



**Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Saúde da Mulher,
da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira**

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E DETECÇÃO VIRAL
EM PLACENTAS DE GESTANTES INFECTADAS COM O VÍRUS
ZIKA**

Daniela Prado Cunha

**Rio de Janeiro
Abril de 2017**



**Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Saúde da Mulher,
da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira**

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E DETECÇÃO VIRAL
EM PLACENTAS DE GESTANTES INFECTADAS COM O VÍRUS
ZIKA**

Daniela Prado Cunha

Dissertação apresentada à Pós-graduação em Pesquisa Aplicada à Saúde da Criança e da Mulher, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Zilton Farias M. Vasconcelos.
Co-orientadoras: Dra Leticia da Cunha Guida e
Dra Elyzabeth Avvad Portari

**Rio de Janeiro
Abril de 2017**

CIP - Catalogação na Publicação

Cunha, Daniela Prado.

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E DETECÇÃO VIRAL EM PLACENTAS DE GESTANTES INFECTADAS COM O VÍRUS ZIKA / Daniela Prado Cunha. - Rio de Janeiro, 2017.
80 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, Rio de Janeiro - RJ, 2017.

Orientador: Zilton Zilton Farias Meira de Vasconcelos.
Co-orientadora: Leticia da Cunha Guida.
Co-orientadora: Elyzabeth Avvad Portari.

Bibliografia: f. 55-60

1. Zika Vírus. 2. Gravidez. 3. Placenta. 4. Transmissão Vertical de Doença Infecçiosa. I. Título.

Dedicatória

Dedico aos meus pais Evandro e Rossana e ao meu namorado

Gonzalo, as pessoas mais importantes da minha vida.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, meus maiores exemplos, pelo amor e apoio aos meus estudos sem medir esforços. Obrigada por acreditarem em mim. Amo vocês!

Ao meu irmão André e minha cunhada Mariana, pelo acolhimento e por me ajudarem em todas as vezes que precisei;

Ao meu irmão Lucas, que me faz aprender todos os dias a ter um coração semelhante ao de criança;

Ao meu namorado Gonzalo, pelo carinho, apoio, companheirismo e paciência nos momentos que mais precisei. Pela compreensão que apesar da distância, está o máximo possível ao meu lado. E pelo seu amor incondicional e sem medidas que me proporciona. Obrigada por me fazer feliz;

Às minhas amigas do mestrado e agora para a vida, Juliana, Maria Eduarda e Natana, por estarem ao meu lado, pelos constantes estímulos, confiança e carinho. E por proporcionarem excelentes momentos de descontrações;

Aos meus orientadores Dr Zilton e Dra Letícia, por acreditarem em mim e por me proporcionarem essa oportunidade única na minha vida. Pela qual, me fez crescer profissionalmente. A minha orientadora Dra Elyzabeth pelo seus ensinamentos e dedicação. Agradeço a todos pela confiança, paciência e carinho na condução dos nossos trabalhos;

A equipe do laboratório de Alta Complexidade, que em inúmeras vezes que precisei de ajuda, estavam sempre comigo. Especialmente ao Leonardo,

pela experiência compartilhada e por participar ativamente de todas as etapas da execução deste trabalho, além do incentivo concedido constantemente. E a Christiane, por além de ser solícita, ainda fez meus dias ficarem mais engraçados, afinal a vida também é feita de gargalhadas;

Às gestantes que participaram desta pesquisa pelo fornecimento do material biológico para execução desse trabalho;

Aos funcionários do Departamento de Anatomia Patológica e Citologia que me auxiliaram na coleta das amostras placentárias e processamento das lâminas. E especialmente, as patologistas pela execução das avaliações dos tecidos placentários;

A Ana Carolina pelo auxílio na estatística e pela paciência de sempre nos atender entre muitas idas e vindas;

Às agências de fomento CNPq e FAPERJ, pela concessão de bolsa e pelo financiamento do projeto;

Ao IFF/Fiocruz, que me acolheu e contribuiu imensamente para o meu desenvolvimento profissional e pessoal, destacando aqui os professores, os colegas de turma, os membros da secretaria acadêmica;

Agradeço também a Dra Heloisa Novaes e mais uma vez a Dra Renata Campos por ter aceitado fazer parte da minha banca de defesa. Tenho um grande respeito e admiração por vocês, e sei que a experiência de cada uma, contribuiu significativamente para enriquecer o trabalho.

Lista de abreviações e siglas

- C – Capsídeo
- CEP - Comitê de Ética em Pesquisa
- CMV - Citomegalovírus
- cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar
- DAPC - Departamento de Anatomia Patológica e Citopatologia
- DENV - Vírus Dengue
- DIPe - Enfermaria de Doenças Infecto-Parasitárias
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- E - Envelope
- EUA - Estados Unidos da América
- HE - Hematoxilina e Eosina
- HF - Hiperplasia Fibromuscular
- HIS - Hibridização In Situ
- IFF - Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira
- IG - Idade gestacional
- OMS - Organização Mundial da Saúde
- prM - pré-Membrana
- RNA - Ácido Ribonucleico
- RT-qPCR - Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase em tempo real
- SNC - Sistema Nervoso Central
- STORCH - Sífilis, Toxoplasmose, Outras infecções (como parvovirose, HIV/AIDS, varicela zoster, hepatites B e C), Rubéola, Citomegalovírus e Herpes simples
- TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- UV - Ultravioleta
- ZIKV- Zika Vírus

Unidades

- µg - Micrograma
- µl - Microlitro

C - Celcius

g - Giros

h - Hora

mL- Mililitros

mg - Miligrama

min - Minuto

nm - Nanômetro

nM - Nanomolar

μm - Micrômetro

μM – Micromolar

U - Unidade

Resumo

Introdução: O recente aumento de casos de microcefalia congênita observado no Brasil se deu alguns meses após a introdução do ZIKA vírus (ZIKV) no país, associado a relatos de gestantes com doenças febris e exantemática. A primeira evidência de transmissão perinatal/vertical do vírus da ZIKV ocorreu em 2016, onde foi possível detectar o material genômico do vírus no líquido amniótico. Portanto, o momento da infecção por ZIKV está intimamente ligado com o desenvolvimento de possíveis desfechos infantis desfavoráveis. A avaliação das alterações histopatológicas presentes no tecido placentário auxiliam no diagnóstico da transmissão vertical da infecção pelo ZIKV. **Objetivo:** Verificar a presença do ZIKV no tecido placentário após o nascimento, descrever as alterações histopatológicas placentárias e correlacionar os dados com o desfecho nos neonatos. **Métodos:** Foram incluídos 60 pacientes com confirmação diagnóstica de infecção por ZIKV. Os dados clínicos do pré-natal e pós-natal foram analisados. No tecido placentário foi realizada a detecção do genoma viral através da técnica de RT-qPCR e as alterações histopatológicas analisadas com a técnica de coloração H&E. **Resultados:** O principal sintoma relatado pela população estudada foi a lesão exantemática cutânea, estando presente em 78% dos casos. Apenas 10% das gestantes foram assintomáticas. Das placentas analisadas, 37% foram PCR positivas para ZIKV, sendo 23% dos casos com infecção ocorrendo no primeiro trimestre, 24% no segundo e 64% no terceiro. Em acordo com a literatura, este estudo também observou mais alterações no SNC e oculares dos fetos/neonatos no grupo de gestantes cuja infecção ocorreu no primeiro trimestre. As alterações histopatológicas mais observadas foram vilosidade crônica (92%), fibrose estromal (93%), hiperplasia fibromuscular da parede dos vasos vilosos de médio calibre (82%) e deciduíte crônica (70%). Essas alterações caracterizam um padrão de placentite hematogênica do tipo cicatricial, semelhante ao observado em outros tipos de infecção específica como aquelas descritas no grupo STORCH. Já a decídua normal apresentou associação com a incidência de alterações do SNC e com a carga viral aumentada. Nos casos em que a carga viral alta, o achado de decídua normal conferiu chance 7 vezes maior de apresentar alterações no SNC quando comparada com os casos de deciduíte crônica. **Conclusão:** Foi possível detectar o genoma viral no tecido placentário pela técnica de RT-qPCR, indicando assim uma persistência viral, e o exame histopatológico revelou alterações inflamatórias predominantemente cicatriciais, com importantes alterações vasculares, como observadas também em outras infecções congênitas. Além das ferramentas auxiliarem no diagnóstico de infecção intrauterina por ZIKV, também indicam um padrão de características comuns ao grupo de infecções congênitas (STORCH) revelando uma possível inclusão do ZIKV neste grupo.

Palavras-chave: Zika Vírus. Gravidez. Placenta. Transmissão Vertical de Doença Infecciosa.

Abstract

Introduction: The recent increase in cases of congenital microcephaly observed in Brazil occurred a few months after the introduction of ZIKA virus (ZIKV) in the country, associated with reports of pregnant women with febrile and exanthematous diseases. The first evidence of perinatal / vertical transmission of the ZIKV virus occurred in 2016, where it was possible to detect the genomic material of the virus in the amniotic fluid. Therefore, the timing of ZIKV infection is closely linked with the development of potential unfavorable childhood outcomes. The evaluation of the histopathological changes present in the placental tissue helps to diagnose the vertical transmission of ZIKV infection.

Objective: To verify the presence of ZIKV in the placental tissue after birth, to describe placental histopathological changes and to correlate the data with the outcome in neonates. **Methods:** Sixty patients with diagnostic confirmation of ZIKV infection were included. Prenatal and postnatal clinical data were analyzed. In the placental tissue, the viral genome was detected through the RT-qPCR technique and the histopathological changes were analyzed using the H&E staining technique. **Results:** The main symptom reported by the study population was cutaneous exanthematous lesion, being present in 78% of the cases. Only 10% of the pregnant women were asymptomatic. Of the analyzed placentas, 37% were PCR positive for ZIKV, 23% of cases with infection occurring in the first trimester, 24% in the second and 64% in the third. According to the literature, this study also observed more CNS and ocular changes in the fetuses / neonates in the group of pregnant women whose infection occurred in the first trimester. The most common histopathological alterations were chronic villusitis (92%), stromal fibrosis (93%), fibromuscular hyperplasia of the wall of villous vessels of medium caliber (82%) and chronic deciduitis (70%). These changes characterize a pattern of hematogenous placentitis of the cicatricial type, similar to that observed in other types of specific infection such as those described in the STORCH group. The normal decidua had an association with the incidence of CNS disorders and increased viral load. In cases where the high viral load, the finding of normal decidua conferred a 7 times greater chance of presenting changes in the CNS when compared with the cases of chronic deciduitis. **Conclusion:** It was possible to detect the viral genome in the placental tissue by the RT-qPCR technique, thus indicating a viral persistence, and the histopathological examination revealed predominantly cicatricial inflammatory alterations, with important vascular alterations, as also observed in other congenital infections. In addition, tools to aid in the diagnosis of intrauterine infection by ZIKV also indicate a pattern of characteristics common to the group of congenital infections (STORCH) revealing a possible inclusion of ZIKV in this group.

Keywords: Zika Virus. Pregnancy. Placenta. Infectious Disease Transmission, Vertical.

Sumário

SUMÁRIO	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 AGENTE ETIOLÓGICO	15
2.2 ESTRUTURA GENÉTICA DO VÍRUS	17
2.3 DOENÇA.....	19
2.4 TRANSMISSÃO VERTICAL DO ZIKV	20
2.5 INFECÇÕES CONGÊNITAS	22
2.6 PLACENTA.....	24
3. JUSTIFICATIVA.....	30
4. OBJETIVOS	31
4.1 OBJETIVO GERAL	31
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
5. METODOLOGIA.....	32
5.1 LOCAL DO ESTUDO	32
5.2 DESENHO DE ESTUDO	32
5.3 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	32
5.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	33
5.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	33
5.6 FLUXOGRAMA.....	34
5.7 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DA PLACENTA	34
5.8 COLETA DE DADOS CLÍNICOS	35
5.8 EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL	35
5.9 RT- QPCR	36
5.10 AMOSTRAS CLÍNICAS PARA O DIAGNÓSTICO DE ZIKV	37
5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
6. RESULTADOS.....	39
7. DISCUSSÃO	46
8. CONCLUSÃO	55
9. REFERÊNCIAS.....	56
APÊNDICE I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO..	64
APÊNDICE II – FICHA DE COLETA DE DADOS.....	69

1. Introdução

O recente aumento de casos de microcefalia congênita observado no Brasil é motivo de grande preocupação. Uma vez que o aumento ocorreu alguns meses após a introdução do Zika Vírus (ZIKV) no país, associado com relatos de gestantes com doenças febris e exantemática, levantou-se a hipótese da relação entre a infecção por ZIKV e a microcefalia (1). Em maio de 2015, o Ministério da Saúde confirmou 16 casos do ZIKV no Brasil, sendo oito pacientes provenientes do Rio Grande do Norte e oito da Bahia. Em agosto de 2015, o ZIKV já estava presente nos estados da Bahia, Rio Grande do Norte, São Paulo, Alagoas, Pará, Roraima, Rio de Janeiro, Maranhão, Pernambuco, Ceará, Paraíba, Paraná e Piauí. Atualmente a confirmação do ZIKV está presente em 27 regiões e unidades federadas do Brasil (2).

