtidos dos doadores incluídos neste estudo foram adicionados em poços separados de placa de cultura de 96 poços. Em cada poço foram adicionados: 1% de antibiótico-antimicótico, de forma que a concentração final fosse 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B (Thermo Fisher, USA) e 15 µL de cultura celular de ZIKV na diluição de 1:100. A placa foi incubada a 37°C na presença de 5% de CO₂. Alíquotas de plasma rico e pobre após incubação com o vírus depois de 0 e 12 dias foram retiradas para quantificação de RNA viral do vírus por RT-qPCR.

3.5.2 Extração de RNA

A extração do RNA viral foi realizada utilizando o reagente Trizol (ThermoFisher, USA), conforme recomendações do fabricante. Para cada 150 µL de plasma foram adicionados 500 µL de Trizol, homogeneizado vigorosamente e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida foi adicionado 100µL

de clorofórmio (*Merck, USA*), homogeneizado por 15 segundos e incubado por 3 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de 1,5ml tipo *eppendorf* e adicionado 4µL de glicogênio (20mg/mL) (*Thermo Fisher, USA*). Em seguida, foi adicionado 500 µL de isopropanol 100% (*LGC biotecnologia, USA*), homogeneizando-se por inversão, procedeu-se a incubação por 10 minutos a temperatura ambiente e posteriormente centrifugação por 10 minutos a 4°C à 12.000 x g. O sobrenadante foi desprezado, e o *pellet* foi lavado com 1mL de etanol 75% recém preparado. As amostras foram centrifugadas à 7.500 x g por 5 minutos a 4°C. Por fim, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* seco a temperatura ambiente. O RNA foi eluído em 25µL de água ultra-pura.

3.5.3 Transcrição Reversa

O cDNA foi confeccionado utilizando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (*Thermo Fisher, USA*) com volume final de reação de 20 µL, seguindo as especificações do fabricante, utilizando 10 µL do RNA extraído. As condições de reação foram: 25°C (10 minutos), 37°C (2 horas), 85°C (5 minutos) seguida do imediato congelamento a -20°C do produto obtido.

3.5.4 PCR em Tempo Real

As análises por PCR em Tempo Real (qPCR) foram realizadas utilizando o kit *GoTaq qPCR Master Mix* (*Promega*), seguindo as especificações do fabricante e utilizando 4,6 µL de água estéril, 10 µL de *GoTaq qPCR Master Mix 2x* (*Promega*) - *Sybr Green*, 0,7 µL do primer F2 (10 µM), 0,7 µL do primer R2 (10Mm) (Tabela 1) e 4 µL de cDNA. As condições de ciclagem foram 95°C (3 minutos), seguidos de 40 ciclos a 95°C (15 segundos) e 60°C (1 minuto), sendo que a 60°C a captura de fluorescência. A reação foi conduzida no equipamento 7500 Real-Time System da *Applied Biosystems®* (*Applied Biosystems, CA, USA*).

Tabela 1: Primers utilizados para a amplificação por qPCR da região NS5 do ZIKV

Primer	Sequências
ZIKV F2 (ZIKV 1086)	5'-CCGCTGCCCAACACAAG-3'
ZIKV R2 (ZIKV 1162c)	5'-CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT-3'

fonte: Lanciotti, R. S et al., 2008 (8).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Contagem de Plaquetas

Os resultados obtidos da quantidade de plaquetas presente nas amostras utilizadas no experimento estão descritos na tabela 2

Tabela 2: Quantidade de plaquetas em PRP

Amostras	Resultado ($\times 10^3/\text{mm}^3$)
1	549
2	608

PRP: Plasma Rico em Plaquetas

A literatura relata que a quantidade de plaquetas presente na corrente sanguínea é de 150.000 a 400.000/ μl e seu tempo de vida é de sete a dez dias, podendo desenvolver algumas funções como, participar do processo de hemostasia ou apenas após seu período de vida sofrem apoptose e são transportadas para o baço para serem eliminadas do corpo (69,70).

