



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

Lucas Guerchi Belo

**Avaliação dos polimorfismos HPA em plaquetas
expostas *in vitro* ao ZIKV**

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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rejane Maria Tommasini Grotto

**Botucatu
2021**

Lucas Guerchi Belo

**Avaliação dos polimorfismos HPA em plaquetas expostas
in vitro ao ZIKV**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rejane Maria Tommasini Grotto

**Botucatu
2021**

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

Belo, Lucas Guerchi.

Avaliação dos polimorfismos HPA em plaquetas expostas
in vitro ao ZIKV / Lucas Guerchi Belo. - Botucatu, 2021

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

Orientador: Rejane Maria Tommasini Grotto

Capes: 90400003

1. Zika vírus. 2. Polimorfismo (Genética). 3. Antígenos
de plaquetas humanas. 4. Plaquetas.

Palavras-chave: Human Platelet Antigen (HPA); Plaquetas;
Polimorfismo; Zika vírus (ZIKV).

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus por estar ao meu lado e me acompanhar em mais essa etapa da vida.

Agradeço meus pais e minha família pelo apoio e palavras de carinho nessa conquista.

À toda a equipe do laboratório de Biologia Molecular do HC-FMB de Botucatu, por toda a ajuda no laboratório e na elaboração da dissertação, todos os conselhos, incentivos e apoio recebido. Mais que uma equipe, uma família, que levarei para sempre.

À minha orientadora, professora Dra Rejane Grotto, pela oportunidade, confiança, paciência, compreensão e ensinamentos que me foram passados desde a iniciação científica. Sem seu apoio não teria conquistado esse título, à senhora, minha eterna gratidão.

Epígrafe

*“Não discuto com o destino, o
que pintar eu assino.”*

(Paulo Leminski)

Resumo

O ZIKA vírus é um arbovírus da família *Flaviviridae* e gênero *flavivirus*, possuindo grandes semelhanças genéticas e estruturais a outros arbovírus relevantes na área da saúde. A infecção por este patógeno está associada a complicações neurológicas graves, como microcefalia em neonatos e a síndrome de *Guillain-Barre*. Sua principal forma de transmissão é vetorial, sendo o mosquito fêmea do gênero *Aedes* o principal vetor. Contudo, outras vias de transmissão também foram documentadas, como a transmissão por transfusão de hemocomponentes, entre eles, a transfusão de concentrado de plaquetas. As plaquetas são fragmentos de megacariócitos que expressam diversas moléculas de superfície, as quais já foram associadas como receptores virais. Os Antígenos Plaquetários Humanos (HPA), por exemplo, são glicoproteínas de membrana presentes na superfície das plaquetas e estão associados a interações virais. Tais antígenos são suscetíveis a ocorrência de polimorfismos, e a presença desses polimorfismos estão associadas a infecções de *flavivirus*, tais como a dengue e Hepatite C. No entanto, ainda não existem estudos avaliando essa relação com ZIKV. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a possível associação entre os polimorfismos dos sistemas HPA -1, -3 e -5 com a capacidade do ZIKA vírus de interagir com plaquetas. As plaquetas foram obtidas de doadores, elas foram incubadas *in vitro* com ZIKV e em seguida lavadas. A presença do ZIKV nas plaquetas foi detectada por RT-qPCR e a genotipagem do HPA-1 e HPA-3 foram feitas por PCR-SSP, e do HPA-5 por PCR-RFLP. As amostras apresentaram carga viral detectadas nas plaquetas. Na análise estatística foi identificada significância entre a genotipagem do sistema HPA-1 e a capacidade do ZIKV de interagir com as plaquetas. Nossos dados sugerem um mecanismo de interação entre ZIKV e plaquetas, e uma associação entre o perfil HPA-1 e a afinidade do ZIKV interagir com as plaquetas.

Palavra-Chave: Zika vírus (ZIKV), Plaquetas, Human Platelet Antigen (HPA), Polimorfismo.

Abstract

ZIKA virus is an arbovirus of the family Flaviviridae and genus *flavivirus*. It has great genetic and structural similarities to other relevant arboviruses. This pathogen infection is associated with serious neurological complications, including microcephaly in neonates and Guillain-Barre syndrome. Its main form of transmission is through the female mosquito of the genus *Aedes* as a vector. However, other transmission routes have also been documented, such as transmission by transfusion of blood components, including the transfusion of platelet concentrate. Platelets are fragments of megakaryocytes that express several surface molecules, which have already been associated as viral receptors. Human Platelet Antigens (HPA), for example, are membrane glycoproteins present on the surface of platelets and are associated with viral interactions. Such antigens are susceptible to the occurrence of polymorphisms, and its presence is associated with flavivirus diseases, such as dengue and Hepatitis C. However, there are yet no studies evaluating this relationship with ZIKV. Therefore, the aim of this research has been to evaluate a possible association between the polymorphisms of the HPA -1, -3 and -5 systems and the ability of ZIKA virus to interact with platelets. Platelets were obtained from donors, incubated in vitro with ZIKV and then washed. The presence of ZIKV in the platelets was detected using RT-qPCR and genotyping of HPA-1 and HPA-3 has been performed through PCR-SSP, and HPA-5 by PCR-RFLP. Viral load was detected in platelets. Statistical analysis identified significance between the genotyping of the HPA-1 system and the ability of ZIKV to interact with platelets. Our updated data provided an interaction mechanism between ZIKV and platelets, as well as an association between the HPA-1 profile and the affinity of ZIKV interacting with platelets.

Keywords: Zika virus (ZIKV), Platelets, Human Platelet Antigen (HPA), Polymorphism.

Lista de Figuras:

Figura 1: Esquema representativo do ZIKA vírus.....	16
Figura 2: Esquema ilustrativo da distribuição dos Antígenos Plaquetários Humanos (HPA) estudados.....	19
Figura 3: Esquema representativo das etapas da incubação das amostras doadas.....	23
Figura 4: Esquema representativo das etapas de lavagem das plaquetas incubadas <i>in vitro</i> com o ZIKV.....	24/25
Figura 5: Quantificação da carga viral das amostras avaliadas.....	30
Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 2% da PCR-SSP.....	32
Figura 7: Eletroforese em gel de agarose 2%, da PCR-RFLP.....	33
Figura 8: Eletroforese em gel de poliacrilamida 6,5%, da PCR-RFLP.....	33
Figura 9: Genotipagem HPA-1, HPA-3 e HPA-5 dos doadores.....	34

Lista de Tabelas:

Tabela 1: Sistemas HPA -1, -3 e -5 evidenciando o polimorfismo no DNA e, a substituição do aminoácido consequente a presença do alelo a ou b.....	20
Tabela 2: Sequência de <i>primers</i> utilizados para genotipagem plaquetária dos sistemas HPA-1, -3 e 5.....	27
Tabela 3: Análise estatística da frequência genotípica e alélica.....	35

Lista de Abreviações e Siglas

%	Porcento
°C	Grau Celsius
µL	Microlitro
Ant-Ant	Antibiótico-antimicótico
<i>CLEC-2</i>	C-type Lectin Domain Family 2
CO ₂	Dióxido de carbono
CRP	Proteína C reativa
CT	Threshold cycle
<i>DC-SIGN</i>	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DENV	Dengue vírus
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético
<i>FMB</i>	Faculdade de Medicina de Botucatu
<i>GelRed</i>	Substância marcadora de ácidos nucleicos
GP	Glicoproteínas
HCV	Vírus da hepatite C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPA	<i>HumanPlateletAntigens</i>
<i>HSP</i>	Heat Shock Protein
<i>P</i>	Valor de P
pb	Pares de bases
PBS	Tampão phosphatebuffered-saline
PCR-RFLP	Reação em Cadeia da Polimerase – <i>restrictionfragmentlengthpolymorphism</i>
PCR-SSP	Reação em Cadeia da Polimerase – <i>sequencespecificprimers</i>
Pe	<i>Pélete</i> de plaquetas lavadas
<i>PFU</i>	Unidade formadora de Placa
<i>Primers</i>	Iniciadores
PSBE	Tampão phosphatebuffered-saline com anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)

qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
RNA	Ácido ribonucléico
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real precedida de transcrição reversa
S3	Sobrenadante da 3º lavagem
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
Si	Sobrenadante inicial
TBE	Tampão Tris-Borato 45mM/EDTA 1mM
UV	Luz ultravioleta
ZIKV	ZIKA vírus

Sumário

1 – Introdução	12
2 – Levantamento teórico	14
2.1 - ZIKA Vírus (ZIKV).....	14
2.2 - Tropismo Viral	17
2.3 –Plaquetas e receptores plaquetários	17
2.4 - Antígeno plaquetário humano – HPA	19
3 – Objetivo.....	21
4 – Metodologia	22
4.1 - Seleção dos Doadores	22
4.2 - Incubação (exposição das plaquetas com o ZIKA vírus <i>in vitro</i>)	22
4.3 - Detecção da interação ZIKV-plaqueta.....	23
4.4 - Extração de ácidos nucleicos (RNA e DNA)	26
4.5 - Reação em cadeia da Polimerase em Tempo Real precedida de transcriptase reversa (RT-qPCR)	26
4.6 - Genotipagem dos Antígenos Plaquetários Humanos (HPA)	27
4.7 - Análises estatísticas	29
5 – Resultados e Discussões.....	30
6 – Conclusão	37
Bibliografia	38
Anexo.....	45

1 – Introdução

O ZIKA vírus (ZIKV) é um arbovírus da família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus*. Seu material genético é composto de RNA de fita simples com polaridade positiva e, aproximadamente, 10.794pb. Este é dividido em duas regiões, uma não codificante e outra codificante, com uma longa fase de leitura aberta, que codifica uma única poliproteína que é clivada em suas proteínas estruturais e não estruturais (KUNO et al., 1998; LINDENBACH; RICE, 2003; KUNO; CHANG, 2007; FAYE et al., 2014).

O ZIKV apresenta grande relação genética a outros arbovírus relevantes na área da saúde, como o vírus da dengue, Nilo Ocidental e febre amarela. (KUNO; CHANG, 2007; FAYE et al., 2014). Sua forma de transmissão predominante é mediada por vetores, sendo o mosquito fêmea do *Aedes aegyptis* o principal. Este é também responsável pela transmissão de doenças similares, como a dengue e febre amarela (FAYE et al., 2014; BRASIL, 2016).

No ano de 2015, no Brasil, foram realizados os primeiros relatos do vírus na região nordeste (ZANLUCA et al., 2015) e, desde então, este vem se disseminando, totalizando mais de 30.000 casos constatados em todo país (MUSSO; CAO-LORMEAU; GUBLER, 2015; FARIA et al., 2016, PETERSEN et al., 2016). Sua distribuição é preocupante para área da saúde, pois a infecção pelo ZIKA vírus vem sendo associada a casos de microcefalia em neonatos de gestantes infectadas, bem como à síndrome de Guillain-Barré (ARAUJO; FERREIRA; NASCIMENTO, 2016; RUSSO et al., 2017).

Além disso, já foi demonstrada a capacidade do ZIKV de infectar diferentes tipos celulares, tais como, as células progenitoras neuronais embrionárias humanas (hNPCs), células astrogliais e microglias, neurônios, fibroblastos, queratinócitos, células de Sertori, espermatozoides, células da placenta (Hofbauer, trofoblastose células endoteliais), retina, monócitos (CD14+ e CD16+) e células dendríticas maduras e imaturas (HUEN, ROOK, 2014; ARIEDE et al., 2015; HAMEL et al., 2015; KELL; GALE, 2015; SADLER, 2017; XU et al., 2018).

No entanto, a interação das plaquetas com o ZIKV não foi documentada na literatura até o momento, sendo esta uma consideração importante para a área da saúde, dado que existem pesquisas que reportam a interação de plaquetas com

outros *flavivirus*. Estudos realizados com o Vírus da Hepatite C, um flavivírus, evidenciaram que a interação viral com as plaquetas tem a capacidade de manter a carga viral elevada por mais tempo no hospedeiro, além de fazer o escape viral do sistema imunológico durante a interação com as plaquetas (TERADA et al., 1966; OLINGER et al., 2000; ALMEIDA et al., 2004; PADOVANI et al., 2013; GROTO et al., 2016).