O primeiro caso de evidência de transmissão vertical do vírus da ZIKV no Brasil ocorreu em 2016, onde foi possível detectar o RNA do vírus no líquido amniótico de duas gestantes provenientes da região nordeste do Brasil, que apresentaram sintomas relacionados a infecção por ZIKV e tiveram o diagnóstico fetal de microcefalia pelo exame de ultrassonografia (3).

Existe um conjunto de alterações funcionais e estruturais no feto relacionadas à exposição do ZIKV durante a gravidez e o grau de severidade depende do momento em que ocorreu a infecção (4). Dentre as alterações estruturais mais observadas estão anomalias cerebrais (microcefalia, ventriculomegalia, assimetria cerebral e calcificações intracranianas), contraturas congênitas (como a artrogripose) e alterações oculares (microftalmia, pigmentação retiniana, alterações no nervo óptico e atrofia macular). Entre as anormalidades neurológicas observadas destacam-se a

hipertonia global grave com hiper-reflexia, irritabilidade, hiperexcitabilidade, choro excessivo, distúrbios de deglutição, além de crises convulsivas (5–7,4,8).

Apesar de ser uma doença transmitida por mosquito do gênero *Aedes* e estar intimamente relacionada com a febre amarela, Dengue e Chikungunya, o ZIKV foi identificado pela primeira vez em 1947 no Vale do Zika em Uganda e dentre os sintomas mais observados foram febre, eritema e artralgia (1).

A confirmação laboratorial do diagnóstico de infecção por ZIKV ocorre pela detecção do RNA do vírus através da técnica molecular de transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (RT-qPCR) e normalmente é realizada com amostras de sangue do paciente no momento em que ocorreu a suspeita e/ou aparecimento dos sintomas. Entretanto, o ZIKV também já foi encontrado na urina e curiosamente apresentou uma maior carga viral e detecção prolongada quando comparada com o sangue (9–11). Também foi detectado no cérebro de fetos com alterações no SNC e cuja suspeita da infecção ocorreu no primeiro trimestre gestacional de acordo com os sintomas clínicos revelados pela gestante (1).

Durante a epidemia de ZIKV na Polinésia Francesa em 2013/2014, o vírus foi identificado no sêmen pela técnica de RT-qPCR, duas semanas após o início dos sintomas e quando comparado com a amostra sanguínea, a carga viral no sêmen foi maior (12). Em 2016, o genoma completo do ZIKV foi isolado a partir da amostra de sêmen coletada 13 dias após o início dos sintomas de um paciente que havia retornado de viagem de Guadalupe, México (13).

No entanto, estudos ainda são necessários para elucidar melhor o mecanismo da infecção transplacentária pelo ZIKV e suas consequências para o feto e o desenvolvimento de encefalopatias graves. Portanto, a análise da

placenta (órgão materno-fetal) que é considerado uma barreira não apenas anatômica como imunológica contra agentes infecciosos externos, contribui para o entendimento da via materno-fetal de infecção pelo ZIKV. A avaliação das alterações morfológicas presentes nesse tecido auxiliam no diagnóstico e na descrição de possíveis marcadores de gravidade.

Realizamos a análise dos tecidos placentários de gestantes com infecção por ZIKV confirmada, no Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, Rio de Janeiro, no período de abril de 2016 a janeiro de 2017, com o objetivo de identificar a presença do ZIKV no tecido placentário após o nascimento e verificar as possíveis alterações morfológicas causadas pelo vírus. Desta maneira, podemos correlacionar o período gestacional em que a gestante foi exposta ao ZIKV com as alterações morfológicas presentes no tecido placentário e o risco do recém nato apresentar alterações no Sistema Nervoso Central.

2. Referencial Teórico

2.1 Agente etiológico

O Zika Vírus (ZIKV) pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, filogeneticamente relacionado com o vírus dengue, vírus da febre-amarela e vírus do Nilo Ocidental. Os vírus dessa família são transmitidos por artrópodes e por esse motivo são considerados arbovírus emergentes, transmitidos principalmente por mosquitos do gênero *Aedes* (14). Clinicamente, podem causar encefalites, quadros hemorrágicos, doenças hepáticas e febris severas nos animais vertebrados, incluindo o homem, sendo responsável por elevadas taxas de morbidade e mortalidade em seres humanos (15).

O ZIKV foi originalmente isolado a partir do soro de uma fêmea de macaco *Rhesus* febril, utilizada como sentinela para detecção de febre amarela silvestre em uma floresta Zika, na Uganda em 1947 (16,17). No mesmo local, o ZIKV também foi isolado a partir de uma amostra do mosquito do gênero *Aedes africanus* (18). Em 1964, na Uganda, África foi relatado o primeiro caso de infecção pelo ZIKV em humano, com descrição clínica detalhada, realizada por um médico que descreveu sua própria infecção, relatando sintomas como leve dor de cabeça, erupção cutânea máculo-papular difusa, febre e mal estar (19).

Apesar desse relato sobre a doença, esse vírus permaneceu relativamente desconhecido até 2007, quando houve um grande surto na Micronésia, representando a primeira evidência da circulação do vírus fora do continente africano (16,20,21). A doença disseminou-se rapidamente pelas ilhas do Oceano Pacífico sendo detectados em outubro de 2013 os primeiros casos

na Polinésia Francesa, onde a situação evoluiu para uma epidemia com cerca de 19.000 casos suspeitos e apenas 294 casos tiveram confirmação diagnóstica para a pesquisa de partícula viral de ZIKV por RT-PCR em um total de 584 soros de pacientes analisados (22).

Em fevereiro de 2014, pela primeira vez nas Américas, casos da doença foram reportados na Ilha de Páscoa (território Chileno no Oceano Pacífico), provavelmente relacionado com o surto na Micronésia e na Polinésia Francesa (23). A partir desse momento, a epidemia se alastrou rapidamente nos países das Américas e mais recentemente nos EUA, estado da Flórida. Como pode ser visto na figura 1, o mapa mundial representando os países que já reportaram a presença do ZIKV e países com baixo e alto risco de infecção ZIKV (24).

A primeira transmissão autóctone no Brasil foi observada em abril de 2015, em pacientes do Rio Grande do Norte, onde a sequência de um fragmento de proteína do envelope viral revelou alta identidade com sequências do ZIKV da linhagem asiática (25). Em 15 de maio de 2015, o Ministério da Saúde do Brasil confirmou a circulação de ZIKV no país, após a identificação da partícula viral em 16 amostras de soro (oito da Bahia e oito no Rio Grande do Norte) pelo Laboratório de Referência Nacional. Os principais sintomas descritos foram artralgia, edema das extremidades, febre baixa, dor de cabeça e retro-orbitária, hiperemia conjuntival e erupções cutâneas máculo-papulares, além de prurido, tonturas, mialgia e desordem digestiva (26).

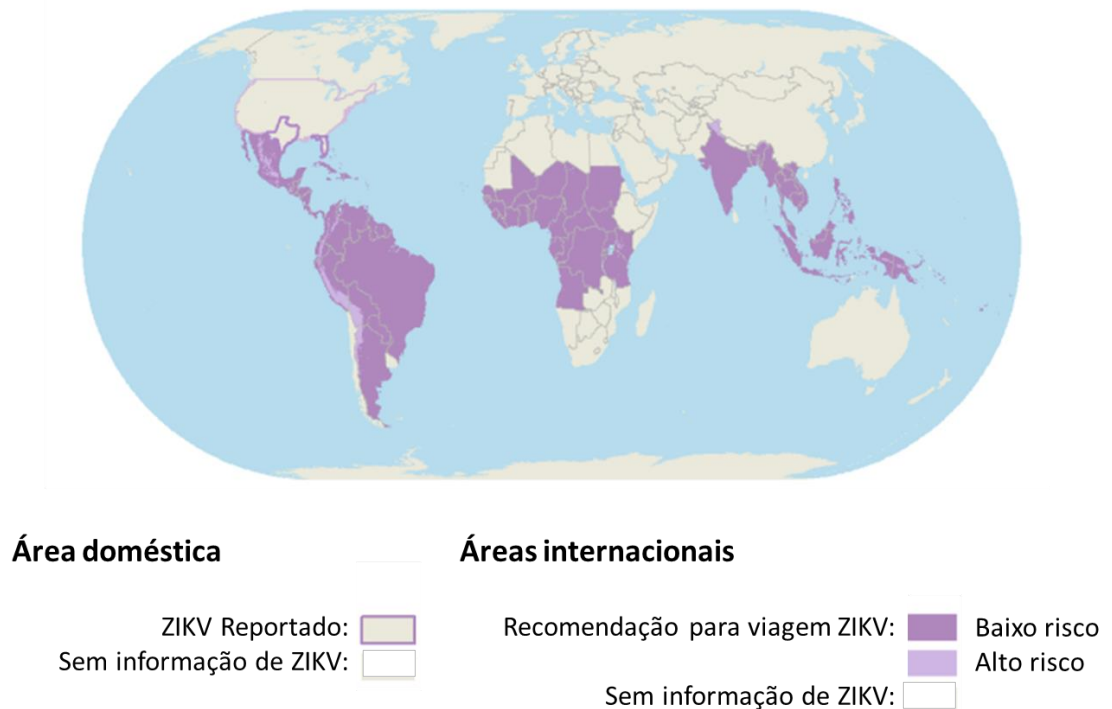


Figura 1: Mapa Mundial de áreas com risco de ZIKV. A área doméstica é representada pelos territórios dos EUA. Os demais países correspondem às áreas internacionais. Adaptado de: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/page/world-map-areas-with-zika>.

2.2 Estrutura genética do vírus

Atualmente existem duas principais linhagens de ZIKV descritas, uma de origem africana e outra de origem asiática (27).

Como membro do gênero *Flavivírus*, o ZIKV possui genoma composto por uma fita simples de ácido ribonucléico (RNA), polaridade positiva, contendo cerca de 11.000 nucleotídeos, flanqueada pelas regiões 5' e 3' não traduzidas (UTR's). Esse RNA codifica uma única poliproteína (16), que posteriormente é clivada em proteínas estruturais denominadas de capsídeo (C), pré-membrana (prM) e envelope (E) e as proteínas não-estruturais conhecidas, respectivamente, como NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (28), como pode ser visto na figura 2. A região 5' UTR é relativamente curta

(aproximadamente 100 nucleotídeos), tem a estrutura de uma tampa (cap terminal) na extremidade 5' e é uma região muito conservada. Enquanto a região 3' UTR é mais longa com aproximadamente 450 nucleotídeos e não possui a cauda poli A, além de conter estruturas conservadas (29).

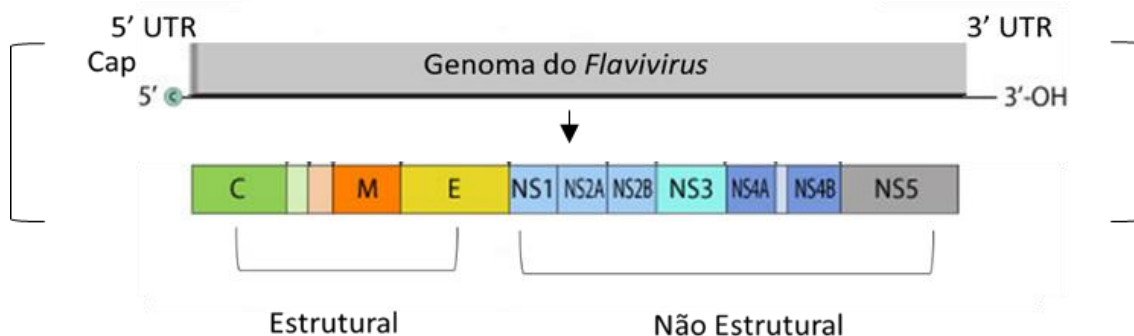


Figura 2: Representação esquemática do genoma do flavivírus. O genoma viral é um fsRNA+ de aproximadamente 11kb. Apresenta um cap na região 5'UTR e não apresenta cauda poliadenilada em sua região 3'. As proteínas estruturais C, M e E (Caixas verde, laranja, amarela, respectivamente) são traduzidas a partir do primeiro terço do genoma, seguidas pelas proteínas não estruturais NS1, NS2A e B, NS3, NS4A e B e NS5 (caixas azuis e cinzas). FONTE: Adaptado de PERERA; KUHN, 2008 (30).