Um mecanismo alternativo foi relatado por outros autores onde afirmaram que após o envelhecimento, as plaquetas são removidas pelo fígado e baço e participam de processos de formação de novas plaquetas (70).

Quantificação de plaquetas fora do intervalo preconizado pode ser associado a doenças (71,72). No entanto, erros durante a coleta ou processamento da amostra podem gerar resultados equivocados que não se associa fatores patológicos. A elevação no número de plaquetas também ocorre devido a contagem de partículas do tamanho das plaquetas (pseudoplaquetas), erroneamente, exemplos dessas

partículas são glóbulos vermelhos pequenos, blastos segmentados, fragmentos citoplasmáticos de células nucleares, lipídeos e microrganismos (73).

Em plasmas ricos em plaquetas a quantidade de plaquetas é diferente do padrão devido a este possuir uma concentração maior plaquetária. O plasma altamente rico em plaquetas possui normalmente em torno de $1500 \times 10^3/\mu\text{L}$ de plaquetas (67).

Os resultados da contagem de plaquetas no plasma rico variaram entre 549-608 sendo, portanto, utilizado como padrão o valor de $608 \times 10^3/\text{mm}^3$ para realização de diluições do ZIKV para os experimentos que se seguiram.

4.2 Esfregaços Plasmáticos

A observação das lâminas de esfregaço de plasma, permitiu verificar que houve a diminuição do tamanho das plaquetas e houve formações de aglomerados plaquetários ao longo dos dias de incubação. Assim, os resultados sugerem que depois de 7-12 dias as plaquetas têm sua viabilidade diminuída e apresentam agregações significativas.