As plaquetas humanas são fragmentos citoplasmáticos anucleados de megacariócitos, que estão presente para auxiliar na integridade do sistema vascular (SJOBRING; RINGDAHL; RUGGERI, 2002). Esses fragmentos expressam vários tipos de antígenos em sua superfície, dentre eles os antígenos HLA (*Human Leucocyte Antigens*) e HPA (*Human Platelet Antigens*) (SCHOEDER, RAYNER, 1993), além de diversos receptores de superfície, como lectinas, integrinas e receptores toll-like (TLR), permitindo que eles interajam diretamente com vários patógenos (ASSINGER, 2014).

Muitos vírus utilizam moléculas envolvidas nas adesões celulares como receptores ou correceptores. O rinovírus, por exemplo, utiliza a molécula de adesão intercelular 1 como porta de entrada na célula do hospedeiro (ICAM-1) (GREVE et al., 1989; STAUNTON et al., 1989). Já as integrinas, são usadas pelos adenovirus e echovirus como mediadores para infectar as células-alvo do hospedeiro (WICKHAM et al., 1993; BERGELSON et al., 1992). A ligação dos vírus com suas moléculas de adesão pode sofrer variações devido a polimorfismos que podem alterar a região de ligação do vírus com a célula. Já foi documentado a influência de polimorfismos em integrinas com a interação de plaquetas com determinados *flavivirus* (SOUNDRAVALLY; HOTI, 2007; PICELLI, 2015).

Os polimorfismos das moléculas do HPA decorrem da substituição de um nucleotídeo na sequência do gene, levando à substituição de um único aminoácido na proteína, alterando sua conformação tridimensional (METCALFE et al., 1995; LUCAS; METCALFE, 2000). São definidos 24 tipos de HPAs expressos em plaquetas, destes, 12 são agrupados em seis sistemas bialélicos (HPA -1, -2, -3, -4, -5 e -15) (KAPLAN, 2007; XU, 2009; CONTI et al., 2014), sendo o alelo “a” mais frequente e o “b” de menor frequência na população. (METCALFE et al., 2003).

Sabe-se que as plaquetas atuam como carreadoras de vírus no hospedeiro (HAMAIA; LI; ALLAIN, 2001; ALMEIDA et al., 2004), sugerindo o envolvimento do polimorfismo HPA com infecções virais, tais como a dengue (DENV) (SOUNDRAVALLY; HOTI, 2007), hepatite C (VHC) e coinfecção deste com o vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (PICELLI, 2015; GROTTTO, 2016).

Portanto, levando em consideração que estudos já demonstraram que o DENV e VHC interagem com as plaquetas e que os polimorfismos HPA influenciam nesta interação, esse trabalho visou investigar a correlação da carga viral de plaquetas expostas *in vitro* ao ZIKA vírus com os diferentes genótipos envolvendo o HPA-1, -3 e -5.

2 – Levantamento teórico

2.1 - ZIKA Vírus (ZIKV)

Os primeiros isolados do ZIKV datam da década de 40 em primatas na floresta ZIKA em Uganda, na África, sendo a primeira infecção em humanos reportada em 1952 (DICK et al., 1952; MC-CRAE; KIRYA, 1982). Em 2013 foi relatada uma epidemia do vírus na Polinésia Francesa (IOOS et al., 2014) e no ano de 2015, no Brasil, foram relatados os primeiros casos do vírus na região nordeste (ZANLUCA et al., 2015). Desde então, o vírus vem se disseminando no território brasileiro e se tornando um preocupante problema de saúde pública (MUSSO; CAO-LORMEAU; GUBLER, 2015; FARIA et al., 2016, PETERSEN et al., 2016).

Sua principal forma de transmissão é mediada por vetores, sendo o mosquito fêmea do gênero *Aedes* seu principal vetor, responsável também pela transmissão de doença similares (FAYE et al., 2014). Além da transmissão por vetor, a transmissão materno-fetal do vírus também pode ocorrer. Inúmeros relatos associam a infecção materno-fetal a um conjunto de achados clínicos e manifestações sistêmicas apresentadas pelos neonatos contaminados na gestação ou na hora do parto. A principal característica a ser identificada e a mais alarmante é a microcefalia dos neonatos. Outros achados estão associados a um possível acometimento das células neuronais, afetando múltiplos órgãos e sistemas como: musculoesqueléticas, oculares, auditivas, neurológicas (convulsões e hipotonia), pulmonares,

desproporção craniofacial, além de restrição de crescimento intrauterino (BRASIL, 2016; RUSSO et al., 2017).

Uma terceira possível via de transmissão do vírus é a sexual, estudos mostraram altas cargas virais detectadas no sêmen de pacientes infectados e a infecção de espermatozoides pelo vírus (FOY et al., 2011; MANSUY et al., 2016; SAKKAS et al., 2018). Ademais, estudos na área de hemotransfusão associaram uma quarta via de transmissão por transfusão sanguínea, pois a presença do vírus foi detectada em hemocomponentes e hemoderivados (MUSSO et al., 2014; MOTTA et al., 2016). Também foi relatada a contaminação de um paciente após transfusão de concentrado de plaquetas (MUSSO et al., 2014; BARJAS-CASTRO et al., 2016; MOTTA et al., 2016).

O ZIKV comporta-se como a maioria dos outros *flavivirus*, com exceção do Vírus da Febre do Nilo Ocidental (West Nile vírus, WNV), e suas características são semelhantes às encontradas no DENV (PANYASRIVANIT et al., 2011; VANDERGAASST; FREDERICKSEN, 2012; FAYE et al., 2014). É considerado um vírus emergente devido a sua expansão nas últimas décadas, além de seu potencial neurológico patogênico (LIMON-FLORES et al., 2015; ZANLUCA et al., 2015).

O *flavivirus* ZIKA possui seu material genético dividido em duas regiões: região não traduzida e a região de leitura que codifica uma única poliproteína. Essa poliproteína é clivada em três proteínas estruturais, cápsideo (C), precursor de membrana (prM), envelope (E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (KUNO et al., 1998; LINDENBACH; RICE, 2003; FAYE et al., 2014) figura 1.

Suas proteínas não estruturais estão envolvidas na replicação viral, sendo que apenas as proteínas NS3 e NS5 possuem atividade enzimática conhecida. As proteínas NS1, NS2A, NS2B, NS4A, NS4B desempenham funções de cofatores enzimáticos que auxiliam no rearranjo citoplasmático para replicação viral, participam no bloqueio da sinalização de *interferon* e evasão da resposta imune (BRAND; BISAILLON; GEISS, 2017; LEE et al., 2018). Já as proteínas estruturais estão envolvidas nas etapas de maturação e interação com as células do hospedeiro. A proteína de superfície E é responsável pela ligação e fusão com a membrana da célula hospedeira, a proteína M possui importante papel na maturação

viral para forma infecciosa e a proteína C é responsável pela formação de uma riboproteína, contribuindo na montagem da partícula viral (BRAND; BISAILLON; GEISS, 2017).

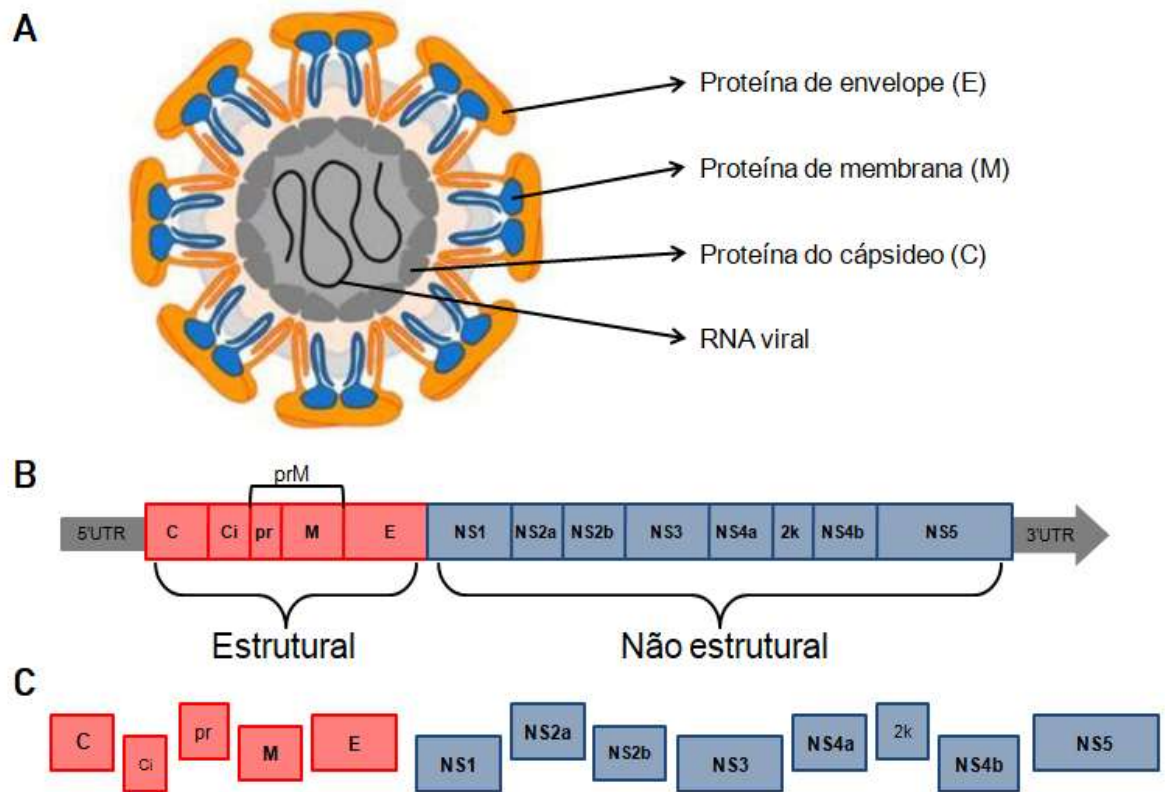


Figura 1 - Esquema representativo do ZIKA vírus: (A) estrutura do ZIKV, suas proteínas estruturais (E, M, C) e material genético (RNA viral); (B) poliproteína codificada (rosa e azul) que é clivada e da origem a proteínas estruturais e não estruturais do ZIKV; (C) proteínas finais estruturais (C, Ci, pr, M e E) e não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, 2k, NS4b e NS5) do ZIKV. Adaptado de Sun, et al, 2017.

Recentes estudos de microscopia crio-eletrônica revelam que o ZIKV exibe uma estrutura semelhante à de outros *flavivirus*, apresentando uma disposição icosaédrica, com 180 cópias da proteína E e da proteína de membrana (M) presente no envelope, em que os dímeros de 90 proteínas E cobrem completamente a superfície viral (KUHN et al., 2002, CHAVEZ et al. 2010, ZHANG et al. 2013; CHAN et al., 2016, KOSTYUCHENKO et al., 2016, SIROHI et al., 2016).

2.2 - Tropismo Viral

O processo de infecção das células é mediado pela proteína viral E que desempenha o papel de interagir com receptores específicos da célula hospedeira durante a ligação do vírus à superfície celular, além de estar envolvida na fusão das membranas e na entrada do vírus. Portanto, esta é uma proteína importante para o tropismo tecidual e virulência. (ROEHRIG, 2003; SINGH et al., 2017). Ainda, a proteína E é o principal alvo dos anticorpos neutralizantes do hospedeiro e induz imunidade protetora (SIMMONDS et al., 2017).

Os *flavivirus* replicam-se inicialmente no citoplasma das células dendríticas, fibroblastos e queratinócitos presentes na epiderme e derme, dispersando-se posteriormente para circulação sanguínea (Hayes, 2009; Hamelet et al., 2015). Foi demonstrado que cobaias murinas inoculadas intraperitonealmente com ZIKV apresentam o vírus em neurônios (atividade neurotrópica) (DICK, 1952). Assim, desde os anos 50 é conhecido que, em cobaias, o ZIKV apresenta a capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica (DICK, 1952; BELL; FIELD; NARANG, 1971).