A característica da proteína C, é proteger e empacotar o RNA genômico durante a sua transferência entre células e hospedeiro (31). A glicoproteína E do envelope desempenha diversas funções, incluindo a ancoragem inicial do virion na célula, penetração, disseminação do vírus entre as células. Também é responsável pela indução de anticorpos neutralizantes e pela adsorção das partículas virais aos receptores nas células do hospedeiro. Além disso, ela promove a fusão entre o envelope viral e a membrana do endossomo, permitindo a liberação do capsídeo para o citoplasma. A proteína do envelope também possui atividade hemaglutinante (32). Já a proteína NS1 é altamente conservada e parece ser essencial para a atividade infecciosa do vírus, é eficientemente

secretada pelas células de mamíferos (33). Já a sequência conservada da região NS5 codifica a maior proteína viral, multifuncional com atividade de RNA polimerase dependente (17), tornando-se essencial para o processo de replicação viral (34).

2.3 Doença

O vírus Zika é transmitido ao ser humano pela picada das fêmeas infectadas do mosquito *Aedes*. Porém outros mecanismos de transmissão têm sido descritos na literatura, como a transmissão sexual, intra-uterina, transfusão sanguínea e através do aleitamento materno (35,36).

O principal vetor é o *Aedes aegypti*, artrópode hematófago bem adaptado às condições de vida urbana. O período de incubação do vírus em humanos pode variar de 3 a 12 dias (37). A infecção produz uma doença febril auto-limitada, cujos sintomas da fase aguda são febre, dor de cabeça, mialgia e exantema cutâneo, muito semelhante com a sintomatologia de outros arbovírus como o vírus dengue e o vírus Chikungunya. Assim, nas regiões onde há co-circulação desses vírus, o ZIKV pode ser sub-notificado (1,38,39).

Cerca de 80% das infecções por ZIKV é assintomática ou quando os sintomas clínicos da doença aparecem possuem intensidade leve a moderada e são auto-limitados, podendo durar entre 5 e 7 dias (37). Entretanto, existe uma forte associação entre o surto de ZIKV e aumento do número de casos de síndrome de Guillain-Barré (SGB) na Polinésia Francesa apontando uma primeira complicação resultante de uma infecção por ZIKV (40). No Brasil, quadros graves associados ao ZIKV foram também descritos, incluindo

comprometimento do sistema nervoso central, tais como: síndrome de Guillain-Barré, mielite transversa, meningite em adultos (17,40) e microcefalia e/ou ventriculomegalia em neonatos (1,8).

2.4 Transmissão Vertical do ZIKV

O Brasil, especificamente na região nordeste, foi confrontado com um número de bebês que apresentaram microcefalia no segundo semestre de 2015 (2). Retrospectivamente, a anamnese da maioria das parturientes revelou episódios de doença febril e lesão exantemática durante a gravidez. Considerando a situação epidemiológica, em novembro de 2015 a OMS confirma a relação da infecção por ZIKV e a malformações congênitas, baseando-se nos seguintes fatores: quantidade de casos ocorridos em pouco tempo provenientes de diversos estados, demonstrando altas taxas de ataque e rápida dispersão (fenômeno associado a doenças transmitidas por artrópodes), originando assim uma nova síndrome congênita. Além disso, a maioria das mães tiveram sintomas compatíveis com a infecção por ZIKV no período em que ocorreu o surto e não havia correlação com histórico de doença genética na família e/ou exames com padrão de outros processos infecciosos conhecidos (41).

O primeiro caso de evidência de transmissão transplacentária do vírus da ZIKV ocorreu em 2016, pela detecção do RNAm do vírus no líquido amniótico de duas gestantes pertencentes a região nordeste do Brasil, que apresentaram sintomas relacionados a infecção por ZIKV e tiveram o diagnóstico fetal de microcefalia no exame de ultrassonografia (3).

A microcefalia é uma das alterações no SNC mais frequentemente observada nos casos de infecção congênita pelo ZIKV. Segundo a OMS, microcefalia é definida como perímetro cefálico menor ou igual a dois desvios-padrão abaixo da média para idade e sexo ou ser menor que o segundo percentil, sendo considerada severa quando abaixo de 3 desvios-padrão da média. No geral, ocorre quando o cérebro fetal não cresce normalmente, e conseqüentemente, o crânio também não cresce e as suas suturas se fecham prematuramente. O diagnóstico é feito frequentemente durante o pré-natal, pois a medida do perímetro cefálico é realizada de rotina para monitoramento do crescimento fetal através da ultrassonografia (42).

Ao exame de ultrassonografia, os fetos com síndrome congênita do ZIKV podem apresentar microcefalia, ventriculomegalia, atrofia cortical, atrofia de tronco ou cerebelo e disgenesias de corpo caloso associadas a calcificações intra-parenquimatosas difusas, puntiformes e predominando na junção córtico-subcortical, podendo estar presentes no tronco, núcleos da base e região periventricular. Esse tipo de lesão revela caráter mais severo quando comparada com a distribuição das calcificações ocasionadas pela infecção com o Citomegalovírus, por exemplo, que compromete principalmente a região periventricular, diferente do observado no quadro de infecção por ZIKV (5,8).

A patogênese da infecção vertical por ZIKV ainda não está totalmente estabelecida, mas sabe-se que a presença do vírus no soro materno é curta permitindo a detecção de RNA viral por tempo limitado. Também foi observada a presença de RNA viral no semên, urina, saliva e leite materno (9,43). A detecção de ZIKV no líquido amniótico, tecido placentário e fetal pela técnica de RT-qPCR associada a identificação de partículas virais presentes nos leucócitos

maternos, na decídua, células de Hofbauer, células endoteliais e células do estroma viloso pelas técnicas de imunohistoquímica ou hibridização in situ apoiam as evidências da transmissão transplacentária. A partir desses achados, e de modo semelhante a outras infecções congênitas, acredita-se que a principal via de transmissão vertical ocorra a partir da viremia materna e consequente transferência da partícula viral para o espaço interviloso da placenta. Em seguida, essas partículas atravessam o epitélio trofoblástico (sincício e citotrofoblasto) e atingem os vasos fetais bem como as células do estroma viloso. Uma vez que o ZIKV alcance a circulação fetal, presume-se que ocorra disseminação para todas as vísceras fetais com subsequente replicação e persistência da infecção nos órgãos e tecidos permissivos, com tropismo específico para o tecido nervoso (9,10,44).

2.5 Infecções congênitas

As infecções congênitas ocorrem quando a mulher é infectada durante a gravidez e os microorganismos são capazes de ultrapassar a barreira placentária e assim alcançar as vísceras e tecidos fetais (45). As infecções oriundas do organismo materno podem atingir o conceito através da corrente sanguínea pela via transplacentária, também conhecida como via hematogênica ou por meio da membrana amniótica íntegra a partir de uma infecção do trato genital materno (via ascendente) (45).

As infecções hematogênicas podem ser transmitidas em qualquer período gestacional e os principais agentes etiológicos são representados pelo grupo STORCH, acrônimo utilizado para um conjunto de infecções específicas

durante a gestação, correspondem aos seguintes microorganismos: Sífilis, Toxoplasmose, Outras infecções (como parvovirose, HIV/AIDS, varicela zoster, hepatites B e C), Rubéola, Citomegalovírus e Herpes simples (46). No geral, as infecções maternas agudas associadas ao grupo STORCH, quando adquiridas no 1º trimestre de gestação, apresentam maior gravidade, sendo frequentes anomalias disruptivas e deformações fetais, além de ser causa de aborto, natimortalidade, parto prematuro e crescimento intra-uterino retardado (CIUR), apesar da placenta jovem ter maior capacidade de proteção, funcionando como barreira física e imunológica. Já as infecções adquiridas no 3º trimestre apresentam maior chance de transmissão devido à maior vascularização placentária e menor probabilidade de causar anomalias fetais, visto que os tecidos são mais diferenciados e maduros. As principais anomalias congênitas descritas nestes casos específicos de infecção hematogênica são relacionadas ao SNC, dentre elas a microcefalia, assim como alterações oculares incluindo catarata e cegueira, e malformações cardíacas (45,47).

A incidência de infecções congênitas é variável entre as diferentes populações e podem ocorrer em até 10% dos nascidos vivos (48) e seu risco depende de vários fatores, tais como: políticas públicas de saúde (vacinação e acesso aos serviços de atendimento pré-natal), condições sócio-econômica, educação sexual, hábitos higiênico-alimentares, imunidade materna e as características do agente infeccioso.

O primeiro relato causal entre infecção materna viral e malformação fetal foi feito em 1941 por Norman McAlister Gregg, oftalmologista australiano que estabeleceu corretamente a relação entre infecção materna precoce por rubéola com catarata congênita (49).

Garcia escreveu artigo de revisão que enfatiza o papel da infecção viral como importante “agente” teratogênico, em especial os vírus da Rubéola, o Citomegalovírus e o Herpes vírus. Dependendo do momento da aquisição da infecção pode causar erros primários da morfogênese, quando a infecção ocorre no período embrionário, resultando em malformações ou quando acomete o feto em momento mais tardio, podendo causar alterações da forma e da estrutura em órgãos normalmente formados ocasionando deformidades (50).

A patogênese da lesão no sistema nervoso central causada pelas infecções virais congênitas ainda é desconhecida e complexa. Múltiplos mecanismos isolados e em conjunto têm sido propostos, tais como: ação de produtos de genes virais agindo como agentes “teratogênicos”, interferindo na morfogênese e na diferenciação celular normal atuando e modificando o ciclo celular, os mecanismos de apoptose; indução da fragmentação cromossômica em sítios específicos; a resposta inflamatória do hospedeiro potencializando a injúria causada diretamente pelo vírus no SNC; resposta imune materna não eficaz em controlar a infecção; o impacto direto da infecção nas funções placentárias e o tropismo vascular característico dos vírus causando lesões vasculares difusas (51,52).

2.6 Placenta

A placenta é um tecido especializado que é formado apenas durante a gestação, é obrigatório para manutenção e sustentação do desenvolvimento fetal. Serve de interface materno-fetal e facilita a troca de nutrientes, gases, produtos de excreta e hormônios entre a circulação materno-fetal (53).

Resumidamente, a placenta humana é composta pelo disco placentário, o cordão umbilical e as membranas. O disco placentário tem duas faces: a fetal que está recoberta por delgada membrana transparente e aonde o cordão umbilical se insere usualmente. A face oposta é a materna, tem cor vinhosa e está aderida à parede uterina e corresponde ao endométrio transformado sob efeito hormonal, agora chamado de decídua. O tecido esponjoso entre as duas faces contém as unidades funcionais da placenta que são as vilosidades coriais. Essas são estruturas arredondadas ou ovaladas compostas por eixo central conjuntivo contendo fibroblastos, células de Hofbauer e vasos sanguíneos fetais que são revestidos externamente pelas células trofoblásticas (cito e sinciciotrofoblasto). O espaço entre as vilosidades (espaço interviloso) é rico em hemácias maternas. Assim, o epitélio trofoblástico (em especial o sinciciotrofoblasto) que está em contato direto com o sangue materno, representa camada crucial para proteger o feto contra patógenos. As vilosidades menores (terminais) são ramificações de troncos vilosos maiores que se originam do córion da placa corial e contêm ramificações dos vasos do cordão umbilical (54).

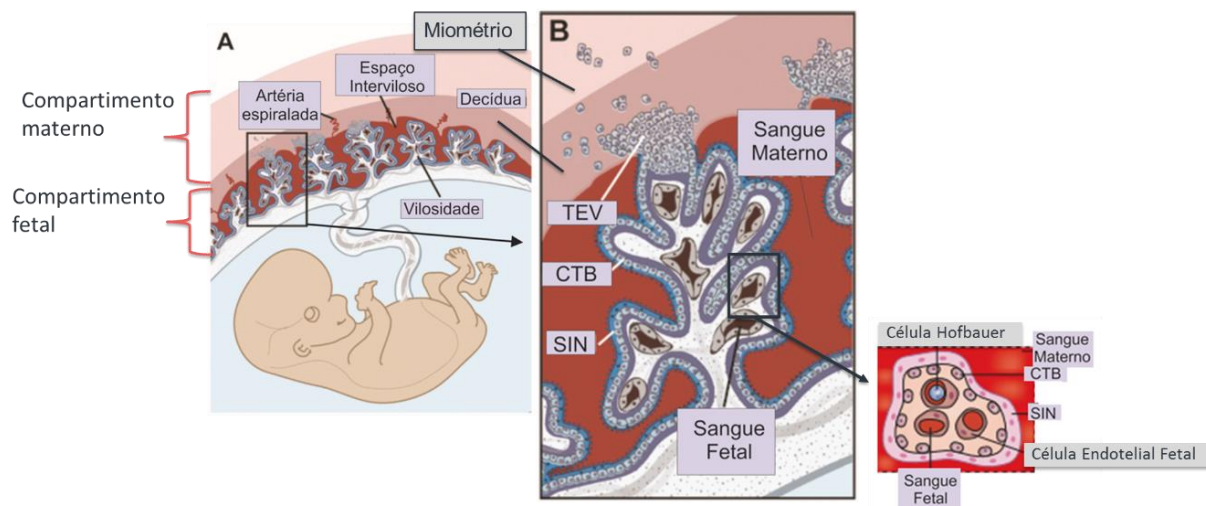


Figura 3: Representação esquemática da estrutura e organização da placenta. Na figura A, o compartimento materno é composto pela decídua e espaço intervilloso. E o compartimento fetal é composto pelas vilosidades. O endométrio, é revestimento do útero, o qual é transformado em decídua, principalmente por conta dos efeitos hormonais. O sangue materno circula livremente no espaço intervilloso por entre as inúmeras vilosidades que são de origem fetal. Na figura B, é a representação de um das vilosidades, é possível perceber que o sangue materno banha as vilosidades. Estas, são cobertas por uma camada de células formadas pelo sinciciotrofoblasto e abaixo dele estão uma população de células progenitoras chamadas citotrofoblastos (CTB) e são sustentadas por uma membrana basal (em roxo). Esse epitélio trofoblasto formado em especial pelo sinciciotrofoblasto (SIN) que está em contato com o sangue materno, representa a camada crucial para proteger o feto contra patógenos e pela realização da troca de gases e nutrientes. Os capilares fetais estão localizados dentro das vilosidades. As células do citotrofoblasto que entram em contato com a decídua se diferenciam em trofoblastos extravilosos, estes por sua vez, são responsáveis pela ancoragem da placenta no útero e invadem os vasos uterinos remodelando-os para permitir que o sangue materno flua para dentro dos espaços intervilloso. E o último esquema à direita, representa a composição da vilosidade fetal, esta é composta por células do epitélio trofoblasto composto pelo cito e sinciciotrofoblasto, células endoteliais fetais, sangue fetal, e células de defesa, macrófagos, que são conhecidos como células de Hofbauer. Fonte: Adaptado de: Zeldovich et al. e Coyne et al. *Nature* (2016).