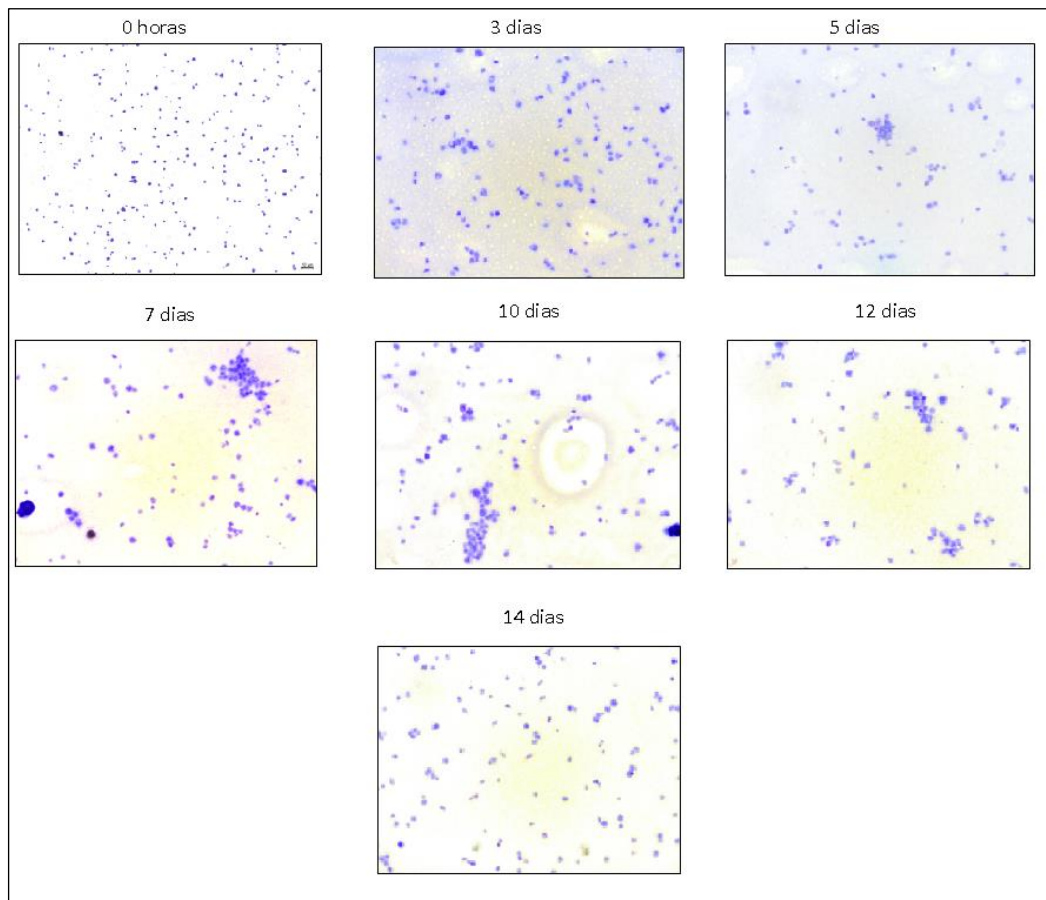


Figura 3: Imagens das lâminas fotografadas por microscópio óptico nos períodos das 0H, 3, 5, 7, 10, 12 e 14 dias pós incubação, em lente de aumento 1000x.

Estudos relataram que o tamanho das plaquetas indica quando são jovens ou velhas, sendo que quanto maiores, mais jovens (69). Em relação ao formato plaquetário o citoesqueleto se modifica no decorrer dos dias podendo ser encontrado na corrente sanguínea de forma discoide, modificam-se para esféricas quando são ativadas e tem formato de “ovo frito” quando desempenham a função de aderência. Outras duas modificações também ocorrem, como a liberação de grânulos protrombóticos e a ativação das integrinas plaquetária (69,74).

Porém alguns fatores pré-analíticos podem atrapalhar as análises, devendo ser necessários alguns cuidados como, uso do anticoagulante EDTA que pode danificar a membrana plaquetária, sendo o citrato o mais recomendado (67), mas o comitê de padronização de hematologia orienta que seja utilizado para a preparação

de esfregaços sanguíneos o EDTA pois possui efeito quelante das moléculas de cálcio (73).

O recomendado é que seja feita a lâmina até 4h após a coleta, a morfologia normal da plaqueta vista no esfregaço é em formato arredondado oval e um tamanho de 1.5–3 μm (74). No estudo esse prazo foi cumprido na primeira lâmina, porém as demais foram feitas de plasma incubado a 37°C, e realizada a coloração e leitura após a retirada da amostra da estufa de incubação.

4.3 Análise de fosfatidilserina por citometria de fluxo

Os resultados das análises são gerados na forma de gráficos, o quadrante do gráfico que indica a apoptose inicial presente na amostra, é o quadrante inferior da direita, LR (*Low Right*), onde é possível observar células marcadas com o fluoróforo FITC. No decorrer dos períodos, em ambas amostras ocorreu um aumento de pontos marcados neste quadrante, a figura 4 mostra os gráficos, gerados nos tempos de 0, 2, 5, 7 e 9 dias.

A porcentagem de plaquetas que apresentaram marcação com anexina V estão expressos na tabela 3 indicando qual a porcentagem de plaquetas que iniciaram o estágio de apoptose.