Atualmente, foram descritos diferentes tipos de receptores que podem ser utilizados pelo ZIKV para interagir com células humanas, tais como, DC-SIGN, que são expressos pelas plaquetas e em células dendríticas da pele, mucosa, órgãos linfóides, macrófagos e células de Hofbauer na placenta (DHURAT; SUKESH, 2014; HAMEL et al., 2015); AXL, presente em células endoteliais humanas, células-tronco neuronais, micróglia, astrócitos, células precursoras de oligodendrócitos, células placentárias (HAMEL et al., 2015; LANCIOTTI et al., 2016); Tyro3, presente em oligodendrócitos (SALIGNAC et al., 2013 ; Hamel et al., 2015); MDA5, encontrado em células do sistema imune, macrófagos e células dendríticas (GITLIN et al., 2006), e TLR-8, expresso em células dendríticas derivadas de células mielóides, monócitos e linfócitos (Zahn et al., 2006).

2.3 –Plaquetas e receptores plaquetários

As plaquetas humanas são fragmentos citoplasmáticos anucleados originados dos megacariócitos na medula óssea e são responsáveis pela integridade do

sistema vascular, atuando na hemostasia e cicatrização de feridas (SJOBRING; RINGDAHL; RUGGERI, 2002). Elas permanecem na circulação, em média, durante dez dias até serem retiradas por células endoteliais. Sua concentração sanguínea normal é de 150.000 a 450.000 plaquetas por microlitro (LYNCH, 1994).

Já foi demonstrado que a ativação plaquetária induzida por vírus não apenas modula a contagem de plaquetas, mas também molda as respostas imunes. Também foi evidenciado que as plaquetas contribuem direta ou indiretamente para a persistência de vírus no hospedeiro (ASSINGER, 2014), uma vez que esses fragmentos expressam vários tipos de antígenos em sua superfície, entre eles os antígenos HLA e HPA, podendo causar problemas imunológicos e dificultar os efeitos terapêuticos (SCHOEDER, RAYNER, 1993; CURTIS; MC-FARLAND, 2014).

As glicoproteínas imunogênicas relacionadas aos HPAs são integrinas, sendo eles os complexos denominados GPIa-IIa, GPIIb-IIIa e GPIb-IX (METCALFE et al., 1995; RUGGERI 1997; LUCAS; METCALFE, 2000; RUGGERI2002). O complexo GPIa-IIa é constituído pela associação não covalente entre duas subunidades, sendo também presente em linfócitos T ativados e em outras células. Estima-se a presença de aproximadamente 800-2.800 cópias desse heterodímero por plaqueta (ELENA, 2007). O complexo GPIIb-IIIa, por sua vez, tem papel importante na agregação plaquetária, com aproximadamente 50-80.000 cópias por plaquetas (CHARO; KIEFFER; PHILLIPS, 1994). Já o complexo glicoproteico GPIb-IX está envolvido nas etapas iniciais da agregação plaquetária e estima-se a presença de aproximadamente 25.000 cópias por plaqueta (ELENA, 2007).

As plaquetas também expressam o receptor DC-SIGN, esse receptor já demonstrou ser usado pelo DENV para infectar as plaquetas. Além disso, estudos com o ZIKV mostrou o uso desse mesmo receptor para interação do vírus com algumas células (DHURAT; SUKESH, 2014; HAMEL et al., 2015; SIMON, SUTHERLAND E PRYZDIAL, 2015).

Aponta-se que as plaquetas atuam como carreadoras de vírus *in vivo* (HAMAIA; LI; ALLAIN, 2001; ALMEIDA et al., 2004). Quando observado o tempo de circulação do vírus em amostras biológicas, percebe-se que estes, ao interagirem com as plaquetas, se mantêm por mais tempo detectáveis em comparação com vírus que permaneceram livres no plasma, sem interagir com as plaquetas ou outro

tipo celular (ARIEDE et al., 2015). Estudos realizados com plaquetas demonstraram que 100% das plaquetas expostas ao HCV tiveram cargas virais detectáveis após incubação *in vitro*, sugerindo que a interação desse vírus com a plaqueta (PADOVANI et al., 2013).

2.4 - Antígeno plaquetário humano – HPA

Os HPA são encontrados nos complexos glicoproteicos plaquetários, os quais também funcionam como receptores de membrana. Estes receptores possuem um papel muito importante na interação das plaquetas com a parede dos vasos lesionados (adesão) e na interação plaquetária (NEI; TAJIMA; TATENO, 1983). A figura 2 representa as regiões de alguns HPAs nas glicoproteínas da membrana plaquetária.

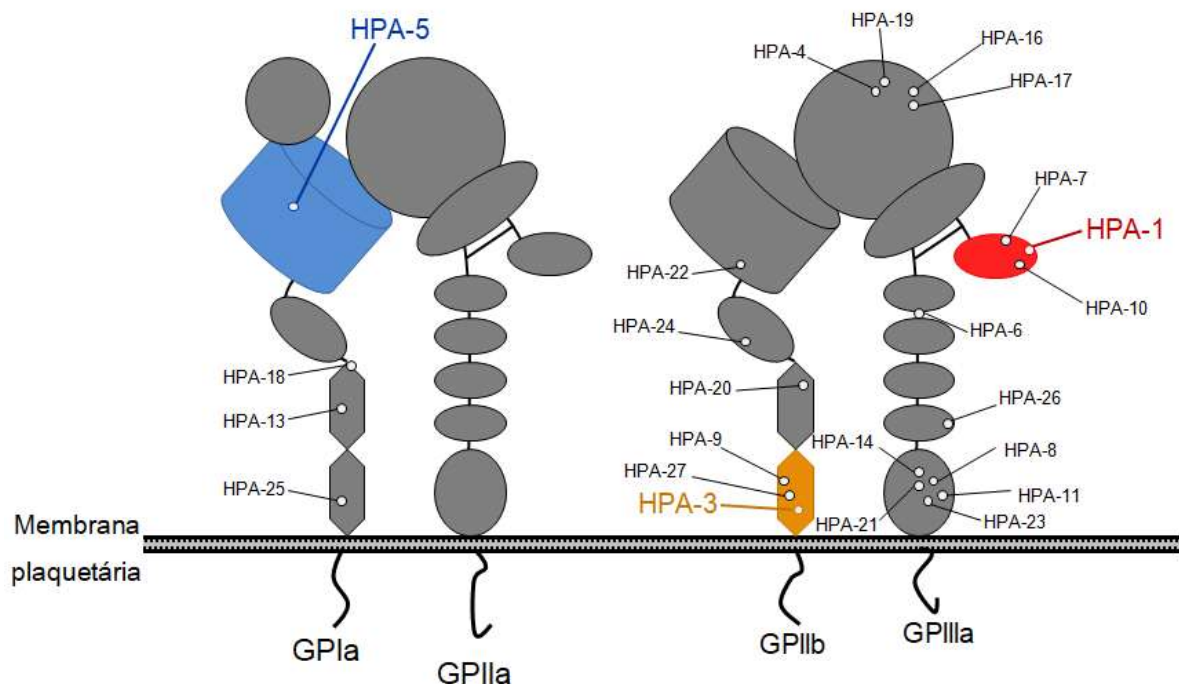


Figura 2 - Esquema ilustrado da distribuição dos Antígenos Plaquetários Humanos (HPA) estudados. Complexos glicoproteicos GPIa-IIa e GPIIb-IIIa da superfície da membrana plaquetária. Posições afetadas em cada HPA, em destaque (colorido) os HPAs que fizeram parte do estudo. Adaptado de Peterson, et al. (2013).

Nas plaquetas, a maioria dos antígenos HPA ocorre devido a uma alteração de aminoácido codificada por um polimorfismo no gene codificante. Essa alteração gera uma troca na estrutura final da glicoproteína, resultando em diferentes epítomos que podem causar reconhecimento aloimune. (NEI; TAJIMA; TATENO, 1983; Li et al., 2014). A maioria destes polimorfismos foi descoberta por observações de aloanticorpos policlonais formados durante a gestação ou após múltiplas transfusões de sangue. O primeiro aloantígeno plaquetário foi descrito em 1959 por van Loghem e este foi designado “Zw”, hoje nomeado por HPA-1 (METCALFE et al., 1995; Li et al., 2014).

Foram definidos, até o momento, aproximadamente 24 diferentes HPA, expressos em seis diferentes glicoproteínas plaquetárias, codificadas por diferentes cromossomos, 12 destes HPA são agrupados em 6 sistemas bialélicos (HPA -1, -2, -3, -4, -5 e -15) (KAPLAN, 2007; XU, 2009; CONTI et al., 2014), sendo o alelo “a” de maior frequência, gene selvagem, e o “b” de menor, gene polimorfo. (METCALFE et al., 2003). A Tabela 1 especifica as características dos HPA-1, -3 e -5, analisados neste trabalho.

Tabela 1: Sistemas HPA -1, -3 e -5 evidenciando o polimorfismo no DNA e a substituição do aminoácido consequente a presença do polimorfismo.

Antígeno	Glicoproteína	Nucleotídeo	Aminoácido	Cromossomo
		Original / Mutado	Original / Mutado	
HPA - 1a HPA - 1b	GPIIIa	T ₁₉₆ / C ₁₉₆	Leucina ³³ / Prolina ³³	17
HPA - 3a HPA - 3b	GPIIb	T ₂₆₂₂ / G ₂₆₂₂	Isoleucina ⁸⁴³ / Serina ⁸⁴³	17
HPA - 5a HPA - 5b	GPIa	G ₁₆₄₈ / A ₁₆₄₈	Ac. Glutâmico ⁵⁰⁵ / Lisina ⁵⁰⁵	5

HPA: antígeno plaquetária humano; GP: glicoproteína; numeração em azul: posição do nucleotídeo na sequência gênica; numeração em vermelho: posição do aminoácido na cadeia polipeptídica; T: timina; C: citosina; G: guanina; A: adenina. Adaptado de TORALLES-PEREIRA, 2001

Pesquisas com o polimorfismo HPA comprovam associação com infecções virais, tais como o DENV (SOUNDRAVALLY; HOTI, 2007), monoinfecções por VHC e coinfeção deste com HIV (PICELLI, 2015; GROTTTO, 2016). Demonstra-se ainda

uma associação entre o aumento da frequência alélica do HPA-5b em portadores do VHC quando comparados ao grupo controle, sem o vírus (VERDICHIO-MORAES et al., 2009). Ademais, também se verifica uma associação do HPA -1a/1b com o rápido desenvolvimento da fibrose hepática em pacientes mono infectados pelo VHC (SILVA et al., 2012) e a perda desse efeito na progressão da fibrose hepática em pacientes coinfectados HIV / VHC (GROTTO, 2016).

Com base nos estudos apresentados, percebe-se que as plaquetas podem atuar como um importante reservatório biológico para o ZIKV, contribuindo para a sua persistência e seu escape viral do sistema imunológico no hospedeiro. Portanto, é possível que o polimorfismo do HPA possa influenciar na interação do vírus com as plaquetas, assim como apresentado nos estudos com outros *flavivirus*, o que ainda não foi encontrado na literatura para o ZIKV, arbovirose emergente de preocupação global.

Se a hipótese deste estudo for verdadeira (o ZIKV apresenta capacidade de interagir com as plaquetas e ainda que o polimorfismo HPA influencia essa interação), nossos resultados poderão contribuir para compreender melhor o mecanismo de ação do ZIKV, tendo potencial de auxiliar no avanço do entendimento da fisiopatologia dessa infecção viral e no enfrentamento dessa arbovirose.

3 – Objetivo

Avaliar se o ZIKA vírus apresenta a capacidade de interagir, *in vitro*, com as plaquetas, e caso seja confirmada esta interação, correlacionar se os polimorfismos presentes dos HPA-1, -3 e -5 influenciam nessa interação.

4 – Metodologia

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu- FMB (UNESP), mediante parecer 2.046.595 (CAAE 67285717.6.0000.5411).

4.1 - Seleção dos Doadores

Foram utilizados neste estudo amostras de sangue total provenientes de doadores voluntários. Somente foram incluídas amostras de doadores saudáveis, maiores de 18 anos que apresentaram sorologia negativa para Zika vírus (ZIKV), vírus da hepatite C (VHC), Dengue vírus (DENV) e Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), e que forneceram seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por escrito (anexo 1). Os doadores foram recrutados no Hemocentro de Botucatu, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina (FMB), Unesp. Foram utilizadas amostras de 64 participantes nesse estudo.