Uma das funções da placenta é de proteção contra agentes infecciosos externos. Considera-se que ela constitui barreira anatômica e imunológica entre a mãe e feto; as células de Hofbauer são macrófagos localizados no estroma das vilosidades coriais e funcionam como “órgão” inespecífico de defesa. Os patógenos que atingem as vilosidades e sobrevivem nestas células, podem atingir o feto e desencadear infecção (55).

Alguns mecanismos recentemente descritos apontam a placenta como um mediador significativo de defesa antimicrobiana, que diferem das teorias prévias onde a gravidez era vista como um estado imunossupressor para prevenir a rejeição fetal semialogênea (56,57). Ainda há muito a se estudar sobre os diversos mecanismos que a placenta mantém para limitar e prevenir a disseminação de microorganismos para o feto.

O exame anátomo-patológico da placenta é importante para a identificação de qualquer tipo de evento indesejável ocorrido durante a gestação, funcionando como um diário da vida intra-uterina. Assim, é uma ferramenta de fácil acesso que reflete as condições do feto durante a seu período intrauterino e é capaz de fornecer provas diretas de diversas condições patológicas, entre elas, as infecções congênitas, permitindo o diagnóstico precoce das infecções intrauterinas suspeitas ou não, seja do tipo ascendente ou hematogênica, nos casos de aborto, natimorto, neomorto ou de recém-nascido oligossintomático/assintomático (54).

As infecções hematogênicas são causadas por qualquer microorganismos que atinja a circulação materna, sendo os vírus, o agente etiológico mais frequentemente observado nas placentites hematogênicas (46). A resposta placentária às diferentes infecções virais é variada e o exame macroscópico pode ser inalterado, ou apresentar placentas pequenas para a idade gestacional ou alterações expressivas como hidropisia placentária com acentuada palidez e friabilidade da face materna. Os casos de hidropisia placentária são observados principalmente nos casos de infecção por CMV, sífilis e toxoplasmose (58).

O achado microscópico característico da placentite hematogênica é a vilosite caracterizada, morfológicamente, pela presença de infiltrado inflamatório do tipo crônico e/ou agudo no estroma viloso podendo estar acompanhado de necrose do revestimento trofoblástico. As vilosites são classificadas histologicamente como: proliferativa (vilosidades com infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear sem necrose); necrótica (quando há associação de necrose e inflamação) e reparativa ou cicatricial (vilosidades com tecido de granulação e/ou proliferação fibroblástica, resultando em vilosidades fibrosadas) (50).

Dependendo da extensão, as vilosites podem se apresentar de modo focal, multifocal ou difusa. Outras vezes, estão restritas à decídua e às vilosidades basais. Em alguns casos de vilosite difusa em que há acentuada atividade da doença, observa-se vilosite granulomatosa e microabscessos vilosos, este último sendo característico da infecção por *Listeria monocytogenes* (50).

Na maioria dos casos de placentite hematogênica de etiologia indeterminada ou naqueles de etiologia viral específica como CMV, Rubéola e Herpes simples observa-se, concomitantemente, lesões crônicas (vilosite cicatricial) ao lado de lesões ativas (vilosite proliferativa e/ou necrótica), visto que o comprometimento placentário pelo microorganismo ocorre durante toda a gestação (54).

Além da vilostite, é comum observar nas placentites hematogênicas do grupo STORCH, focos de vasculite necrótica com ou sem mineralização distrófica da parede vascular, fibrose perivascular com obstrução luminal dos vasos vilosos e retardo do amadurecimento e/ou edema viloso difuso (50,54).

Apesar da evidência de transmissão vertical do vírus da dengue e/ou possíveis complicações nessas gestações, tais como aborto, trabalho de parto prematuro, morte intrauterina e sofrimento fetal agudo (59–61), existem poucos relatos na literatura sobre as alterações placentárias nos casos de infecção materna por Dengue.

O estudo do grupo de pesquisadores da Universidade Federal Fluminense (Niteroi – RJ) envolvendo 28 placentas e em 7 produtos de abortamento de mulheres infectadas pelo vírus da Dengue, observou deciduíte (40%), coriodecuiduíte (37%), intervilosite e vilosite (28,5%), além de alterações hipóxicas referidas pelos autores como edema estromal, aumento de nós sinciciais e corioangiose (59).

Na maioria dos casos de placentite hematogênica não é possível a detecção de agente etiológico específico com o exame de rotina (coloração de HE). Ocasionalmente, identificam-se inclusões virais características como àquelas do CMV, parvovírus B-19 e herpes-vírus. É necessário o uso de outras técnicas diagnósticas complementares ao exame histopatológico tradicional, que são: sorologia materna e/ou fetal, cultura, microscopia eletrônica, detecção de partículas virais por PCR, imunohistoquímica e hibridização in situ, que permitem a presença viral, localização do agente infectante e conseqüente avaliação da extensão da lesão e possibilidade de melhor compreensão do mecanismo fisiopatológico da lesão viral (54).

3. Justificativa

A síndrome congênita do ZIKV e, principalmente, as manifestações neurológicas a ela relacionada é recente, necessitando de entendimento e, se constitui num quadro complexo, que levou o país a decretar situação de emergência em saúde pública de importância nacional. Vários aspectos são completamente novos, incluindo a presença do vírus nas Américas e sua rápida expansão.

A perfeita compreensão dos vários fatores necessários para o enfrentamento da epidemia exige um esforço amplo, solidário, coletivo e continuado de investigação científica para esclarecer vários aspectos da infecção pelo vírus. Nesse sentido, devemos considerar esse problema de saúde pública como um dos maiores já enfrentados pela nação depois da febre espanhola e da epidemia da rubéola que assolou o mundo em meados do século passado. Até o momento, as informações obtidas pela comunidade científica sugerem pontos cruciais para o entendimento da doença, mas ainda são correlações e necessitam de confirmação.

Portanto, o conhecimento científico adquirido no presente trabalho, além do fator ineditismo poderá contribuir para o desenvolvimento de técnicas de confirmação diagnóstica e melhor compreensão da patogênese da síndrome congênita do ZIKV, tendo como base o estudo da morfologia placentária nos casos de infecção materna por ZIKV.

4. Objetivos

4.1 Objetivo Geral

Identificar a presença do ZIKV através da técnica de RT-qPCR e descrever as alterações morfológicas placentárias associadas ao diagnóstico de ZIKV durante a gestação.

4.2 Objetivos Específicos

- Identificar a presença do ZIKV nas placentas de gestantes com diagnóstico molecular de infecção por ZIKV durante a gravidez;
- Descrever as alterações morfológicas em histologia convencional das placentas com diagnóstico confirmado por RT- qPCR para ZIKV durante a gestação;
- Correlacionar os achados de ZIKV na placenta com o período gestacional em que ocorreu a infecção e com os dados clínicos.

5. Metodologia

5.1 Local do Estudo

O estudo molecular foi realizado no Laboratório de Alta Complexidade, enquanto o estudo histopatológico foi realizado no Departamento de Anatomia Patológica e Citológica situados no Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira – Fiocruz, no Rio de Janeiro, capital.

5.2 Desenho de estudo

Foi realizado um estudo transversal descritivo dos casos de gestantes que realizaram o parto no IFF e tiveram suspeitas clínicas de infecção por ZIKV no período de abril de 2016 a janeiro de 2017.

5.3 Aspectos éticos da pesquisa

Este projeto faz parte de um projeto guarda-chuva, intitulado “Exposição Vertical ao Zika Vírus e suas consequências no neurodesenvolvimento da criança”, o qual já foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, em 01/03/2016 (CAAE:52675616.0.0000.5269). O projeto foi financiado pela FAPERJ Rede 4-Zika.

5.4 Critérios de inclusão

Gestantes com suspeita clínica de infecção por ZIKV ou cujos neonatos apresentaram características da síndrome congênita do ZIKV foram incluídas inicialmente no nosso estudo. Caso apresentassem positividade pela técnica molecular RT-qPCR para pesquisa de partícula viral do ZIKV em amostras de sangue e urina materna, líquido amniótico, tecido placentário, sangue de cordão umbilical, líquido e urina da criança eram permanecidas no estudo. Essas pacientes foram convidadas a participar da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ver Apêndice I).

5.5 Critérios de exclusão

Os critério de exclusão foram: gestantes com sorologia positiva para infecções do grupo STORCH; gestantes cujos fetos ou neonatos apresentaram microcefalia de origem genética ou outras doenças genéticas associadas; gestantes sem comprovação da infecção por ZIKV por técnicas moleculares. Também foram excluídas do estudo placentas de casos provenientes de aborto espontâneo com idade gestacional menor que 20 semanas, como descrito no fluxograma representado pela figura 3.

5.6 Fluxograma

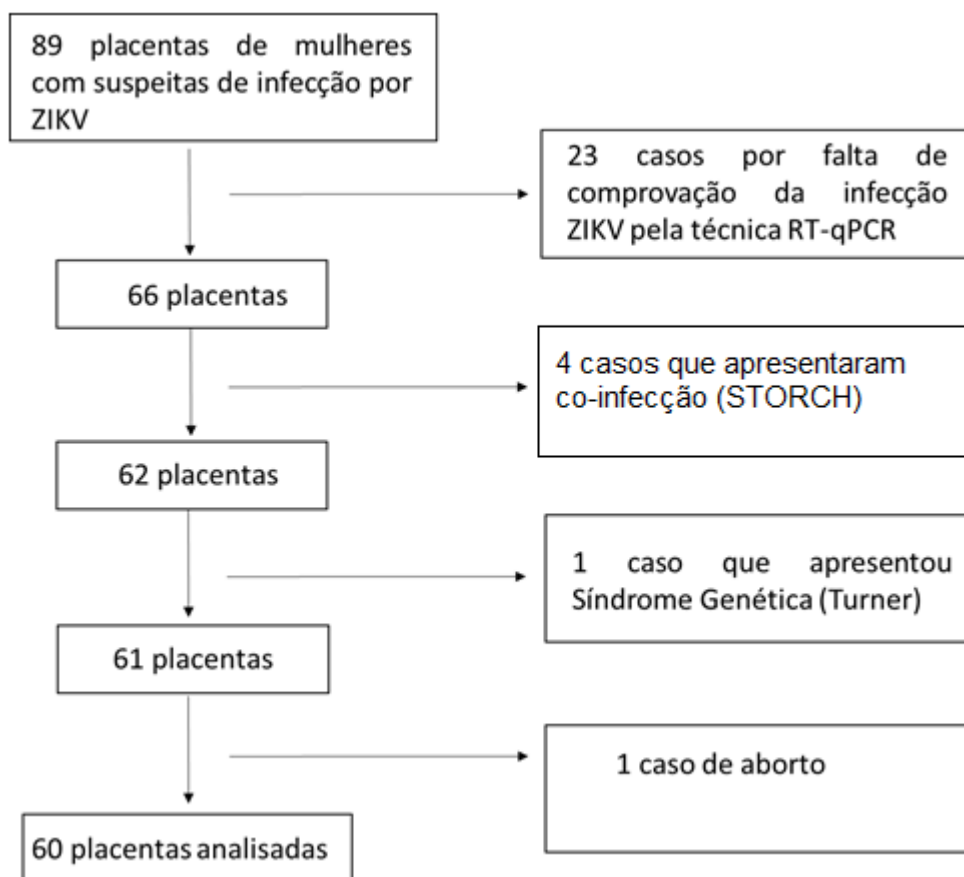


Figura 4: Fluxograma da metodologia do estudo.