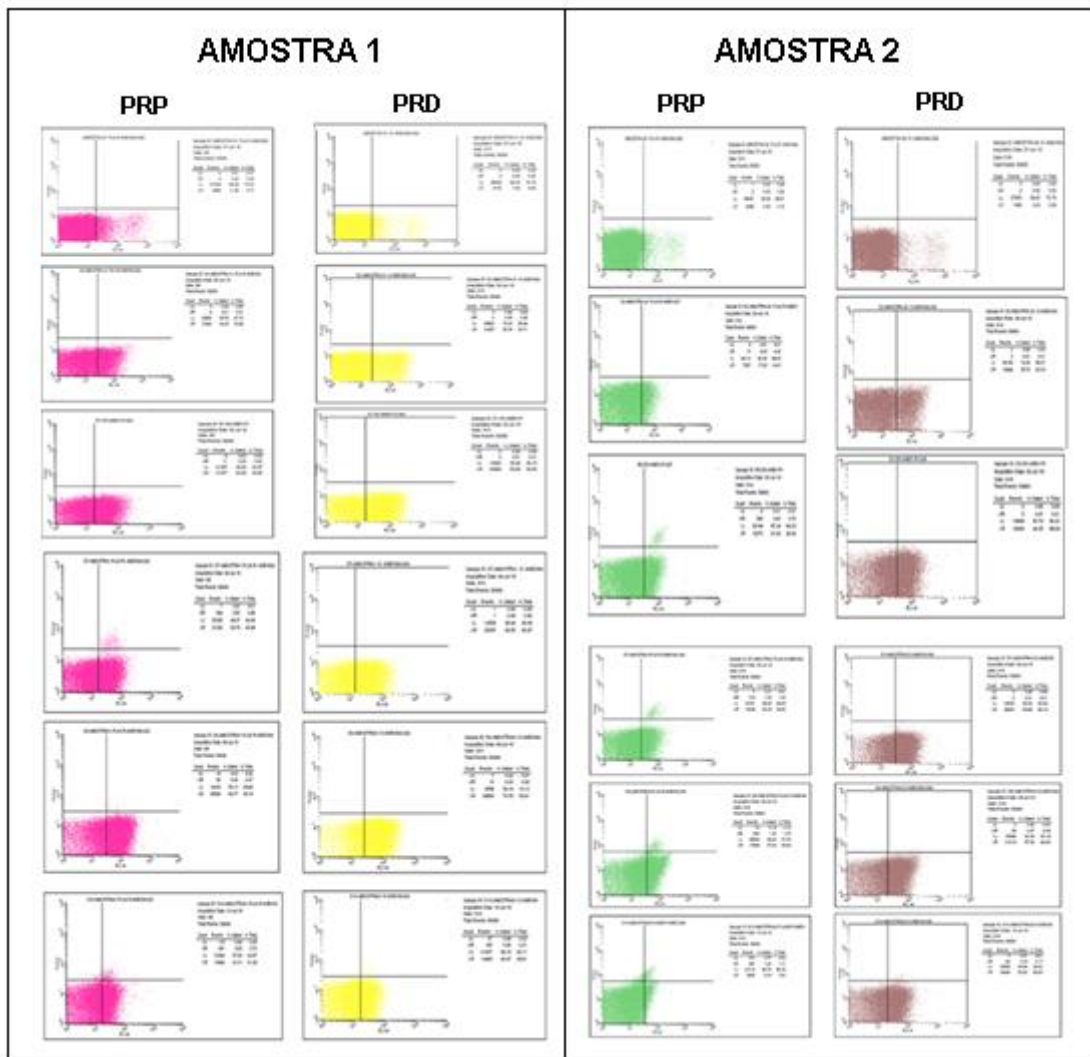


Figura 4. Análise realizada em Citometria de Fluxo. Análises realizadas, das Amostra 1 (gráfico na cor rosa indica as análises realizadas com a amostra em PRP, e em amarelo as PRD) e Amostra 2 (gráfico na cor verde indica as análises realizadas com a amostra em PRP, e em roxo as PRD) ambas nos tempos 0, 2, 5, 7 e 9 dias, com parâmetros de SSC vs FL1.

Tabela 3. Plaquetas em estágio inicial de apoptose

Dias	PRP-1(%)	PRD-1(%)	PRP-2(%)	PRD-2(%)
1	11,49	7,56	4,4	3,43
2	34,46	25,78	17,63	25,7
5	50,66	63,6	31,93	49,25
7	50,79	63,55	32,24	63,66
9	64,77	73,78	37,63	57,62

Legenda: PRP-1(plasma rico em plaquetas da amostra 1); PRD-1(plasma rico em plaquetas diluído da amostra 1); PRP-2(plasma rico em plaquetas da amostra 2); PRD-2(plasma rico em plaquetas diluído da amostra 2).