4.2 - Incubação (exposição das plaquetas com o ZIKA vírus *in vitro*)

Para obtermos as plaquetas, foram coletados 2 tubos *Vacutainer*® (*Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA*) de 4mL com anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), um total de 8mL de sangue de cada doador que aceitou participar do estudo. As coletas dos tubos foram realizadas pelos profissionais do banco de sangue.

Após a coleta, as amostras de sangue foram submetidas à centrifugação de 1300g por 5 minutos para a obtenção do plasma rico em plaqueta e, em seguida, 1,5 mL desse plasma foi transferido para um novo tubo contendo EDTA, figura 3. Ao transferir o plasma rico em plaqueta para um novo tubo, a concentração de EDTA foi elevada, o que tem como objetivo inibir uma possível agregação plaquetária durante o tempo de incubação das plaquetas.

Em seguida, o plasma foi transferido para placas de cultura de células de fundo chato com seis poços, onde foram adicionados 15µL do sobrenadante de cultura celular C6/36 contendo o ZIKV na concentração de aproximadamente de 87

milhões unidades formadoras de placas (PFU), gentilmente cedido pelo professor Doutor Jayme Augusto de Souza-Neto (Botucatu, São Paulo, Brasil) e antibiótico-antimicótico a 1x (Ant-Ant) (Thermo Fisher, CA, EUA). A placa foi incubada por 48 horas em estufa a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂, figura 3.

O restante das amostras, que inclui o remanescente de plasma e a fração celular do tubo de coleta, foi transferido para um microtubo de 1,5mL e armazenado até o momento da extração de DNA, figura 3. As amostras de DNA extraídos foram utilizadas na genotipagem dos polimorfismos HPA.

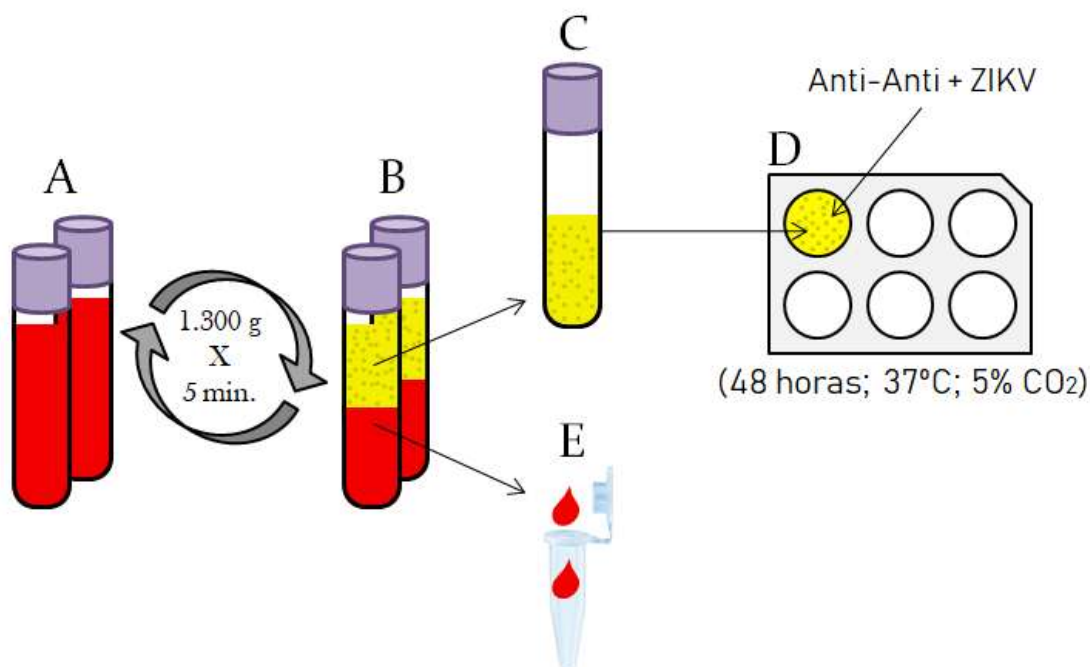


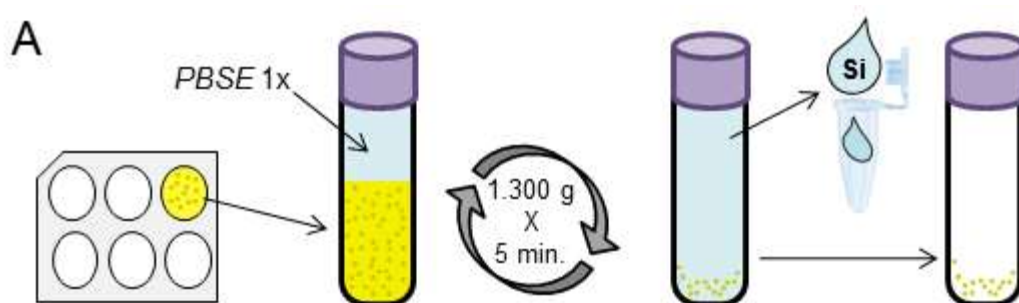
Figura 3 – Esquema representativo das etapas da incubação das amostras doadas. (A) 2 tubos de sangue doados pelo participante; (B) amostras de sangue com as separações, do plasma rico em plaquetas (amarelo) e a fração celular do tubo de coleta (vermelho), após centrifugação; (C) plasma rico em plaquetas em novo tubo com EDTA; (D) incubação do plasma rico em plaquetas com o Anti-Anti (antibiótico-antimicótico) e o ZIKV na placa cultura celular em estufa de CO₂ a 37°C por 48 horas; (E) remanescente da amostra armazenada em microtubo de 1,5mL. Centrifugação de 1.300g por 5 minutos. Zika vírus: ZIKV. Fonte: própria do autor.

4.3 - Detecção da interação ZIKV-plaqueta

Após o período de 48 horas de incubação, as plaquetas foram homogeneizadas e transferidas para novos tubos de coleta Vacutainer® com EDTA, onde passaram pela etapa de lavagem com tampão PBSE 1X (*Phosphatebuffered-*

salin, enriquecido com anticoagulante EDTA; pH 7,2). O EDTA foi adicionado no tampão PBS para evitar a agregação plaquetária durante a centrifugação. A etapa de lavagem foi realizada da seguinte maneira: o volume de 4mL do tubo foi completado com o tampão, as plaquetas foram gentilmente ressuspensas e o tubo foi centrifugado a 1300g por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Esse processo de lavagem foi repetido por 3 vezes, onde, somente o sobrenadante da última lavagem foi armazenado. As lavagens das plaquetas após a incubação foram realizadas com o objetivo de eliminar os vírus livres, que não teriam interagido com as plaquetas.

Durante esses processos pós-incubação foram feitas 3 alíquotas; a primeira alíquota foi proveniente do sobrenadante inicial das plaquetas, após a incubação e antes de iniciar as lavagens (Si), para quantificar a carga viral inicial; a segunda alíquota foi proveniente do sobrenadante da última lavagem (S3), realizada para demonstrar a eficiência das lavagens para a eliminação dos vírus livres; a terceira alíquota foi o *pellet* de plaquetas após as lavagens (Pe), para quantificar a carga viral dos vírus que interagiram com as plaquetas. O esquema representativo na figura 4 demonstra o processamento das plaquetas após serem incubadas *in vitro* com o ZIKV.



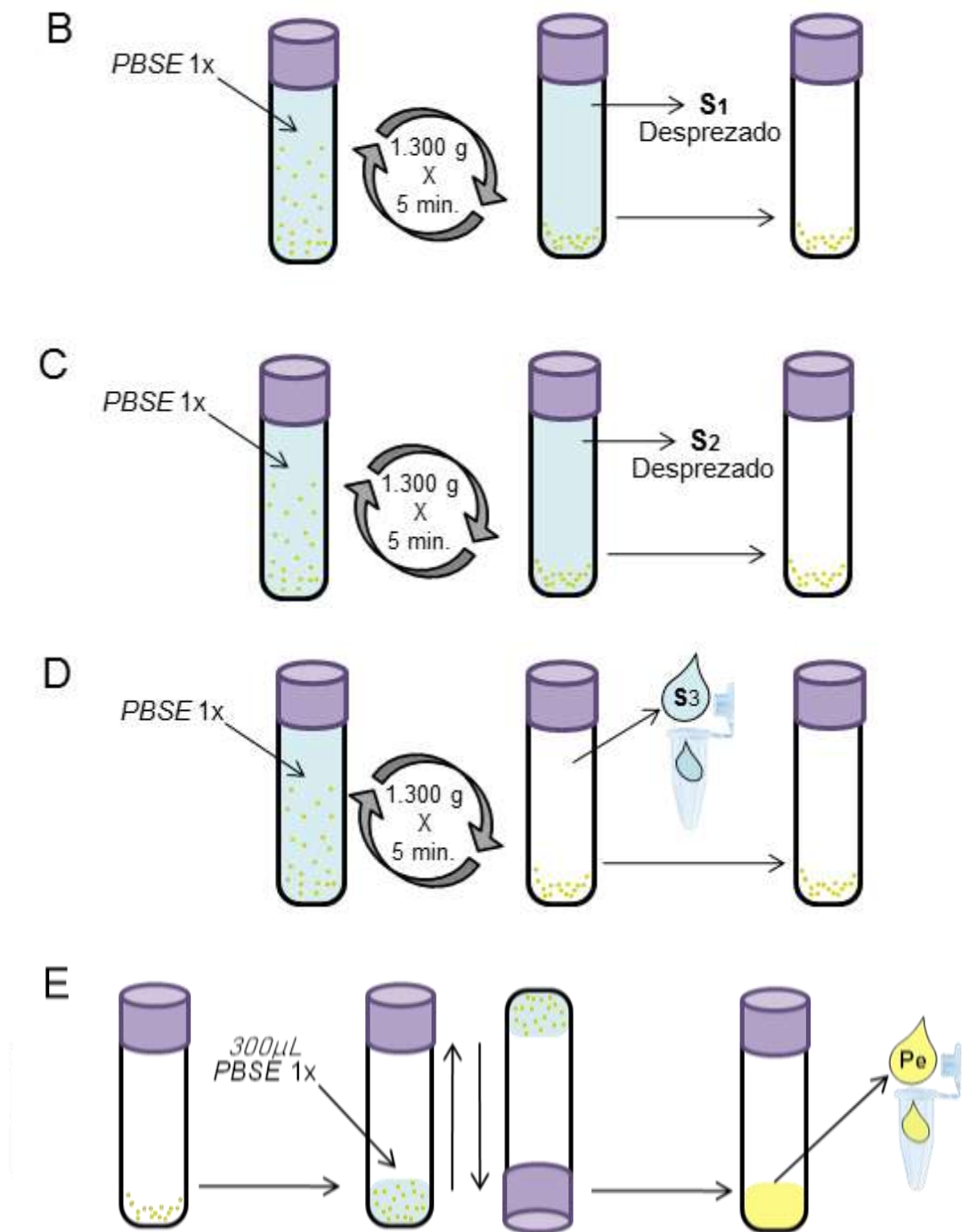


Figura 4 – Esquema representativo das etapas de lavagem das plaquetas incubadas *in vitro* com o ZIKV: Centrifugação de 1.300g x 5min; PBSE (PBS + EDTA); (A) Plaquetas incubadas *in vitro* transferidas para um novo tubo com PBSE, sobrenadante inicial (Si) armazenado em microtubo; (B) Adição de PBSE para 1º lavagem, sobrenadante da 1º Lavagem (S1) desprezado; (C) Adição de PBSE para 2º lavagem, sobrenadante da 2º Lavagem (S2) desprezado; (D) Adição de PBSE para 3º lavagem, sobrenadante da 3º Lavagem (S3) armazenado em microtubo; (E) Pélete de plaquetas lavadas (Pe) ressuspendido e armazenado em microtubo. Fonte: própria do autor.