5.7 Análise histopatológica da placenta

As placentas foram enviadas a fresco ao DAPC, sendo conservadas por até 48h em geladeira. Foram descritas, pesadas e fotografadas de acordo com a rotina de análise da placenta. Em seguida, foram fixadas por no máximo 30h em formol tamponado e clivados cinco ou mais fragmentos da placa corial (incluindo a região da inserção), dois ou mais fragmentos do cordão umbilical e um ou dois fragmentos das membranas. Após o processamento de rotina, o material foi emblocado em parafina, cortado com 4 μ m de espessura e corado em H&E (Hematoxilina e Eosina). Após a coloração, as lâminas foram montadas

em bálsamo do Canadá e cobertas por lamínulas de vidro. Após a secagem, as lâminas foram analisadas no microscópio óptico.

5.8 Coleta de dados clínicos

Os dados das pacientes incluídas no estudo foram coletados através da pesquisa ao prontuário disponível no Departamento de Arquivos do hospital. Informações como: idade da mãe, checagem de sorologia positiva para infecções do grupo STORCH, resultados de exames de ultrassom do recém-nascido, pesquisa de partícula viral de ZIKV por PCR em sangue e urina maternos e líquido amniótico, data de nascimento do recém-nascido, checagem da declaração de nascido vivo e idade gestacional do nascimento. Já as informações a respeito da infecção por ZIKV também foram coletadas, pela consulta na ficha de dados sobre “Exposição Vertical ao Zika Vírus” coletado pela equipe do DIPE (Enfermaria de Doenças Infectos Parasitárias). Esses dados foram obtidos no momento em que a gestante teve uma suspeita de infecção por ZIKV (ver Apêndice II).

5.9 Extração do RNA viral

As amostras de placentas advindas das pacientes foram processadas para extração de ácidos nucleicos. No primeiro momento, foi realizada mecanicamente a homogeneização da amostra. Em seguida, a extração foi realizada através da utilização do reagente comercial Brazol (LGC Biotecnologia) de acordo com as instruções do fabricante, que consiste basicamente nos seguintes procedimentos: 300 µl (amostras líquidas) ou 50-100 mg de tecido

mecanicamente homogeneizado foram misturados a 1 mL de Brazol com 250 µl de clorofórmio e encaminhadas para a centrifugação (12000g; 4°C, 20min). Em seguida, o sobrenadante foi transferido para novos tubos contendo 500 µl de isopropanol e centrifugadas novamente (12000g; 4°C, 15min). Desta vez, o sobrenadante é descartado e o pellet formado é lavado com 500 µl de etanol a 70% e centrifugado (12000g; 4°C, 10min). Por fim, foram adicionados 50µl de água de injeção para eluição do RNA.

A concentração de RNA foi estimada por ultravioleta (UV) pela espectrofotometria a 260 nm (1000 Nanodrop, ThermoScientific, EUA). O RNA extraído foi armazenado no freezer -80°C até o momento da utilização.

5.10 RT- qPCR

A detecção do RNA do ZIKV provenientes das amostras, foi avaliado através das técnicas de transcrição reversa seguida de tempo-real quantitativo (qPCR). Os cDNAs obtidos pela RT-PCR foram usados como moldes nas reações de PCR em tempo real, em ensaios Taqman.

A reação de qPCR foi seguida da síntese das fitas de cDNA foi realizada através da utilização do kit comercial kit Probe One- Step RT-qPCR (LGC Biotecnologia), conforme recomendações do fabricante. Foram utilizados primers específicos para elaboração da primeira fita de cDNA, conforme listado abaixo (21):

1. ZIKV1086: 5'CCGCTGCCCAACACAAG3';
2. ZIKV1162c: 5'CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT3'
3. ZIKV1107FAM: 5'AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCA3'

A retrotranscrição seguida da amplificação de fragmentos do genoma do ZIKV foram realizadas em um volume total de 25 µl, que consiste em 1µg de RNA presente na amostra de tecido, 1U de Enzima One Step RT-qPCR, Set de Primers Sonda BR ZIKV (0,8µM), Set de Primers e Sonda Controle Interno (0,2 µM), Corante Rox (30Nm) e Tampão de reação RT-qPCR 2X (12,5 µl) (LGC Biotecnologia).

A amplificação foi realizada no Applied Biosystems® 7500 Fast Real-Time PCR incluindo as seguintes condições das reações de retrotranscrição: 55°C por 30 min (etapa de transcrição reversa), 95°C por 30s 1x, e 40 ciclos com as seguintes condições: 95°C por 10s, 55°C por 15s e 68°C por 45s. As amostras foram analisadas em triplicata. Como controle foi utilizado o RNA viral (controle positivo), amostras sem DNA (controle negativo) e o Set Controle Interno BR ZIKV (Rnase P) (LGC Biotecnologia).

O valor limiar de ciclo (Ct) indica a quantidade de gene alvo em que a fluorescência excede um limiar predeterminado. Este limite foi definido como 20 vezes o desvio padrão do sinal fluorescente da linha de base, isto é, o sinal fluorescente normalizado dos primeiros ciclos de PCR. Depois de atingir o limiar, a amostra será considerada positiva e amplificação acima de 38 ciclos foram consideradas como negativas.

5.11 Amostras clínicas para o diagnóstico de ZIKV

Nesse estudo, foram analisadas amostras de placentas de pacientes atendidas no hospital IFF com suspeita de infecção por ZIKV, ou cujos neonatos apresentaram positividade para ZIKV em seus fluídos biológicos. As placentas

foram obtidas e encaminhadas para o Departamento de Anatomia Patológica e Citopatologia (DAPC). Posteriormente, uma amostra da placenta, cerca de 50-100 mg, dessas placentas foi colhida, armazenada com 500 µl de reagente Brazol e acondicionadas em nitrogênio líquido até serem processadas pelas técnicas moleculares, conforme descrito a seguir.

5.12 Análise estatística

Na análise descritiva, foram apresentados os valores médios e respectivos desvios padrões para as variáveis contínuas com distribuição Normal. Para as variáveis contínuas sem distribuição Normal, foram apresentados os valores medianos, mínimos e máximos. A suposição de normalidade foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk. As variáveis categóricas foram descritas através de frequências absolutas e percentuais. Para medir a associação entre variáveis categóricas, foram utilizados os testes qui-quadrado de Pearson ou o teste exato de Fisher e nos casos em que se observou pelo menos uma frequência esperada menor do que 5. Na comparação das medidas contínuas entre dois grupos, foram aplicados os testes t de Student ou o teste de Mann-Whitney, para variáveis com e sem distribuição Normal, respectivamente. As análises foram conduzidas utilizando o programa SPSS versão 22, considerando um nível de significância de 5%.

6. Resultados

A amostra estudada neste trabalho foi composta por 60 placentas de gestantes com infecção confirmada por ZIKV na gestação. A primeira tabela mostra que a idade das gestantes incluídas no estudo está compreendida no intervalo de 15 e 54 anos. O principal sintoma clínico reportado pelas mulheres incluídas nesse estudo foi a lesão exantemática cutânea, relatado em 78% dos casos. O tipo de parto mais frequente na população estudada foi a cesariana, ocorrendo em 63% dos casos. O valor da mediana da idade gestacional no momento do parto no grupo dos nativos foi de 37,5 semanas. Na nossa população estudada, 5 casos foram de natimortos com a mediana da idade gestacional ao nascimento de 39,5 semanas. Não houve diferença na distribuição dos casos em relação ao sexo das crianças. (Tabela 1).

Tabela 1 – Características demográficas

	Número de casos (%)	Mediana (Faixa)
Idade da mãe (anos)	60 (100)	30 (15-54)
Lesão Exantemática	47 (78)	
Assintomática	6 (10)	
Sem Informação	3 (5)	
Cesárea	38 (63)	
Normal	22 (37)	
Idade gestacional do nascimento (semanas)	60 (100)	37,5 (31-41)
Natimorto	5 (8)	39,5 (33-40)
Nascido vivo	55 (92)	37,5 (31-41)
Masculino	31(52)	
Feminino	29 (48)	
Total	60 (100)	

O estudo anátomo-patológico das placentas de mulheres com infecção por ZIKV durante a gestação não revelou alterações macroscópicas significativas (dados não mostrados). A avaliação microscópica das placentas realizada em lâminas coradas com HE, mostrou, na maioria dos casos, placentite hematogênica cicatricial, representada por vilosite crônica em 92% dos casos (figura 4A), 33% apresentaram vilosite necrotizante (figura 4B) e 32% vilosite proliferativa (figura 4C), como também apresentado na tabela 3. Em relação a distribuição das vilosites, observamos predomínio do padrão multifocal em 82% dos casos, seguido do focal em 13% das placentas analisadas e somente em 3% delas foi identificado o padrão difuso (Tabela 3).

As alterações do SNC associadas aos diferentes momentos de exposição a infecção pelo ZIKV durante o período gestacional estão demonstradas na tabela 2. A maior incidência de alterações no SNC foi observada nos casos onde a exposição ao ZIKV ocorreu no primeiro trimestre gestacional, alcançando 64% dos casos estudados, sendo significativamente diferente do segundo e terceiro trimestre (p -valor $<0,05$, teste qui-quadrado). Já no segundo trimestre, 21 gestantes foram infectadas e apenas 4 mulheres (19%) tiveram crianças com alterações no sistema nervoso central. Não houve nenhum caso de alteração do SNC evidente, seja nos exames de ultrassom e clínico, nos neonatos cujas mães foram expostas ao ZIKV no terceiro trimestre. Dentre as 6 gestantes assintomáticas, onde o momento da infecção não foi possível ser determinado, 5 neonatos (83%) apresentaram alterações no SNC. No total, foram identificados 26 casos (43%) de neonatos com alterações no SNC (Tabela 2).

Em seguida, realizamos o RT-qPCR para determinar a presença do ZIKV no tecido placentário. Ainda na tabela 2, observa-se a presença da partícula do

ZIKV em 37% das placentas examinadas, totalizando 22 placentas positivas. Em relação ao momento da infecção, a detecção do material genético viral nas placentas foi demonstrada em 23% dos casos em que a infecção ocorreu no primeiro trimestre, 24% no segundo trimestre e 62% no terceiro trimestre, sendo este último significativamente diferente do primeiro e segundo trimestre (p -valor $<0,005$, teste qui-quadrado).

O exame de fundo de olho foi realizado em 53 neonatos da população estudada. Desse total, 16 neonatos (27%) apresentaram alterações no resultado do exame. Levando-se em conta o momento da infecção, 11 neonatos e 2 neonatos apresentaram alterações oculares quando a infecção por ZIKV ocorreu no primeiro e segundo trimestres de gestação, respectivamente. Não houve nenhum caso reportado de neonato com alterações oculares nas infecções ocorridas no 3º trimestre. Nos 6 casos de gestantes assintomáticas, 3 neonatos apresentaram alteração no exame de fundo de olho (Tabela 2). Os achados oculares mais observados foram: alteração no nervo óptico em 14 casos, sendo 7 casos de hipoplasia e 6 casos com palidez do nervo óptico. Alterações na retina também foram relatadas em 12 casos, por vezes associadas as alterações no nervo óptico. Observou-se ainda pigmentação na retina em 8 casos, atrofia coriorretiniana em 5 casos e hemorragia na retina em 2 casos (dados não mostrados).

Tabela 2 – Pesquisa de partícula viral na placenta e incidência de alterações no SNC e oculares associadas à exposição ao ZIKV durante a gestação.

	Total (%)	Com Alteração no SNC (%)	Fundo de Olho Alterado (%)	PCR + Placenta (%)
Momento da infecção				
1º Trimestre	22 (37)	14 (64) ^{***}	11 (50)	5 (23)
2º Trimestre	21 (35)	4 (19)	2 (9)	5 (24)
3º Trimestre	8 (13)	0	0	5 (62) ^{***}
Assintomática	6 (10)	5 (83)	3 (50)	6 (100)
Sem informação	3 (5)	3 (100)	0 (0)	1 (33)
Total	60 (100)	26 (43)	16 (27)	22 (37)

^{***}*p.valor=0,000*

Na nossa casuística, a microcefalia foi a alteração do SNC mais frequente, sendo observada em 16 casos (27%). Quando comparada a microcefalia com idade gestacional no momento da infecção, notamos dez casos no primeiro trimestre, somente um caso no segundo trimestre e nenhum caso no terceiro trimestre. Das seis gestantes assintomáticas, apenas duas apresentaram microcefalia. Outra alteração que também foi observada em 7 (11%) casos foi a ventriculomegalia com acentuada atrofia parenquimatosa. Entre os 26 casos de alteração do SNC, nove (35%) apresentaram artrogripose (dados não mostrados).