Gráficos de cada amostra estão demonstrados na figura 5, onde são observados um aumento do valor de apoptose inicial no decorrer dos períodos.

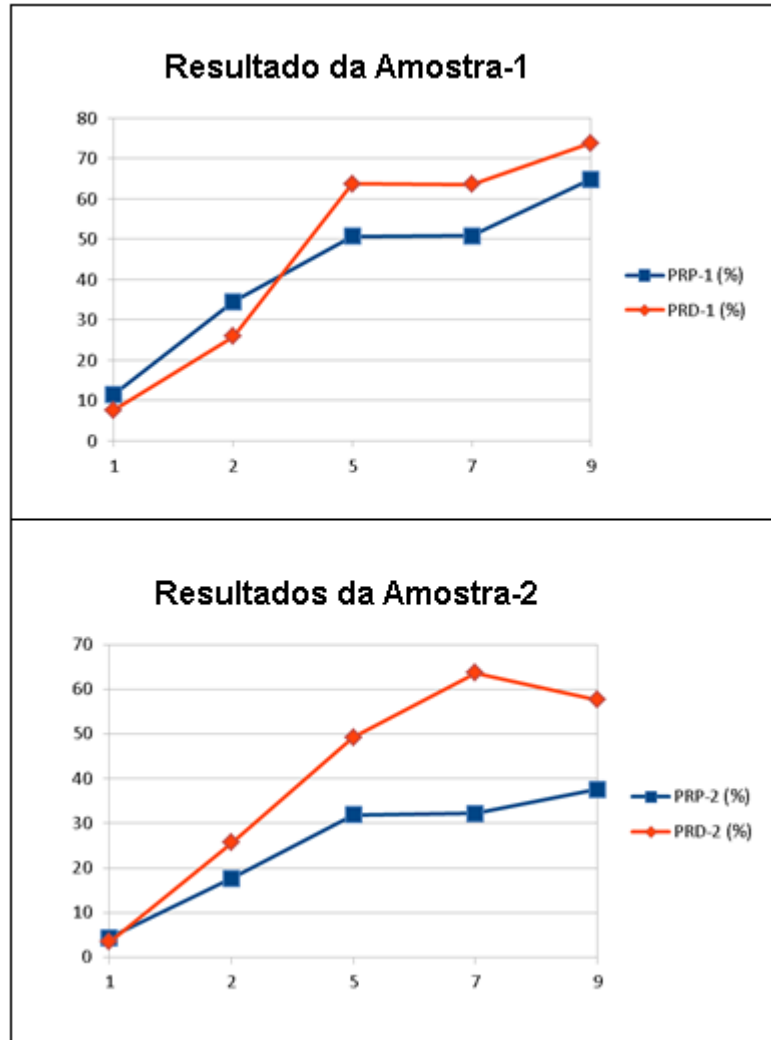


Figura 5. Degradação plaquetária no decorrer de 09 dias do plasma incubado. O eixo X representa os dias analisados, e o eixo Y a porcentagem de apoptose inicial.

Os resultados demonstraram que a melhor opção da amostra a ser utilizada no experimento de qPCR seria o plasma sem diluição PRP uma vez que este plasma demonstrou maior viabilidade de plaquetas durante o tempo de realização do estudo. Assim, sugere-se que a utilização do PRP foi o mais adequado para os experimentos com o vírus uma vez que existe menor taxa de apoptose das plaquetas ao longo do tempo.

4.4 PCR em Tempo Real (qRT-PCR) precedida de Transcrição Reversa para detecção do ZIKV depois da incubação plaquetas-vírus.

A figura 6 mostra os resultados obtidos por RT-qPCR do ZIKV considerando o material fonte de vírus (cultura celular em células C6/36) demonstrando os valores de *Cycle Theshold* (CT) do sobrenadante da cultura pura (CT=20) e das diluições seriadas 10^2 (CT=24), 10^3 (CT=27), 10^4 (CT=31), 10^5 (CT=36). Assim, foi realizada a curva padrão para inferir sobre o número de cópias de RNA viral/mL para as análises subsequentes.