4.4 - Extração de ácidos nucleicos (RNA e DNA)

Para a extração de RNA viral, foram utilizados 150µL das alíquotas feitas na etapa de lavagem das plaquetas incubadas (Si, S3 e Pe). A extração foi realizada utilizando o kit QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, USA), conforme recomendações do fabricante. Por fim, o RNA viral foi eluído em 50µL de água ultrapura e livre de material genético.

Para a extração de DNA, foi utilizado 200µL do sangue total armazenado e a extração foi realizada utilizando o QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN, USA), conforme recomendações do fabricante. O DNA foi eluído em 60µL de água ultra pura e livre de material genético.

4.5 - Reação em cadeia da Polimerase em Tempo Real precedida de transcriptase reversa (RT-qPCR)

A detecção do RNA viral e da carga viral foi realizada por RT-qPCR de 1 etapa com kit GoTaq® (GoTaq® 1-Step RT-qPCR System). A reação de RT-qPCR foi realizada no equipamento de PCR em tempo real 7500 (Thermo Fisher, USA), utilizando SYBR Green para detecção da amplificação. Foram utilizados *primers* específicos para a região conservada da proteína de replicação viral NS5: Forward (5-AGGATCATAGGTGATGAAGAAAAGT-3) e Reverse (5-CCTGACAACACTAAGATTGGTGC-3) nas etapas de cDNA e amplificação.

Para quantificação da carga viral por RT-qPCR foi preparado uma reação contendo 10µL de GoTaq Master Mix (Promega); 0,4µL de cada iniciador à 10µM; 0,4µL da enzima GoScribe; 5µL de RNA extraído; e 3,8µL de água ultra pura para completar o volume final de 20µL da reação. No aparelho foi então programado, uma ciclagem única de 55°C por 15 para polimerização do cDNA e 95°C por 10 minutos para inativação da enzima de transcrição reversa (GoScribe), em seguida 40 ciclos de amplificação constituídos por 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Por fim, a curva de dissociação (curva de melting) padrão do equipamento.

4.6 - Genotipagem dos Antígenos Plaquetários Humanos (HPA)

O DNA extraído foi utilizado para genotipagem plaquetária dos sistemas HPA-1 e HPA-3 por PCR- *sequence-specificprimers* (SSP) conforme descrito por Kluter e colaboradores (1996) e, do sistema HPA -5, por PCR- restriction fragmente length polymorphism (RFLP) descrito por Kalb e colaboradores (1994). Como controle interno de reação de PCR foi utilizada o gene constitutivo da proteína C reativa (CRP). Os *primers* utilizados para genotipagem estão listados na tabela 2.

Tabela 2: Sequência de *primers* utilizados para genotipagem plaquetária dos sistemas HPA-1, -3 e 5.

Sistema	Especificidade	Nome	Sequência (5' _ 3')
HPA-1 ⁽¹⁾	1a	HPA-1a-I	ACT TAC AGG CCC TGC CTC T
	1b	HPA-1b-I	ACT TAC AGG CCC TGC CTC C
	Comum a -1	HPA-1-II common	GTG CAA TCC TCT GGG GAC T
HPA-3 ⁽¹⁾	3a	HPA-3a-II	GGG GGA GGG GCT GGG GA
	3b	HPA-3b-II	GGG GGA GGG GCT GGG GC
	Comum a -3	HPA-3-I common	GGC CCT GGG ACT GTG AAT G
HPA-5 ⁽²⁾	GPIa	GPIa-Fow	GTG ACC TAA AGA AAG AGG
		GPIa-Rev	CTC TCA TGG AAA ATG GCA G
Controle Positivo ⁽¹⁾	CRP	CRP-I	CCA GCC TCT CTC ATG CTT TTG GCC AGA CAG
	CRP	CRP-II	GGG TCG AGG ACA GTT CCG TGT AGA AGT GGA

⁽¹⁾*primers* descritos por KLUTER et al., 1996; ⁽²⁾*primers* descritos por KALB et al., 1994

Na genotipagem PCR-SSP foram utilizadas duas combinações de *primers* em duas reações de PCR distintas, uma combinação para amplificar o gene selvagem (sem polimorfismo) e outra combinação para amplificação do gene polimórfico, desse modo identificamos a presença do polimorfismo, em heterozigose, homozigose ou a sua ausência. A especificidade da amplificação do gene polimórfico é obtida pela troca do último nucleotídeo presente na sequência do *primer*, o qual representa a troca de nucleotídeo do polimorfismo no DNA.

A reação de PCR-SSP foi realizada com 1X *Buffer* (*Invitrogen, Life Technologies*), 0,2mM de dNTP (*Applied Biosystems*) 2,0mM de MgCl₂ (*Invitrogen, Life Technologies*), 10µM de cada *primer* do controle interno (CRP), 10µM de cada

primer específico, 50ng de DNA genômico, 0,1μL de *PLATINUM Taq DNA Polimerase* (Invitrogen, Life Technologies) e água ultrapura para completar o volume de 20μL da reação. As condições de ciclagem foram 95°C por 10 minutos, 10 ciclos de 95°C por 30 segundos, 69°C por 20 segundos e 72°C por 30 segundos, 25 ciclos de 95°C por 30 segundos, 63°C por 20 segundos e 72°C por 30 segundos, com uma etapa final de extensão de 72°C por 5 minutos.

Foram aplicados 5μL do produto de PCR acrescido de 2μL do intercalante de material genético, GelRed, usado para evidenciar a amplificação no gel de agarose 2%. A corrida eletroforética foi realizada a 100 volts, por 60 minutos em tampão TBE (Tris-Borato 45mM/EDTA 1mM). A visualização foi realizada sob luz ultravioleta (UV). Somente foram genotipadas amostras que apresentaram a banda de controle interno de 440 pares de base (pb).

A genotipagem por PCR-RFLP ocorreu em duas etapas, na primeira etapa tivemos a amplificação de uma região da glicoproteína onde está localizada o polimorfismo do HPA-5. Essa amplificação foi confirmada em gel de agarose 2% com a presença de uma banda de 274pb. Com a amplificação confirmada, foi realizada a segunda etapa, uma restrição enzimática, em que o sítio de clivagem da enzima é específico para a região polimórfica. Dessa forma, se o DNA não apresentar o polimorfismo, a enzima irá clivar o material genético, apresentando uma banda de 136pb. Já o material genético sendo polimórfico, não ocorrerá a clivagem e a banda apresentada será de 169pb. Essa enzima também cliva um fragmento menor de 97pb que está localizado antes da região polimórfica, o qual funciona como controle da reação de restrição.

A reação de PCR-RFLP foi realizada com Buffer 1X (Invitrogen, Life Technologies), 0,16mM de dNTP (Applied Biosystems), 1,5mM de MgCl₂ (Invitrogen, Life Technologies), 0,3μM de cada primer (Tabela 3), 60ng de DNA, 1,0μL de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Life Technologies) e água ultrapura para completar o volume de 50μL da reação. As condições de ciclagem foram 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 50 segundos, 51°C por 40 segundos e 72°C por 90 segundos, com uma etapa final de extensão de 72°C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram submetidos à restrição utilizando 1μL da enzima MnlI (Biolab_) a 37°C overnight.

A primeira etapa da PCR-RFLP foi revelada em gel de agarose 2%, no qual foram aplicados 10µL do produto de amplificação mais 5µL do GelRed. A corrida eletroforética foi realizada a 100 volts, por 60 minutos em tampão TBE (Tris-Borato 45mM/EDTA 1mM) e a visualização foi realizada sob luz ultravioleta (UV), confirmando a amplificação pela presença de uma banda de 274pb. O produto da restrição enzimática e a genotipagem HPA-5 foi realizada em gel de poliacrilamida 6,5%. A corrida eletroforética foi realizada a 110 volts por 45 minutos em tampão TBE e para visualização do produto de restrição, os géis foram corados por nitrato de prata conforme descrito por Sanguinetti, Dias-Neto e Simpson em 1994. O marcador de peso molecular de 100pb foi utilizado nos géis para determinar o tamanho das bandas amplificadas na reação. No gel de poliacrilamida a presença da banda de 97pb representou o controle, a banda de 136pb representou o alelo “a” (selvagem) e a banda de 169pb o alelo “b” (polimórfico).

4.7 - Análises estatísticas

O teste exato de Qui-quadrado foi utilizado para investigar possíveis associações entre a frequência genotípica dos HPA -1, -3 e -5 com a capacidade do ZIKV de interagir com as plaquetas. O nível de significância estatística considerado em todos os testes foi de 0,05.

Para realização da análise estatística por Qui-quadrado os valores da carga viral do Pe e as genotipagens foram agrupados, os HPA foram separados em grupos de selvagem (aa) e polimórficos (ab; bb) e correlacionados com seus respectivos valores de carga viral em PFU (unidades formadoras de placa) por mL. Os resultados das cargas virais foram agrupados em três classificações, foram elas, baixa carga viral (<2.000 PFU/mL), média carga viral (2.000 a 10.000 PFU/mL) e alta carga viral (≥10.000 PFU/mL). A partir desses agrupamentos foi realizada a avaliação das frequências genotípicas dos sistemas HPA-1, -3 e -5 com a carga viral dessas plaquetas genotipadas.

5 – Resultados e Discussões

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a possível associação entre a genotipagem dos diferentes polimorfismos HPA e a interação do ZIKA vírus com as plaquetas, correlacionando assim, o perfil de polimorfismo HPA e a carga viral apresentada nas plaquetas incubadas *in vitro* com o vírus.

Para validação dos resultados de carga viral das plaquetas, foi analisado por RT-qPCR o sobrenadante inicial (Si), o sobrenadante da 3ª lavagem (S3) e o *pellet* de plaquetas lavadas (Pe). As amostras que apresentaram carga viral indetectáveis pela técnica de RT-qPCR receberam o valor de 0. Os dados da carga viral estão apresentados na figura 5.

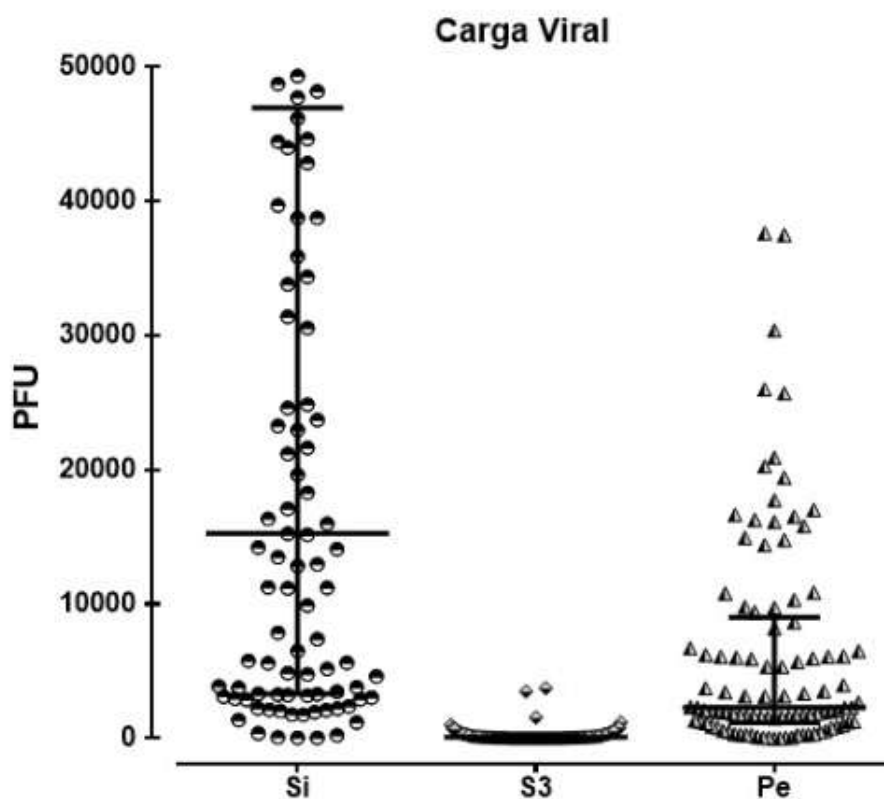


Figura 5: Quantificação da carga viral das amostras avaliadas. Valores da carga viral do: sobrenadante inicial (Si), com mediana de 15.240/PFU; sobrenadante da 3ª lavagem (S3), com mediana de 13/PFU; *pellet* de plaquetas lavadas (Pe), com mediana de 2.282/PFU. PFU: Unidades Formadoras de Placa.