Não foi possível ter acesso às informações clínicas do pré-natal em 3 casos em que os neonatos eram portadores de alterações do SNC fortemente sugestivas de síndrome congênita do ZIKV e tiveram positividade para pesquisa de partícula viral na placenta (1 caso) e em órgãos fetais, principalmente no SNC (2 casos).

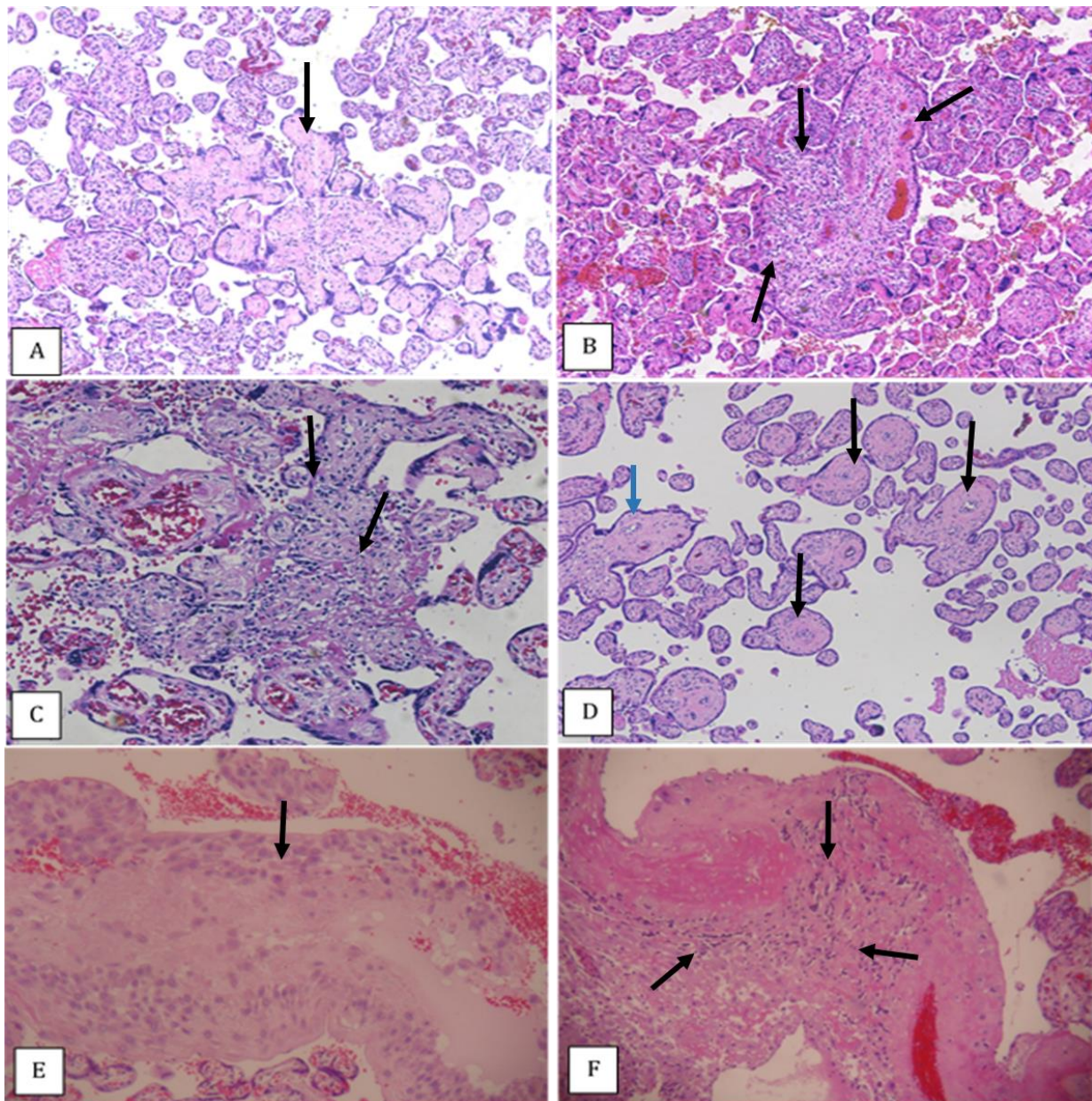


Figura 5: Aspectos histológicos das placentas: (A) Vilosite crônica: Vilosite com discreto infiltrado de células inflamatórias mononucleares e fibrose estromal. (B) Vilosite Proliferativa – Vilosidade com células inflamatórias mononucleares no estroma. (C) Vilosite Necrotizante – Vilosidades aglomeradas com necrose trofoblástica em meio a células inflamatórias predominantemente mononucleares. (D) Fibrose estromal (seta azul) e espessamento da parede do vaso da vilosidade intermediária (seta preta). (E) Decídua normal, placenta sem infecção por ZIKV. (F) Deciduíte crônica: leve infiltrado inflamatório de linfócitos e células plasmáticas na placa basal.

Quando o estroma é avaliado, a alteração mais frequentemente observada foi a presença de fibrose em 93% dos casos (figura 4A), seguida de alterações vasculares em vilosidades de médio calibre com parede vascular espessada exibindo hiperplasia fibromuscular concêntrica perivascular em 82% dos casos (figura 4D). Outro achado frequente foi a calcificação distrófica estromal (73%). Também foi identificada vasculite em atividade com ou sem necrose do endotélio em vasos do córion e vasos vilosos em 10% e 23% dos casos, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 – Frequência das alterações histopatológicas correlacionadas com alterações no SNC e PCR positivo na placenta

	Alterações histopatológicas (%)	Alterações no SNC (%)	PCR+Placenta(%)
Tipos de Vilosites			
Crônica	55(92)	24 (44)	21 (38)
Necrotizante	20 (33)	10 (50)	7 (35)
Proliferativa	19 (32)	9 (47)	8 (42)
Distribuição das Vilosites			
Focal	8 (13)	2 (83)	6 (75)
Multifocal	49 (82)	23 (47)	15 (31)
Difusa	2 (3)	1 (50)	1 (50)
EstromaEstroma			
Fibrose	56 (93)	25 (45)	21 (37)
Calcificação	44 (73)	17(39)	17 (39)
Lesões Vasculares			
HF	49 (82)	23 (47)	19 (39)
Vasculite	14 (23)	5 (36)	5 (36)
Vasculite Necrótica	6 (10)	2 (10)	2 (10)
Decídua			
Deciduíte Crônica	42 (70)	14 (33)	17 (40)
Sem Alteração	18 (30)	11 (62)**	5 (28)
Total	60 (100)	25 (42)	22 (37)

**p-valor = 0,021

HF: Hiperplasia Fibromuscular

A decídua crônica basal leve (figura 4F) foi observada em 70% dos casos e decídua sem alteração, por sua vez, apresentou valor diferente significativamente, quando associada com alterações no SNC (p -valor= 0,021). A figura 5 representa a variação da chance de ter alteração no SNC em função do Ct, discriminada por decídua normal e alterada fixadas em infecção no primeiro trimestre gestacional. A partir do gráfico é possível verificar que em Ct abaixo de 26 a chance de desenvolvimento de alterações do SNC é cerca de 7 vezes maior quando a decídua não apresenta alteração histopatológica e a infecção ocorreu no primeiro trimestre gestacional (figura 4E).

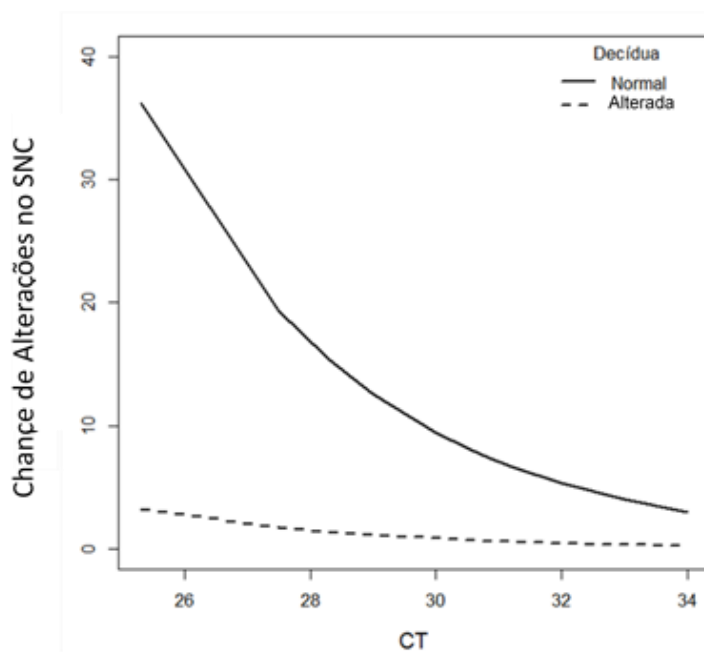


Figura 6: Alta carga viral relativa na decídua normal aumenta a chance de apresentar alterações no SNC quando a infecção por ZIKV ocorre no primeiro trimestre gestacional. O eixo X é representado pelo número de chance de alterações no SNC, enquanto no eixo Y estão os valores de Ct que são relacionados inversamente com a carga viral relativa. De acordo com o gráfico, quando a decídua está alterada e o Ct baixo (representada pela linha tracejada) a chance de ter alterações no SNC é 7x menor quando comparada com a decídua normal e o Ct baixo (representada pela linha contínua).

7. Discussão

As infecções mais conhecidas e observadas nas placentas são aquelas do grupo STORCH que são capazes de causar anomalias fetais. Neste contexto as evidências apontam que o ZIKV deve ser considerado um novo membro da família STORCH e o fenótipo típico resultante dessa infecção permite sugerir o termo “Sequência de interrupção do cérebro de embrião e fetos pelo ZIKV” (8,45).

Estudos sobre a fisiopatologia da infecção materna por ZIKV e suas consequências para o feto são de extrema importância para melhor elucidar o mecanismo pelo qual o ZIKV atua para acessar o feto, sendo necessário um número de casos razoáveis para estabelecer associações relevantes. Até o momento, o nosso estudo possui a maior casuística representada por 60 placentas de pacientes com confirmação de infecção pelo ZIKV durante o período gestacional, sendo 48 placentas do terceiro trimestre de gestação a termo e 12 placentas do terceiro trimestre pré-termo.

Da mesma forma como ocorre em outras infecções congênitas, o momento da infecção está intimamente relacionado com a gravidade das complicações que podem ocorrer, principalmente com as alterações no SNC (1,6,62–64). Quando ocorre no primeiro trimestre gestacional, o dano gerado é estruturalmente mais severo, pois ele ataca as células progenitoras de neurônios que estavam em estágios iniciais de desenvolvimento, como demonstrado no estudo em modelos experimentais (65). O nosso estudo revelou maior frequência de alterações no SNC (64%) quando a infecção por ZIKV ocorreu no primeiro trimestre corroborando com os achados da literatura.

Não há dúvidas que o ZIKV tem a capacidade de ultrapassar a barreira placentária, acessar o compartimento fetal e causar danos neurológicos (1,62,63,66). A infecção do tecido placentário, já descrita na literatura, foi mais uma vez confirmada com o nosso estudo, sendo possível detectar o RNA do ZIKV em 22 placentas das 60 analisadas, correspondendo a 37% das amostras incluídas. Nesse grupo estudado, foi observada associação entre a infecção materna por ZIKV e presença de microcefalia nos neonatos, demonstrada pelos testes estatísticos com resultados extremamente significativos (p -valor < 0,005), sendo o tipo de anomalia do SNC mais frequentemente relatada (27% dos casos).

Sabe-se que o ZIKV possui um neurotropismo, porém o mecanismo pelo qual o vírus consegue ultrapassar a barreira física e imunológica da placenta, ainda é desconhecido. Uma das hipóteses apresentada por diferentes grupos (1,62,67–70) sugere que os vírus responsáveis por infecções congênitas, a partir do sangue materno do espaço interviloso, conseguem ultrapassar a barreira placentária representada pelas células trofoblásticas e atingir o vaso fetal intraviloso. No caso do ZIKV, foram demonstrados por IHQ, a presença de partículas virais nas células de defesa da vilosidade, conhecidas como células de Hofbauer. Essas células são de origem fetal (71), possuem a habilidade de migrar, principalmente, por áreas que possuem contato com epitélio trofoblástico e vasos do feto. Bhatnagar e colaboradores, sugeriram que o ZIKV possui mecanismo de evasão do sistema imunológico e as células de Hofbauer acabam sendo responsáveis pela migração e disseminação viral facilitando o seu acesso ao compartimento fetal (68). Um estudo de infecção experimental *in vitro* também demonstra que além do vírus infectar essas células de defesas da placenta,

utilizam essas células como reservatórios virais (72). O nosso estudo sugeriu, através da demonstração da potencial replicação viral em tecido placentário proveniente de casos infectados naturalmente, uma vez que detectamos, em nossa população, casos com Ct variando de 25-34, abaixo da média de Ct 28-34 encontrados em amostras de sangue materno (dados do Laboratório de Alta Complexidade).