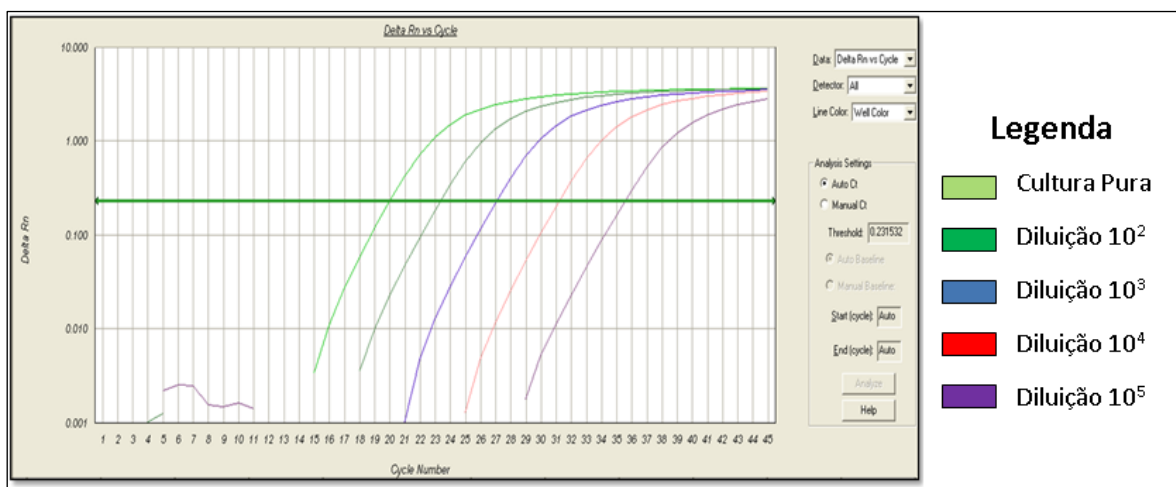


Figura 6: Curva de Amplificação da região NS5 do ZIKV a partir do sobrenadante da cultura pura e, das diluições 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 . No eixo X o número do ciclo, e no eixo Y a fluorescência detectada pelo equipamento. Em verde o *Threshold* a partir do qual é possível definir o *Cycle Threshold* (CT) de cada amostra.

A tabela 4 mostra os resultados obtidos por RT-qPCR do ZIKV do plasma pobre em plaquetas (PPP) e do plasma rico em plaquetas (PRP) depois da exposição dos mesmos ao vírus nos tempos 0 (início da incubação) e 12 dias depois da incubação.

Tabela 4. Resultados do experimento (RT-qPCR) no Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e no Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) para cada amostra avaliada.

Amostras	Plasma	CT 0h	CT 12dias	cópias/mL em log2 (0h)	cópias/mL em log2 (12 dias)	cópias/mL 0h	cópias/mL 12 dias
TZ05/18	PPP	25,428	34,131	12,41	4,45	5458	22
	PRP	22,769	26,734	14,85	11,22	29503	2383
TZ06/18	PPP	23,821	31,755	13,89	6,62	15132	98
	PRP	23,829	27,099	13,88	10,88	15054	1890
TZ07/18	PPP	27,830	33,392	10,21	5,12	1188	35
	PRP	33,744	35,644	4,80	3,06	28	8
TZ08/18	PPP	24,253	38,123	13,49	0,79	11506	2
	PRP	24,818	32,697	12,97	5,76	8037	54
TZ09/18	PPP	27,470	34,085	10,54	4,49	1494	22
	PRP	22,664	26,868	14,95	11,10	31547	2188
TZ010/18	PPP	24,729	31,646	13,05	6,72	8503	105
	PRP	22,410	26,555	15,18	11,38	37047	2669