Com base nos resultados apresentados, observamos as variações das cargas virais nas diferentes alíquotas após incubação, em que as plaquetas após a incubação, Si, apresentaram carga viral com valor de mediana de 15.240/PFU; o

sobrenadante da última lavagem, S3, com valor de 13/PFU; e o pellet de plaquetas lavadas, Pe, apresentou valor de 2.282/PFU. Diante da diferença das cargas virais entre as alíquotas, é possível observar que o sobrenadante inicial apresentou maior quantidade de vírus quando comparado com o sobrenadante da lavagem e do pellet. No entanto, quando comparamos o sobrenadante da lavagem com o pellet, observamos que o este último reteve maior quantidade de vírus que a lavagem, demonstrando uma possível interação entre o vírus e as plaquetas.

Os resultados da S3 demonstraram que as três etapas de lavagens foram eficazes para remoção dos vírus que não interagiram com as plaquetas durante a incubação, apresentando carga viral baixa ou indetectável. Os valores de Si e S3 foram utilizados como controles da incubação e lavagens, respectivamente, de forma que só os resultados da carga viral do Pe foram usados para avaliar a correlação entre o sistema HPA e a interação do ZIKV com as plaquetas.

Os resultados demonstraram que mesmo após lavadas, 100% das plaquetas incubadas com o ZIKV *in vitro*, apresentaram carga viral detectável com a carga viral maior quando comparado com a carga viral da lavagem. Um estudo realizado por Padovani e colaboradores em 2013 com HCV demonstrou que plaquetas expostas a esse vírus, *in vitro*, tiveram cargas virais também detectáveis após a incubação plaquetas-vírus, sugerindo a interação do HCV com a plaqueta.

Outro estudo feito por Simon, Sutherland e Pryzdial em 2015, demonstrou que o vírus da dengue apresentou capacidade de se ligar, infectar e se multiplicar nas plaquetas. Tendo em vista que o ZIKV e a DENV são da mesma família e gênero, e que ambos apresentam semelhanças estruturais e genéticas, esses dados corroboram nossos resultados e a hipótese de que o ZIKV pode interagir com as plaquetas.

Um estudo de infecção viral em plaquetas feito por Assinger em 2014 demonstrou que os vírus HIV e DENV interagem com os receptores CLEC-2 e DC-SIGN nas plaquetas, e o estudo feito em 2015 por Simon, Sutherland e Pryzdial, demonstrou a ligação e infecção da DENV através dos receptores HSP e DC-SIGN. Ainda, um estudo feito por Hamel e colaboradores em 2015, descreveu que o receptor DC-SIGN é utilizado pelo ZIKV para interagir com outras células. Diante dos nossos resultados e dos achados na literatura, da interação de outros flavivirus com

as plaquetas, *in vitro*, e da utilização do receptor DC-SIGN pelo ZIKV para interação celular, podendo sugerir uma interação do ZIKV com as plaquetas, *in vitro*.

Contudo, como os resultados aqui apresentados foram obtidos a partir de infecção *in vitro* de plaquetas, a interação *in vivo* pode apresentar ação sinérgica de outros fatores biológicos, os quais podem dificultar a interação com as plaquetas. Com isso, novos estudos devem ser conduzidos utilizando o isolamento e detecção do vírus a partir de plaquetas obtidas de pacientes com infecção ativa pelo ZIKV para o melhor entendimento de seu mecanismo de interação.

Após as análises das cargas virais, as amostras seguiram para a genotipagem HPA. Os produtos da PCR-SSP (HPA-1 e -3) foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 2%, como apresentado na figura 6.



Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose 2% da PCR-SSP: Amplificação da PCR *sequence-specific primers* (SSP); HPA: *Human Platelet Antigens*; Primeiro poço: marcador de peso molecular de 100pb; 440pb; controle; 196pb: banda do HPA-1; 290pb: banda do HPA-3. Fonte, próprio autor.

As bandas de 440pb são referentes ao controle interno e garantem a eficiência da reação de PCR. A presença de uma banda de 196pb representa a amplificação da região do HPA -1 e a de 290pb representa a amplificação do HPA -3. Doadores que apresentaram amplificação para os alelos “a” e “b” foram genotipadas como heterozigotos para o polimorfismo, amplificação de somente um alelo, homozigotos, selvagem para o alelo “a” e polimórfico para o alelo “b”.

A primeira etapa da genotipagem do HPA-5 por RFLP foi visualizada por eletroforese em gel de agarose 2%, como apresentado na figura 7. A amplificação de uma banda de 274pb confirma a amplificação da região do HPA-5.

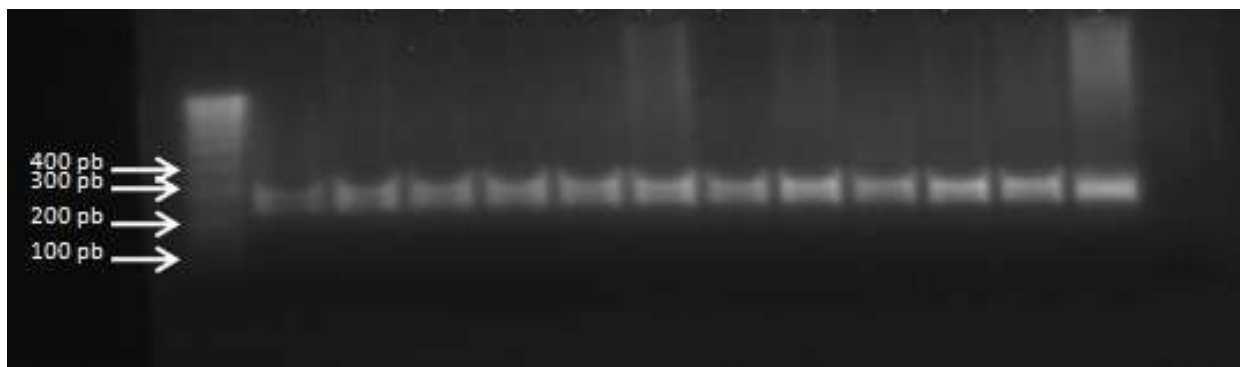


Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose 2% da PCR-RFLP. Amplificação da primeira etapa da PCR- restriction fragmente length polymorphism (RFLP); Amplificação confirmada pela presença da banda de 274 pb. Fonte, próprio autor.

Em seguida o produto de restrição foi visualizado por eletroforese em gel de poliacrilamida 6,5%, corado com nitrato de prata, figura 8.

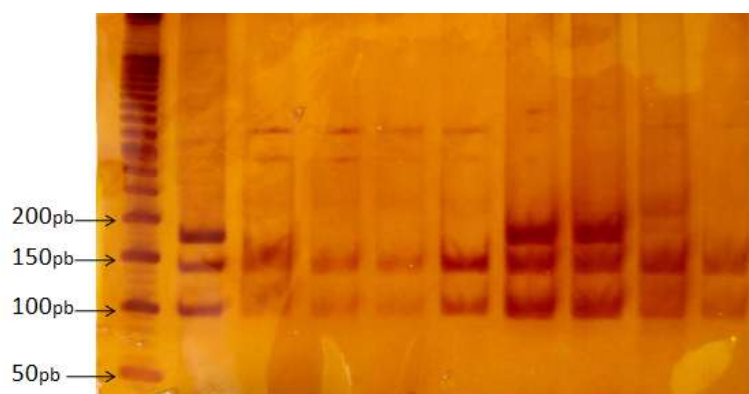


Figura 8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 6,5%, da PCR-RFLP. Gel de poliacrilamida 6,5% corado com nitrato de prata; PCR- RFLP: restriction fragmente length polymorphism; HPA: *Human Platelet Antigens*; 97pb: controle interno; 136pb: banda do alelo a; 169pb: banda do alelo b. Fonte, próprio autor.

Os resultados da genotipagem do HPA-5 são interpretados de acordo com o padrão de bandas obtido no gel de poliacrilamida. A presença de duas bandas de 97pb e 136pb caracteriza o genótipo HPA -5a/5a (gene selvagem), duas bandas de 97pb e 169pb o genótipo HPA -5b/5b (polimorfismo em homozigose) e três bandas de 97pb, 136pb e 169pb o genótipo HPA -5a/5b (polimorfismo em heterozigose). Na figura 9 estão expostas as genotipagens das plaquetas que passaram pelas etapas de infecção celular e detecção do vírus.

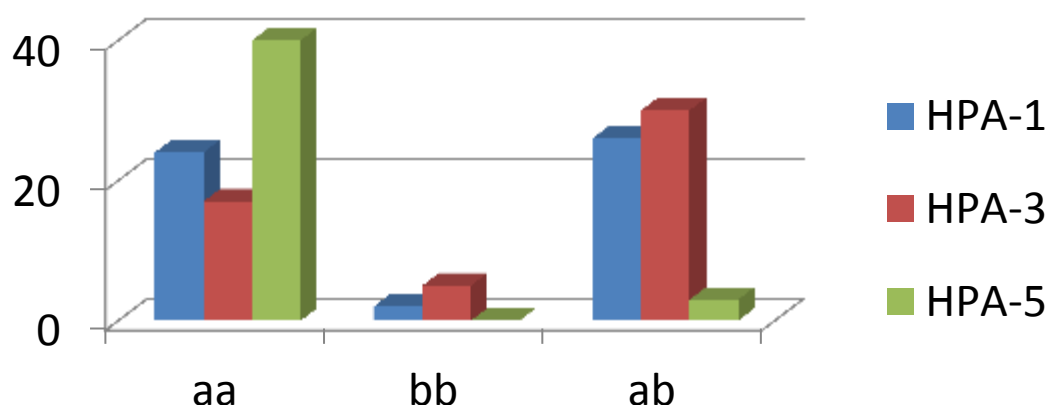


Figura 9: Genotipagem HPA-1, HPA-3 e HPA-5 dos doadores. Identificação: 48,4% homozigotos 1a/1a; 3,1% homozigotos 1b/1b; 48,4% heterozigotos 1a/1b; 32,8% homozigotos 3a/3a; 10,9% homozigotos 3b/b; 56,2% heterozigotos 3a/3b; 82,8% homozigotos 5a/5a; 17,2% heterozigotos

Segundo Metcalfe e colaboradores (2013), o alelo “a” dos HPA é encontrado em maior frequência na população, e o “b” em uma frequência menor. Na figura 9, observamos uma alta prevalência do alelo polimórfico “b” em heterozigose no HPA-3, a baixa prevalência deste em heterozigose e homozigose no HPA-5, e frequência similar dos alelos no HPA-1.

Em 2008 um estudo realizado por De Le Vega Elena e colaboradores na população da Argentina, demonstrou em seus resultados uma alta prevalência do genótipo “aa” para os HPA-1 e -5 (76,6% e 86,5%, respectivamente), bem como uma alta prevalência do alelo “ab” para o HPA-3 (43,2%).

Em um estudo realizado por Adorno e colaboradores (2010) em Salvador, Bahia, com pacientes falciformes, demonstrou a alta prevalência do genótipo “aa” nos HPA-1 e -5 (68,8% e 70,1% respectivamente) e a do “ab” no HPA-3 (50,0%).

O estudo de Conti e colaboradores (2014) realizados com amostras de brasileiros, demonstrou que a prevalência do alelo “aa” era claramente predominante nos HPA-1 e -5 (74,0% e 82,9%, respectivamente). Já o HPA-3 evidenciou uma maior prevalência do genótipo “ab” (44,3%) em comparação ao genótipo “aa” (43%). Com isso, verifica-se que os dados da literatura sofre a frequência dos genótipos HPA-1, -3 e -5 são similares aos resultados encontrados em nosso estudo.

Após serem feitas as genotipagens, as amostras foram agrupadas em grupos selvagens e polimórficos para realização da análise estatística. Em seguida, analisamos a correlação entre o polimorfismo HPA e a carga viral encontrada nas

plaquetas. Os valores da análise estatística por Qui-quadrado estão expostos na tabela 3.