Assim como Bhatnagar e cols descrevem em seu estudo, também ressaltamos que a detecção do RNA do ZIKV realizada pela técnica de RT-qPCR não é conclusiva a ponto de distinguir se o vírus está presente no compartimento materno da placenta (decídua e/ou espaço interviloso) ou no compartimento fetal (vilosidades) (68). Dessa forma, como parte desse estudo, foram testados os anticorpos 6B6C e o monoclonal anti-flavivírus 4G2, que reconhecem antígenos comuns de flavivírus, como estratégia de imunolocalização viral no tecido placentário. Nossos testes, utilizando amostras de placentas anteriores ao surto de ZIKV como controles negativos e placentas PCR positivos para ZIKV como controles positivos, demonstraram que ambos os anticorpos não apresentam marcação específica para o ZIKV (dados não mostrados).

Portanto, visando melhor compreensão da patogênese da infecção pelo ZIKV na gestação e as anomalias congênitas observadas nos fetos, os estudos de tecido placentário em casos de infecção por ZIKV tem focado na pesquisa de partícula viral por PCR, mas também por IHQ e HIS com a finalidade de demonstrar a presença e localização viral, sua quantidade no tecido, e, principalmente, determinar quais tipos celulares maternos e fetais apresentam suscetibilidade a infecção e potencialmente poderiam atuar como barreiras imunológicas ou reservatórios para a proliferação do ZIKV (62,68,71).

No estudo *in vitro* do Sheridan e seu grupo, demonstrou que a placenta no início da gravidez é de 10 a 30 vezes mais susceptível a infecção por ZIKV, pelo fato de possuir mais genes que expressam grandes quantidades de receptores virais, os quais os vírus são capazes de se ligar quando infectam a célula. Esses receptores, por sua vez, não estão em quantidades representativas nas placentas a termo, a qual se tem acesso no momento do nascimento, e assim oferecem um menor risco de transmissão do ZIKV para o feto (73). Corroborando com esses achados, nosso estudo observou incidência de 64% de anomalias do SNC e oculares na prole de gestantes cuja infecção por ZIKV ocorreu no 1º trimestre da gravidez. Por outro lado, nossos achados estão em acordo com o estudo realizado na Colômbia, onde gestantes infectadas no terceiro trimestre gestacional também não apresentaram alteração no SNC em seus neonatos (74).

Placentas provenientes de gestantes infectadas por microorganismos do grupo STORCH, podem apresentar macroscopicamente, hidropisia (acúmulo anormal de líquido) e consequente palidez da face materna, bordas irregulares e hipotransparência da membrana da face fetal (58). Apesar de alguns relatos de hidropisia fetal e edema viloso em placentas com infecção congênita por ZIKV (63,71,75) não evidenciamos hidropisia placentária e/ou edema viloso neste estudo e, no geral, as placentas infectadas com ZIKV não apresentaram alterações macroscópicas relevantes.

A característica histopatológica das infecções hematogênicas no tecido placentário é a vilosite, ou seja, inflamação das vilosidades placentárias. A maioria das infecções hematogênicas é de etiologia indeterminada (identificada como resposta inflamatória materna à agente infeccioso não identificado) (58).

O exame microscópico das placentas infectadas do grupo STORCH apresenta vilosite dos tipos necrótica e/ou proliferativa (doença em atividade) e cicatricial (doença crônica) que são fáceis de serem identificadas e podem coexistir concomitantemente, em proporções variáveis e, no geral, têm distribuição difusa, na dependência do momento da infecção, virulência do microorganismo e da capacidade imunológica materno-fetal (54). Em nosso estudo, as alterações histopatológicas das placentas infectadas com ZIKV mostrou algumas características semelhantes às lesões crônicas das placentites do grupo STORCH com predomínio de vilosite do tipo cicatricial (92% dos casos), caracterizada por fibrose estromal, calcificação vilosa e hipertrofia fibromuscular concêntrica da parede dos vasos vilosos das vilosidades de médio calibre com luz obstruída ou estreitada. Somente em um terço das placentas foi identificado vilosite proliferativa/necrótica. O padrão de distribuição focal e multifocal de vilosite predominou em nosso estudo, e raros casos apresentaram padrão difuso que é o mais frequentemente observado nos casos de placentite hematogênica do grupo STORCH, principalmente, nos casos associados a anomalias fetais.

Apesar das importantes lesões destrutivas do SNC características da síndrome congênita do ZIKV, foi observada em nosso estudo, vilosite crônica, proliferativa e necrótica em 44%, 47% e 50% dos casos com alterações no SNC, respectivamente. Uma possível explicação para este fato é que o ZIKV infecta a placenta, atinge os vasos fetais com resposta inflamatória leve nas vilosidades placentárias e atinge as vísceras fetais com especial tropismo para o sistema nervoso central, podendo causar extensas lesões destrutivas (76).

Em nosso estudo, não foi observada nenhuma alteração patognomônica associada à infecção por ZIKV ou mesmo um efeito citopático característico da

presença do vírus na coloração pelo H&E, diferentemente das alterações histopatológicas características de alguns agentes do grupo STORCH e infecções virais relacionadas, tais como a célula citomegálica do CMV, os cistos ricos em amastigotas da Toxoplasmose e as inclusões intranucleares do parvovirus e do vírus herpes simplex (50,54).

Ribeiro e seu grupo descreveram as alterações histopatológicas em placentas e produto de abortamento em casos de infecção pelo vírus da Dengue e observaram frequências variadas de deciduíte, intervilosite, vilosite focal e multifocal, vilosite necrotizante e vilosite proliferativa, além de alterações hipóxicas. O total das vilosites representou 28,5% dos casos, considerado relativamente baixo quando comparado com os resultados da IHQ para pesquisa de antígeno viral que foi positiva em 92% dos casos (59). Quando comparamos com os nossos achados, vemos que as alterações inflamatórias são semelhantes nas duas arboviroses, no entanto a frequência de vilosites encontradas nos casos de infecção por ZIKV são maiores quando comparadas com a infecção da DENV. Esse dado sugere que o ZIKV possui um tropismo aumentado não somente para células nervosas, mas também para o tecido placentário, contribuindo para o processo de transmissão vertical.

Poucos autores descreveram os achados histopatológicos nas placentas com suspeita clínica e/ou diagnóstico confirmado de infecção por ZIKV. Noronha e colaboradores observaram placentite crônica nas placentas de casos infectados por ZIKV, semelhante ao padrão STORCH, com vilosite crônica e intervilosite histiocítica, lesão vascular, edema e fibrose estromal, hiperplasia em células de Hofbauer e lesões do epitélio trofoblástico, espessamento da membrana basal trofoblástica e leve deciduíte crônica linfocítica em duas

placentas, uma do 2º trimestre e outra do 3º trimestre de gestação (62). Em uma série de 5 casos de infecção por ZIKV na gestação, composta por dois abortos e três neomortos, Martines e cols detectaram em apenas uma das placentas, também do 3º trimestre, intervilosite crônica histiocítica focal, calcificação densa e heterogênea das vilosidades, além de fibrose e edema estromal. Nessa placenta foi ainda identificada a presença de antígenos virais nas células de Hofbauer através de técnicas de IHQ (64) .

O grupo de Rosenberg e cols evidenciaram hiperplasia de células de Hofbauer, as quais também foram positivas para o RNA do ZIKV pela técnica de HIS. Essa placenta proveniente de gestação de 21 semanas cuja infecção ocorreu na 11ª semana apresentou ainda vilosidades coriais hidrópicas, mas não foram observadas necrose vilosa ou infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário (vilosite) (71).

Confrontando os nossos dados com a literatura, observamos que analisamos uma casuística de 60 placentas do 3º trimestre de gestação com infecção confirmada por ZIKV, com e sem anomalias do SNC. Encontramos alterações histopatológicas semelhantes àquelas descritas em outros estudos, sendo comum o achado de vilosite crônica do tipo STORCH, fibrose e calcificação estromal, hiperplasia concêntrica da parede de vasos vilosos e decíduite crônica. Não observamos hiperplasia de células de Hofbauer e hidropisia/edema viloso que podem, talvez, ser explicados pelo simples fato de que a nossa amostra é composta por placentas do 3º trimestre de gestação cuja grande maioria a infecção ocorreu no 1º e 2º trimestre. Considerando a presença de antígenos virais nas células de Hofbauer, podemos sugerir que no primeiro momento, a infecção por ZIKV acomete estas células localizadas no estroma

viloso que tem propriedade de macrófago (62) e que é normalmente abundante nas vilosidades do 1º e 2º trimestres. Assim, podemos supor que no momento da nossa análise, esta alteração já tenha desaparecido e a marcante fibrose estromal que evidenciamos, representa uma cicatriz da infecção. Nos casos de infecção no 3º trimestre de gestação, onde as vilosidades são fisiologicamente menores e com número reduzido de células de Hofbauer, mesmo que haja a presença de partículas virais nestas células, não observamos aumento do número de células de Hofbauer que causasse aspecto morfológico alterado.

Dentre as alterações histopatológicas encontradas, observamos nas placentas de ZIKV, decídua crônica leve em 70% dos nossos casos, com 30% de decíduas normais. Um dado intrigante encontrado foi a correlação significativa entre a decídua normal com a incidência de alterações do SNC (Tabela 3). De forma ainda mais marcante, quando a carga viral está aumentada, a chance da criança apresentar alterações no SNC foi 7 vezes maior do que os casos com carga viral menor, dado que a infecção por ZIKV ocorreu no primeiro trimestre gestacional. Quando controlamos essa relação em decíduas alteradas, não foi encontrado a mesma relação da carga viral. Esses dados levantam duas hipóteses: 1) a mulher infectada pelo ZIKV apresenta uma resposta viral fraca ou inexistente (tolerância imunológica) permitindo o aumento da carga viral mesmo na ausência de inflamação na decídua ou 2) a mulher foi capaz de gerar uma resposta imunológica extremamente eficiente contra o ZIKV no momento da infecção, ao ponto de eliminar o vírus e, no momento do nascimento a decídua aparenta ser normal e sem indicativos de inflamação aparente. Portanto, estudos de infecção experimental de placentas poderão auxiliar no entendimento

do papel da decídua no contexto da infecção pelo ZIKV, evidenciando o papel da resposta antiviral materna durante o período gestacional.

8. Conclusão

- Nossos achados corroboram a associação da infecção congênita do ZIKV com alterações do SNC, em especial a microcefalia.
- Foi possível detectar o RNA do vírus na placenta, até mesmo depois do momento do parto, podendo indicar persistência e replicação viral;
- As alterações histopatológicas mais frequentes na infecção pelo ZIKV foram a vilosite crônica com fibrose estromal, hiperplasia fibromuscular concêntrica da parede de vasos vilosos de médio calibre e deciduíte crônica leve; estes achados são semelhantes àqueles descritos nas placentites crônicas do grupo STORCH;
- Infecções próximas ao momento do parto apresentaram maior chance de detecção do ZIKV na placenta;
- Os baixos valores de Ct encontrados nos casos de decídua normal aumentam a chance de alterações no SNC.

9. REFERÊNCIAS

1. Mlakar J. Brief Report. *N Engl J Med*. 2016;10.
2. COES - MICROCEFALIAS. 2017;2016:2016–8.
3. Calvet G, Aguiar RS, Melo ASO, Sampaio SA, de Filippis I, Fabri A, et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(6):653–60.
4. Brasil P. Brasil et al, Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med*. 2015;375.
5. Moore CA, Erin Staples J, Dobyns WB, Pessoa A, Ventura C V, Borges da Fonseca E, et al. Characterizing the Pattern of Anomalies in Congenital Zika Syndrome for Pediatric Clinicians. *JAMA Pediatr*. 2016;
6. Štrafela P, Vizjak A, Mraz J, Mlakar J, Pižem J, Tul N, et al. Zika Virus-Associated Microcephaly: A Thorough Description of Neuropathologic Findings in the Fetal Central Nervous System. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2016 Oct 11 [cited 2016 Nov 21]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27726416>
7. Ventura C V., Maia M, Bravo-Filho V, Góis AL, Belfort R. Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. *Lancet*. 2016;387(10015):228.
8. Del Campo M, Feitosa IML, Ribeiro EM, Horovitz DDG, Pessoa ALS, França GVA, et al. The phenotypic spectrum of congenital Zika syndrome. *Am J Med Genet A* [Internet]. 2017;173(4):841–57. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.a.38170>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28328129>
9. Gourinat AC, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M. Detection of Zika virus in urine. *Emerg Infect Dis*. 2015;
10. Musso D, Roche C, Nhan TX, Robin E, Teissier A, Cao-Lormeau VM. Detection of Zika virus in saliva. *J Clin Virol*. 2015;
11. Barzon L, Pacenti M, Berto A, Sinigaglia A, Franchin E, Lavezzo E, et al. Isolation of infectious Zika virus from saliva and prolonged viral RNA

- shedding in a traveller returning from the dominican republic to Italy, January 2016. *Eurosurveillance*. 2016;
12. 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? *The Lancet Infectious Diseases*. 2016.
 13. Atkinson B, Graham V, Miles RW, Lewandowski K, Dowall SD, Pullan ST, et al. Complete Genome Sequence of Zika Virus Isolated from Semen. *Genome Announc*. 2016;4(5):1116–16.
 14. Pauvolid-Corrêa A, Varella RB. Aspectos epidemiológicos da Febre do Oeste do Nilo Epidemiological aspects of West Nile Fever. *Rev Bras Epidemiol*. 2008;11(3):463–72.
 15. Monath TP. Dengue: The risk to developed and developing countries. 1994;91:2395–400.
 16. Faye O, Freire CCM, Iamarino A, Faye O, de Oliveira JVC, Diallo M, et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;
 17. Vasconcelos PF da C. Doença pelo vírus Zika: um novo problema emergente nas Américas? *Rev Pan-Amaz Saude [Internet]*. 2015;6(2):9–10. Available from: <http://revista.iec.pa.gov.br>
 18. HADDOW AJ, WILLIAMS MC, WOODALL JP, SIMPSON DI, GOMA LK. Twelve Isolations of Zika Virus From *Aedes (Stegomyia) Africanus* (Theobald) Taken in and Above a Uganda Forest. *Bull World Health Organ*. 1964;31(1961):57–69.
 19. Simpson DIH. Zika Virus Infection in Man. 1964;58(4):335–7.
 20. Diallo D, Sall AA, Diagne CT, Faye O, Faye O, Ba Y, et al. Zika virus emergence in mosquitoes in Southeastern Senegal, 2011. *PLoS One*. 2014;
 21. 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;14(8):1232–9.