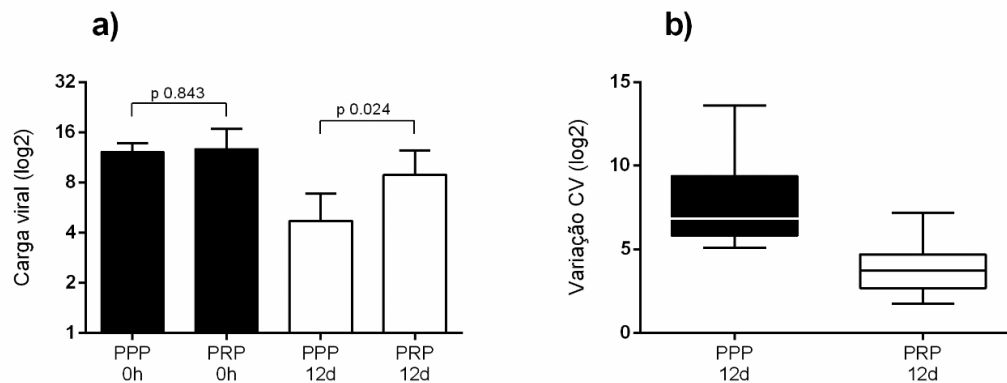


Figura 07. Carga viral de plasma infectado com ZIKV. Carga viral (CV) expresso em cópias de RNA/mL nos tempos de 0h e 12 dias após infecção, detecção por PCR em tempo real. a) Carga viral de plasma pobre em plaquetas (PPP) vs plasma rico em plaquetas (PRP), os valores de P são expressos no gráfico. b) Variação da carga viral (CV) em cópias/ml(log₂) após 12 dias da infecção: menor variação CV indica menor diminuição da carga viral após 12 dias de incubação, p 0.0016. Os valores são expressos em cópias de RNA por mL (log₂) (média \pm desvio padrão), dados com distribuição normal (Shapiro-Wilk), teste T pareado.

Os resultados mostraram que depois da incubação do vírus nos plasmas testados (PPP e PRP) existe maior preservação, ou seja, menor degradação do vírus no plasma rico em plaquetas sugerindo que a presença das plaquetas no plasma pode estar ligada a maior concentração do vírus após 12 dias de contato com o vírus.

Os resultados desse estudo, embora ainda inéditos para ZIKV, corroboram estudos anteriores com outros Flavivirus. Paz-Bailey (2017) relatou a detecção do RNA viral do vírus do Nilo ocidental até 13 dias após a primeira detecção (75). Estudos já relataram que o vírus da Hepatite C pertencente ao gênero *Flavivirus* é carregado por plaquetas tornando o tempo de degradação viral maior que no plasma (66).

Ainda não é conhecido que tipo de receptor/molécula de superfície celular é utilizado pelo vírus para adesão à plaqueta. Assim, os resultados aqui obtidos sugerem a condução de novos estudos que realizem essa investigação tomando por base estudos conduzidos com outros Flavivirus.

Para a ligação do VHC em plaquetas são utilizados domínios semelhantes a imunoglobulina extracelular do GPVI de plaquetas, e devido a morfologia plaquetária pode ocorrer a adesão do vírus a plaqueta resultando na adsorção não específica do VHC (76,77). Outro *Flavivírus*, o vírus da Dengue-2 apresenta interação com plaquetas devido a interação com receptor plaquetário DC-SIGN (Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin (78), estes últimos podem ser fortes candidatos a ligação do ZIKV, mas esta interação deve ser investigada.

Os resultados aqui obtidos são de grande importância no que se refere a infecção por ZIKV no contexto do paciente infectado, na transmissão e principalmente na vigilância em bancos de sangue para triagem do vírus em doadores não sintomáticos no que se refere, principalmente, ao concentrado de plaquetas.

5. CONCLUSÃO

O RNA viral pode permanecer detectável por um período mais longo no plasma rico, quando comparado com o plasma pobre em plaquetas, sugerindo que ocorra devido a alta concentração plaquetária presente no plasma PRP.

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. Zanluca 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.