Tabela 3: Análise estatística da frequência genotípica e alélica.

HPA-1	Carga Viral (PFU/mL)			<i>p</i>
	Baixa	Média	Alta	
Frequência genotípica				
aa	7	11	13	0,0140
ab/bb	16	11	6	
Frequência alélica				
a	30	32	31	0,2461
b	16	12	7	

HPA-3	Carga Viral (PFU/mL)			<i>p</i>
	Baixa	Média	Alta	
Frequência genotípica				
aa	8	8	5	0,7672
ab/bb	15	14	14	
Frequência Alélica				
a	29	27	23	0,9937
b	18	17	15	

HPA-5	Carga Viral (PFU/mL)			<i>p</i>
	Baixa	Média	Alta	
Frequência genotípica				
aa	16	18	18	0,1145
ab/bb	7	4	1	
Frequência Alélica				
a	39	40	37	0,1433
b	7	4	1	

Teste de Qui-quadrado; valor-p (*p*); PFU: Unidades Formadoras de Placa; Carga Viral: Baixa (<2000), Média (2000 a 10000) e Alta (≥ 10000). Fonte, próprio autor.

A análise da frequência genotípica demonstrou significância entre a genotipagem do sistema HPA-1 e a capacidade do ZIKV de interagir com as plaquetas, com valor de p igual a 0,0140. Já a análise da frequência alélica não demonstrou significância estatística. Diante do resultado da frequência genotípica foi possível sugerir que a presença do polimorfismo no perfil HPA-1 dificulta a ligação do vírus com as plaquetas, pois quando há a presença do alelo polimórfico, a carga viral é relativamente mais baixa quando comparado ao alelo selvagem.

Os estudos com o polimorfismo HPA já demonstram associação destes as infecções virais, tais como, DENV, monoinfecção por VHC e coinfecção HCV/HIV. Silva e colaboradores em 2012 demonstrou uma associação entre o polimorfismo em heterozigose, HPA -1a/1b, com o rápido desenvolvimento da fibrose hepática em pacientes monoinfectados pelo VHC. Já Grotto e colaboradores em 2016, observou que em coinfecção HIV/VHC houve a perda desse rápido efeito na progressão da fibrose hepática em pacientes com esse mesmo polimorfismo HPA.

O trabalho de Soundravally e Hoti em 2007, com a genotipagem HPA e a interação do vírus da Dengue com as plaquetas, demonstrou uma correlação entre os genótipos HPA 1a/1a e HPA 2a/2b com a DHF (febre hemorrágica da dengue). Ademais, o genótipo HPA 1a/1b foi determinado como um fator de risco genético para DSS (síndrome do choque da dengue).

Assim, trabalhos de genotipagem HPA e sua correlação com *flavivirus*, somados à semelhança entre o DENV e o ZIKV, além da determinação da presença do polimorfismo em heterozigose no HPA-1 como fator de risco para a DSS, corroboram com a hipótese e resultados de que o polimorfismo HPA está envolvido na interação do ZIKV com as plaquetas.

Diante dos nossos resultados e dos achados na literatura, sugere-se a capacidade do ZIKV em interagir com as plaquetas e que o polimorfismo no HPA-1 está envolvido com essa interação, tendo em vista que a presença do polimorfismo nesse HPA mantém a carga viral baixa. Estudos *in silico* podem ser conduzidos a fim de elucidar melhor a interação do HPA-1 com o ZIKV.

6 – Conclusão

Os nossos dados sugerem um mecanismo de interação entre o ZIKV e as plaquetas, *in vitro*, e os resultados da genotipagem HPA demonstraram associação entre a presença do polimorfismo no HPA-1 e a afinidade do ZIKV em se ligar as plaquetas. Outras moléculas presentes na superfície plaquetária ainda devem ser estudadas como possíveis receptores/correceptores para o vírus e a interação do vírus com as plaquetas, *in vivo*, uma vez que foi comprovado a interação do ZIKV com plaquetas *in vitro*.

Bibliografia

ADORNO, E.V. et al. Antígenos plaquetários humanos HPA1, HPA3 e HPA5 e risco de eventos vaso-oclusivos em portadores de anemia falciforme de Salvador–Bahia. **Gazeta Médica da Bahia**, n. 3, 2010.

ALTER, J.J.; HOUGHTON, M. Clinical Medical Research Award Hepatitis C virus and eliminating post-transfusion hepatitis. **Nat Med**. v.6, p. 1082–6, 2001.

ALMEIDA, A.J. et al. Hepatitis C virus-associated thrombocytopenia: a controlled prospective, virological study. **Ann. Hematol.**, v.83, p.434-40, 2004.

ARAUJO, L.M.; FERREIRA, M.L.B.; NASCIMENTO, O.J.M. Guillain-Barré and Zika in Brazil. **Arq Neuropsiquiatr**. v.74, n.3, p.253-5, 2016.

ARIEDE, J.R. et al. Platelets can be a biological compartment for the Hepatitis C Virus. **Braz J Microbiol**. v.46, n.2, p.627-9, 2015.

ASSINGER, A. Platelets and Infection - an emerging role of platelets in viral Infection. **Frontiers in Immunology**, v.5, 2014.

BARJAS-CASTRO, M.L. et al. Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. **Transfusion**. v.56, n.7, p.1684-8, 2016.

BRAND, C.; BISAILLON, M.; GEISS, B.J. Organization of the *Flavivirus* RNA replicase complex. **Wiley Interdiscip Rev RNA**. v.8, n.6, 2017.

BELL, T.M.; FIELD, E.J.; NARANG, H.K. Zika virus infection of the central nervous system of mice. **Archiv f. Virusforschung**. v.35, p.183-93, 1971.

BERDITCHEVSKI, I.F. Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. **J. Cel. Sci**. v.114, p.4143-51, 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE GESTÃO DO TRABALHO E DA EDUCAÇÃO NA SAÚDE. **Zika abordagem clínica na atenção básica**. UFMS, FIOCRUZ, UNA-SUS; Brasília, 2016. Disponível em: http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/08/ZIKA_ABORDAGEM_CLINICA_NA_ATENCAO_BASICA_2016.pdf

BERGELSON, J.M. et al. Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1. **Science**, v.255, n.5052, p.1718–20, 1992.

BUSSEL J, KAPLAN C. The fetal and neonatal consequences of maternal alloimmune thrombocytopenia (Review). **Baillieres Clin Haematol**. v.11, p.3911-8, 1998.

CHARO, I.F.; KIEFFER, N.; PHILLIPS, D.R. Platelet membrane glycoproteins. *In*: COLWAN, W. et al. (Eds.). – Hemos. and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Company, p. 489-507, 1994.

CHAVEZ, J.H. et al. Domain III peptides from *flavivirus* envelope protein are useful antigens for serologic diagnosis and targets for immunization. **Biologicals**, v.38, l.6, p.613-8, 2010.

CLEMETSON, K.J. et al. Functional expression of CCR1, CCR3, CCR4, and CXCR4 chemokine receptors on human platelets. **Blood**.v.96, p.4046-54, 2000.

CONTI, F. et al. Molecular HPA genotyping by microarray in Brazilian blood donors. **Transfusion**, v. 54, n. 2, p. 405-11, 2014.

CURTIS, B. R.; MC-FARLAND, J. G. Human platelet antigens–2013. **Vox sanguinis**. v.106, n.2, p. 93-102, 2014.

DE LA VEGA ELENA, C. D. et al. Human platelet-specific antigens frequencies in the Argentinean population. **Transfusion medicine**, v. 18, n. 2, p. 83-90, 2008.

DHURAT, R.; SUKESH, M. Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: A review and author's perspective. **J CutanAesthet Surg**. v.7, n.4, p.189, 2014.

DICK, G.W.; KITCHEN, S.F.; AND HADDOW, A.J. Zikavirus.I Isolations and serological specificity.**Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**. v.46, p.509–20, 1952.

ELENA, C.D.V. Genotipificación de los sistemas de antígenos plaquetarios humanos HPA-1, -3 y 5 endonantes de sangre y Aborígenes Tobasen Rosario, Argentina. **Tese (Doutorado)** - Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada. 2007.

FARIA, N.R. et al. Zika virus in the Americas: early epidemiological and genetic findings. **Science**.v.352, p.345–9, 2016.

FARQUHAR, M.J.; HARRIS, H. J.; MCKEATING.J.A.Hepatitis C virus entry and the tetraspanin CD81.**BiochemSoc Trans**. v.39, p.532-6, 2011.

FAYE, O. et al. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. **PLoS Negl Trop Dis**. v.8, n.1, p.1-10.e2636, 2014.

Foy, B.D. et al. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA.**Emerg Infect Dis**. v.17, n.5, p. 880-2. 2011.

FU, J.; SHA, B.E.; THOMAS, L.L.HIV-1-infected peripheral blood mononuclear cells enhance neutrophil survival and HLA-DR expression via increased production of GM-CSF. Implications for HIV-1 infection.**JAcquir Immune DeficSyndr**.v.56, n.1, p.16-25,2011.

GITLIN, L. et al. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis virus. **Proc Natl Acad Sci USA**.v.103, n.22, p.8459–64, 2006.

GREVE, J.M. et al. The major human rhinovirus receptor is ICAM-I. **Cell**.v.56, p.839-47, 1989.

GROTTO, R. M. T. et al. Human platelets antigens influence the viral load of platelets after the interaction of the platelets with HCV and HIV *in vitro*. **Rev Soc Bras Med Trop**. v.49, n.4, p.491-3, 2016.

HAMAIA, S.; LI, C.; ALLAIN, J.P. The dynamics of hepatitis C virus binding to platelets and 2 mononuclear cell lines. **Blood**.v.98, p.2293-300, 2001.

HAYES, E. Zika virus outside Africa. **Emerg Infect Dis**. v. 15, n. 9, p. 1347-50. 2009.

HAMEL, R. et al. Biology of Zika virus infection in human skin cells. **Journal of Virology**. v. 89, n. 17, p. 8880–96. 2015.

HUEN, A.O.; ROOK, A.H. Toll receptor agonist therapy of skin cancer and cutaneous T-cell lymphoma. **Curr Opin Oncol**.v.26, n.2, p.237–44, 2014.

IOOS, S. et al. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Med Mal Infect**. v.44, p.302-7, 2014.

KALB, R. et al. Localization of the Br polymorphism on a 144bp exon of the GPIa gene and its application for platelet DNA typing. **Thromb Haemost**.v.71, p.651-4, 1994.

KAPLAN, C. Neonatal alloimmune thrombocytopenia: a 50-year story. **Immunohematology**.v.23, n.1, p 9-13, 2007.

KELL, A.M.; GALE M. RIG-I in RNA virus recognition. **Virology**.v.479, p.110–21, 2015.

KOSTYUCHENKO, V.A. et al. Structure of the thermally stable Zika virus. **Nature**.v.533, p.425-3, 2016.

KUHN, R.J. et al. Structure of dengue virus: implications for *flavivirus* organization, maturation, and fusion. **Cell**.v.108, p.717–25, 2002.

KÜLTER, H. et al. Rapid typing for human platelet antigen systems -1, -2, -3 and -5 by PCR amplification with sequence-specific primers. **Vox Sang**. v.71, p.121-5, 1996.

KUNO, G. et al. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. **J Virol**.v.72, p.73–83, 1998.

- KUNO, G.;CHANG, G.J.Full-length sequencing and genomic characterization of agaza, Kedougou, and Zika viruses. **Arch Virol**, v.152,p.687-96, 2007.
- LANCIOTTI, R. S., etal.Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerg Infect Dis**.v.14, n.8, 8pgs. 2008.
- LANCIOTTI, R. S., etal.PhylogenyofZika Virus in Western Hemisphere, 2015. **Emerg Infect Dis**. v.22, n.5, p.933–5, 2016.
- LEFKOVITS, J.; PLOW, E.F.; TOPOL, E.J. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine.**N. Engl. J. Med.**, v.332, p.1553-59, 1995.
- Li RS, Qiao ZL, Ling B, Lu P. Establishment of reference panel for human platelet antigen genotyping.**Vox sanguinis**. 2014.
- LIMON-FLORES, A.Y. et al. Dengue virus inoculation to human skin explants: an effective approach to assess in situ the early infection and the effects on cutaneous dendritic cells. **Int J ExpPathol**. v.86, p.323–34, 2015.
- LINDENBACH, B.D.; RICE, C.M. Molecular biology of *flavivirus* es. **Adv.Virus Res**. v.59, 23–61. 2003.
- LUCAS, G.F.; METCALFE, P. Platelet and granulocyte polymorphisms.**Transfus Med**. v.10, p.157-74, 2000.
- LYNCH, S. E. The role of growth factors in periodontal repair and regeneration.**In**: Polson, A. M. Periodontal regeneration. Current Sstatus and Ddirections. Illinois, Quintessence, 1994.
- MA, F. et al. Development of human lymphohematopoietic stem and progenitor cells defined by expression of CD34 and CD81. **Blood**, v.97, n.12, p.3755-62, 2001.
- MANSUY, J.M. et al. Zika virus: high infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen?.**LancetInfect.Dis**.v.16, p.405, 2016.
- MC-CRAE, A.W.R.; KIRYA, B.G. Yellow fever and Zika virus epizootics and enzootics in Uganda.**Trans R Soc Trop Med Hyg**. v. 76, p.552-62, 1982.
- METCALFE, P. et al. Human platelet antigen-2and-3 genotyping by PCRSSP.**Transfus.Med**.v.5, n.4, p.285-8, 1995.
- METCALFE, P. et al. Nomenclature of human platelet antigens. **Vox Sang**.v.85, n.3, p.240-5, 2003.
- MLAKAR, J. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. **N. Engl. J. Med**. v.374, p.951–8, 2016.

MOTTA, L.J. et al. Evidence for Transmission of Zika Virus by Platelet Transfusion. **NEngl J Med**.v.375, n.11, p.1101-3, 2016.

MUSSO, D. et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. **Euro Surveill**.v.19, n.14, p.1-3, 2014.

MUSSO, D.; CAO-LORMEAU, V.M.; GUBLER, D.J. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya?. **Lancet**.v.386, n.9990, p.243-4, 2015.

Nei M, Tajima F, Tateno Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. **Journal of molecular evolution**.v.19, n.2, p.153-70, 1983.

OLINGER et al. CD4-Negative Cells Bind Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Efficiently Transfer Virus to T Cells. **J. Virol**.v.74, n.18, p.8550-7, 2000.

OLINGER et al. Cellular Factors Influence the Binding of HIV Type 1 to Cells. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**.v.18, n.4, p.259-67, 2002.

PADOVANI, J.L. et al. In vitro detection of hepatitis C virus in platelets from uninfected individuals exposed to the virus. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 46, n.2, p.154-5, 2013.

PANYASRIVANIT, M. et al. Induced autophagy reduces virus output in dengue infected monocytic cells. **Virology**.v.418, i.1, p.74–84, 2011.

PETERSEN, E. et al. Rapid Spread of Zika Virus in The Americas - Implications for Public Health Preparedness for Mass Gatherings at the 2016 Brazil Olympic Games. **Int. J. Infect. Dis**. v.44, p.11–5, 2016.

PETERSON, Julie A. et al. Neonatal alloimmune thrombocytopenia: pathogenesis, diagnosis and management. **British journal of haematology**, v. 161, n. 1, p. 3-14, 2013.

PICELLI, N. et al. The absence of the human platelet antigen polymorphism effect on fibrosis progression in human immunodeficiency virus-1/ hepatitis C virus coinfecting patients. **Rev Soc Bras Med Trop**. v.48, n.4, p.406-9, 2015.

PUGLIESE, A. et al. HCV infective virions can be carried by human platelets. **Cell Biochem Funct**.v.22, p.353-8, 2004.

ROEHRIG, J. T. Antigenic Structure of *Flavivirus* Proteins. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 141–175, 2003.

RUGGERI, Z.M. Mechanisms initiating platelet thrombus formation. **Thromb Haemost.**, v.78, n.1, p.611-616, 1997.

RUGGERI, Z.M. Platelets in atherothrombosis. **Nat.Med.**, v.8, p.1227-1234, 2002.

RUSSO F.B. et al. Zika infection and the development of neurological defects. **Cell Microbiol.** v.19, n. 6, e12744, 2017.

Simon, A. Y.; Sutherland, M. R.; Pryzdial, E. L. Dengue virus binding and replication by platelets. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology.** v.126, p.378-85, 2015.

SALIGNAC, S. et al. Platelet Counting. **In: Methods in molecular biology** (Clifton, NJ). p. 193–205, 2013.

SADLER, A.J. The role of MDA5 in the development of autoimmune disease. **J Leukoc Biol.** v.103, n.2, 2017.

SAKKAS, H. et al. An Update on Sexual Transmission of Zika Virus. **Pathogens.** v.7. n.3, p.66, 2018.

SCHROEDER, M.L; RAYNER, H.L. Red cell, platelet and white cell antigens. **In: LEE, G.R. et al. Wintrobe's clinical hematology.** 9.ed. Philadelphia: Lea &Febiger. v.1, cap.20.p.616-50, 1993.

SILVA, G.F. et al. Human Platelet Antigen (HPA) genotype is associated with fibrosis progression in chronic hepatitis C. **J Med Virol.** v.84, p.56-60, 2012.

SIMMONDS, P. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 1, p. 2–3, 2017.

SINGH, Meera V. et al. Preventive and therapeutic challenges in combating Zika virus infection: are we getting any closer?. **Journal of neurovirology**, v. 23, n. 3, p. 347-357, 2017.

SIROHI, D. et al. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. **Science.** v.352, p.467–70. 2016.

SJOBRING, U.; RINGDAHL, U.; RUGGERI, Z. M. Induction of platelet thrombi by bacteria and antibodies. **Blood**, v.100, n.13, p.4470–7, 2002.

SOUNDRAVALLY, R.; HOTI, S.L. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever and shock syndrome: role of TAP and HPA gene polymorphism. **Hum Immunol.** v.68, p.973-9, 2007.

TAPPE, D.; NACHTIGALL, S.; KAPAUN, A.; SCHNITZLER, P.; GUNTHER, S.; SCHMIDT-CHANASIT, J. Acute Zika Virus Infection after Travel to Malaysian Borneo, September 2014. **Emerging Infectious Diseases.** v. 21, n. 5, 2015.

TERADA, H. et al. Interaction of Influenza Virus with Blood Platelets. **Blood.** v.28, p.213-28, 1966.

TORALLES-PEREIRA, C. et al. The first report of the human platelet alloantigen 4b allele in a Brazilian Short Communication. **Int J Immunogenet.** v.32, n.3, p.165-6, 2005.

VANDERGAASST, R.; FREDERICKSEN, B.L. West Nile virus (WNV) replication is independent of autophagy in mammalian cells. **PLoS One.**v.7, e.45800, 2012.

VERDICHIO-MORAES, C.F. et al. Allelic frequencies of HPA-1 to -5 human platelet antigens in hepatitis C virus-infected patients.**J. Med. Virol.**, v.81, p. 757-9, 2009.

WICKHAM, T.J. et al. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. **Cell.**v.73, p.309-19, 1993.

XU, X. et al. Simultaneous genotyping of human platelet antigen-1 to 17w by polymerase chain reaction sequence-based typing. **Vox Sang.** v.97, n.4, p.330-7, 2009.

XU, X et al. RIG-I: a multifunctional protein beyond a pattern recognition receptor. **Protein Cell**, .v.8, n.3, p.246-53, 2018.

Zahn, A. et al. Hepatitis C virus interacts with human platelet glycoprotein VI. **J Gen Virol**, v.87, n.8, p.2243–51, 2006.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **MemInst Oswaldo Cruz.** v.110, p.569–72, 2015.

ZHANG, X. et al. Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. **Nature structural & molecular biology**, v. 20, n. 1, p. 105-110, 2013.

Anexo

Anexo 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) RESOLUÇÃO 466/2012

CONVIDO, o Senhor (a) _____ para participar do Projeto de Pesquisa intitulado "Detecção de ZIKA Vírus (ZIKV), após exposição in vitro, em Células Mononucleares do sangue periférico e Plaquetas provenientes de indivíduos não infectados: Influência de Polimorfismos Genéticos", que será desenvolvido por mim: Profa. Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto, Farmacêutica-Bioquímica e professora da Faculdade de Ciências Agrônomicas (FCA), UNESP, e pela Profa Dra Maria Inês de Moura Campos Pardini da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), UNESP, com a colaboração do Prof. Dr. Rafael Plana Simões, também professor da Faculdade de Ciências Agrônomicas.

Estou estudando um vírus, o ZIKA vírus e, sua capacidade de ligação com células e/ou pedaços de células.

O nosso sangue, além da parte líquida, tem uma parte celular composta pelos glóbulos vermelhos que transportam oxigênio, glóbulos brancos, que temos muitos tipos e que ajudam na defesa do nosso corpo e, também, pelas plaquetas, pequenas partículas envolvidas no processo de coagulação do sangue.

Sua participação nesta pesquisa se dará por ser **uma pessoa saudável**, sem nenhum tipo de doença. Para que eu possa avaliar se o vírus é capaz de se ligar a alguns tipos de glóbulos brancos e plaquetas preciso obter esses fragmentos celulares de **pessoas saudáveis**, sem nenhuma doença.

Para que eu possa ter um resultado nesse momento preciso coletar 10ml do seu sangue se o sr (a) quiser participar do estudo. Esclareço ao sr (a) que o sangue coletado será utilizado para separação das células mononucleares do sangue periférico (um tipo de glóbulo branco) e plaquetas. O risco com a coleta de sangue será a picadinha da agulha e uma manchinha roxa que desaparecerá bem rapidamente.

Além disso, apesar de parecer que todas estas células são iguais elas apresentam pequenas diferenças entre as pessoas. Essas diferenças são devido a algumas proteínas que ficam expostas na parte de fora destas células. São diferenças muito pequenas que chamamos polimorfismos.

O sangue que o sr (a) irá fornecer, se concordar em participar deste estudo, também, será utilizado para determinar quais tipos de proteínas estão presentes na parte de fora destas células (glóbulo branco e plaquetas).

Informo que o sangue que o sr (a) irá fornecer irá ser utilizado **somente** para estas finalidades.

Informo que o material biológico (sangue) colhido do(a) senhor(a) será armazenado, depois da coleta, na Faculdade de Medicina até o momento de sua utilização para as finalidades descritas neste documento. Este armazenamento será realizado apenas durante a realização do estudo, pois o material biológico (sangue) será utilizado em sua totalidade para o alcance dos objetivos descritos.

Este estudo não trará benefícios diretos para o sr (a) porque é uma **pessoa saudável**; no entanto, o conhecimento gerado neste estudo poderá ajudar os pesquisadores a entender melhor a infecção pelo vírus ZIKA e, no futuro, permitir o desenvolvimento de testes diagnósticos melhores que os que existem hoje. Além disso, os conhecimentos gerados podem trazer informações para os pesquisadores desenvolverem, no futuro, medicamentos e vacinas.

Fique ciente de que sua participação neste estudo é voluntária e que mesmo após ter dado seu consentimento para participar da pesquisa, você poderá retirá-lo a qualquer momento, sem qualquer prejuízo para o sr (a).

Qualquer dúvida adicional você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa através dos telefones (14) 3880-1608 ou 3880-1609 que funciona de 2ª a 6ª feira das 8.00 às 11.30 e das 14.00 às 17 horas, na Chácara Butignolli s/nº em Rubião Júnior – Botucatu - São Paulo. Os dados de localização dos pesquisadores estão abaixo descritos:

Após terem sido sanadas todas minhas dúvidas a respeito deste estudo, **CONCORDO EM PARTICIPAR** de forma voluntária, estando ciente que todos os meus dados estarão resguardados através do sigilo que os pesquisadores se comprometeram. Estou ciente que os resultados desse estudo poderão ser publicados em revistas científicas, sem no entanto, que minha identidade seja revelada.

Botucatu, ____/____/____

Pesquisador

Participante da Pesquisa

Nome Rejane Maria Tommasini Grotto
Endereço: Rua Dr Cardoso de Almeida 1367
Telefone: 14-38807227
Email: regrotto@fca.unesp.br