22. Cao-Lormeau V-M. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerging infectious diseases*. 2014.
23. Musso D, Nilles EJ, Cao-Lormeau VM. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin Microbiol Infect*. 2014;
24. Centers for Disease Control and Prevention. World Map of Areas with Risk of Zika | Travelers' Health | CDC [Internet]. [cited 2017 Mar 22]. Available from: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/page/world-map-areas-with-zika>
25. Zanluca C, De Melo VCA, Mosimann ALP, Dos Santos GIV, dos Santos CND, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(4):569–72.
26. OMS | Doença do vírus Zika. WHO [Internet]. 2016 [cited 2017 Mar 20]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/pt/>
27. 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. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(2).
28. Baronti C, Piorkowski G, Charrel RN, Boubis L, Leparç-Goffart I, De Lamballerie X. Complete Coding Sequence of Zika Virus from a French Polynesia Outbreak in 2013. *Genome Announc*. 2014;2(3):500–14.
29. Alvarez DE, De Lella Ezcurra AL, Fucito S, Gamarnik A V. Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. *Virology*. 2005;
30. Perera R, Kuhn J. Structural Proteomics of Dengue Virus. *Curr Opin Microbiol*. 2008;11(4):369–77.
31. Ma L, Jones CT, Groesch TD, Kuhn RJ, Post CB. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *pnas Off*. 2004;
32. Bricks L. Vacinas para a dengue: perspectivas. *Pediatria (Santiago)* [Internet]. 2004;26(4):268–81. Available from: <http://www.pediatrasiapaulo.usp.br/upload/pdf/1085.pdf>
33. Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An Antigen Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Reveals High Levels of the Dengue Virus Protein NS1 in the Sera of Infected Patients. *J Clin Microbiol*.

- 2000;38(3):1053–7.
34. Baleotti FG, Moreli ML, Figueiredo LTM. Brazilian Flavivirus Phylogeny Based on NS5. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;
 35. Driggers RW. Brief Report. *N Engl J Med*. 2016;22.
 36. De Carvalho NS, De Carvalho BF, Fugaça CA, Dóris B, Biscaia ES. Zika virus infection during pregnancy and microcephaly occurrence: A review of literature and Brazilian data. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2016.
 37. Plourde A, Bloch E. A Literature Review of Zika Virus. *Emerg Infect Dis*. 2016;22.
 38. Iosifidis S, Mallet HP, Leparac Goffart I, Gauthier V, Cardoso T, Herida M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Medecine et Maladies Infectieuses*. 2014.
 39. Kool JL, Ph D, Lanciotti RS, Ph D, Pretrick M, Dubray C, et al. Duffy Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia *NEJM* 2008. 2009;2536–43.
 40. Oehler et al. Oehler et al, Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome- case report, FP, december 2013. 2014;
 41. Oliveira. Prolonged Shedding of Zika Virus Associated with Congenital Infection. *N Engl J Med* [Internet]. 2016;375(1):62–72. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra1413456%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1056/NEJMra1413456>
 42. Increase of microcephaly in the northeast of Brazil. *PAHO*. 2015;(November):3–4.
 43. Foy BD, Kobylinski KC, Foy JLC, Blitvich BJ, da Rosa AT, Haddow AD, et al. Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(5):880–2.
 44. Ritter JM, Martines RB, Zaki SR. Zika Virus: Pathology From the Pandemic. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2016;141(January):arpa.2016-0397-SA. Available from: <http://www.archivesofpathology.org/doi/10.5858/arpa.2016-0397-SA>

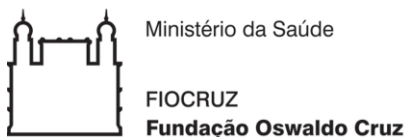
45. Coyne CB, Lazear HM. Zika virus — reigniting the TORCH. *Nat Publ Gr.* 2016;14.
46. CLAP/OPAS. Infecções Perinatais transmitidas de mãe para filho durante a gravidez [Internet]. 2010. 58 p. Available from: http://www.paho.org/clap/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=publicaciones&alias=164-infeccoes-perinatais-transmitidas-de-mae-para-filho-durante-a-gravidez&Itemid=219&lang=en
47. Yadav RK, Maity S, Saha S. A review on TORCH: groups of congenital infection during pregnancy. *J Sci Innov Res* 2014; 3 258-264. 2014;3(2):258–64.
48. Marisa Márcia Mussi-Pinhata AYY. Infecções congênitas e perinatais. *J Pediatr (Rio J)* [Internet]. 1999;75. Available from: <http://www.jped.com.br/conteudo/99-75-S15/port.asp>
49. Forrest. Forrest et al, Gregg's congenital rubella patients 60 years later. *MJA.* 2002;177.
50. Garcia A. Causas Infecciosas das Anomalias Congênicas.pdf. 1981.
51. Cheeran MC-J, Lokensgard JR, Schleiss MR. Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus infection: disease mechanisms and prospects for intervention. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2009;22(1):99–126, Table of Contents. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2620634&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
52. Schleiss MR. Congenital cytomegalovirus infection: molecular mechanisms mediating viral pathogenesis. *Infect Disord Drug Targets* [Internet]. 2011;11(5):449–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21827434> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3869401>
53. Benirschke K, Kaufmann P BR. Pathology of the Human Placenta [Internet]. Springer New York; 2006 [cited 2017 Mar 20]. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/b137920>
54. Aparecida Gomes Pinto Garcia e Achiléa Lisboa Bittencourt. Infecções congênicas transplacentárias [Internet]. REVINTER, editor. 1995. 23-27 p. Available from: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/3308/2/2002_pathogenesis_and_pathology_of_hematogenous_infections2.pdf

55. Delorme-Axford E, Sadovsky Y, Coyne CB. The Placenta as a Barrier to Viral Infections. *Annu Rev Virol* [Internet]. 2014;1(1):133–46. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-virology-031413-085524>
<http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-virology-031413-085524>
56. Mor G, Cardenas I, Abrahams V, Guller S. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. 2011;1221(1):80–7.
57. Cardenas GM and I. The Immune System in Pregnancy: A Unique Complexity. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63(6):425–33.
58. Salafia CM, Popek EJ. Inflammatory and Vascular Placental Pathology. *Glob Libr Women's Med* [Internet]. 2009; Available from: http://www.glowm.com/index.html?p=glowm.cml/section_view&articleid=152
59. Ribeiro CF, Lopes VG, Brasil P, Coelho J, Muniz AG, Nogueira RM. Perinatal transmission of dengue: a report of 7 cases. *J Pediatr*. 2013;163:1514–6.
60. Machado CR, Machado ES, Denis Rohloff R, Azevedo M, Campos DP, de Oliveira RB, et al. Is Pregnancy Associated with Severe Dengue? A Review of Data from the Rio de Janeiro Surveillance Information System. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(5):5–8.
61. Sinhabahu VP, Sathananthan R, Malavige GN. Perinatal transmission of dengue: a case report. *BMC Res Notes* [Internet]. 2014;7:795. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4237779&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
62. De Noronha L. Noronha et al, ZIKA VIRUS DAMAGES THE HUMAN PLACENTAL BARRIER AND PRESENTS MARKED FETAL NEUROTROPISM. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016;
63. Cauchemez S. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-15: A retrospective study. *Lancet*. 2016;
64. Martines RB, Bhatnagar J, Maria De Oliveira Ramos A, Pompeia H, Davi F, D' S, et al. Pathology of congenital Zika syndrome in Brazil: a case series. *Lancet (London, England)*. 2016;388.

65. Cugola F, Benazzato C, Almeida N, Pignatari GC, Romero S, Polonio CM, et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature* [Internet]. 2016;534(7606):267–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature18296>
66. Sérgio De Carvalho N, Freitas De Carvalho B, Dóris B, Evellyn J, Biscaia S, Cyllian J, et al. Zika virus and pregnancy: An overview. *Am J Reprod Immunol*. 2017;
67. Baurakiades E, Martins AP, Moreschi NV, Souza C Da, Abujamra K, Saito AO, et al. Histomorphometric and immunohistochemical analysis of infectious agents, T-cell subpopulations and inflammatory adhesion molecules in placentas from HIV-seropositive pregnant women. *Diagn Pathol* [Internet]. 2011;6:101. Available from: <http://www.diagnosticpathology.org/content/6/1/101>
68. Bhatnagar J. Bhatnagar et al, Zika Virus RNA replication and persistence in Brain and Placenta tissue. *Emerg Infect Dis*. 2017;23.
69. Mor G. Placental Inflammatory Response to Zika Virus may Affect Fetal Brain Development. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2016.
70. Oliveira Melo AS, Malinger G, Ximenes R, Szejnfeld PO, Alves Sampaio S, Bispo De Filippis AM. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: Tip of the iceberg? *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2016.
71. Rosenberg AZ, Yu W, Hill DA, Reyes CA, Schwartz DA, Hyg M. Placental Pathology of Zika Virus Viral Infection of the Placenta Induces Villous Stromal Macrophage (Hofbauer Cell) Proliferation and Hyperplasia. *Arch Pathol Lab Med*. 2017;141.
72. Bayer A, Lennemann NJ, Ouyang Y, Bramley JC, Morosky S, Marques ETDA, et al. Type III Interferons Produced by Human Placental Trophoblasts Confer Protection against Zika Virus Infection. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2016;19(5):705–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.03.008>
73. Sheridan MA, Yunusov D, Balaraman V, Alexenko AP, Yabe S, Verjovski-Almeida S, et al. Vulnerability of primitive human placental trophoblast to Zika virus. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2017;201616097. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28193876><http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1616097114>

74. Pacheco O, Beltrán M, Nelson C a, Valencia D, Tolosa N, Farr SL, et al. Zika Virus Disease in Colombia - Preliminary Report. *N Engl J Med* [Internet]. 2016;1–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27305043>
75. Sarno M, Sacramento GA, Khouri R, do Rosário MS, Costa F, Archanjo G, et al. Zika Virus Infection and Stillbirths: A Case of Hydrops Fetalis, Hydranencephaly and Fetal Demise. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;
76. Chimelli L, Melo ASO, Avvad-Portari E, Wiley CA, Camacho AHS, Lopes VS, et al. The spectrum of neuropathological changes associated with congenital Zika virus infection. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2017 Mar 22 [cited 2017 Apr 3];1–17. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00401-017-1699-5>

Apêndice I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Exposição Vertical ao Zika Vírus e suas consequências no neurodesenvolvimento da criança

Pesquisadora: Maria Elisabeth Lopes Moreira

Contato: Avenida Rui Barbosa 716 telefone (21) 25541911

Instituição: Instituto Nacional de Saúde da Mulher da Criança e do Adolescente

Endereço: Avenida Rui Barbosa 716, Flamengo.

Nome da gestante: _____

Prontuário: _____

Estamos convidando o seu bebê e você a participar da pesquisa intitulada “Exposição Vertical ao Zika vírus e suas consequências no neurodesenvolvimento da criança” pois você ficou grávida em um período onde o vírus está circulando.

Algumas vezes pessoas que tiveram contato com o vírus da Zika não apresentam sintomas por isso iremos realizar esta pesquisa com um grupo de gestantes e recém-nascidos que nasçam neste período em que o vírus da Zika está circulando, e queremos acompanhar a sua gravidez e o desenvolvimento neurológico do seu filho do nascimento até o final do terceiro ano de vida.

Para isto você e seu filho serão acompanhados no pré-natal do IFF. Você terá seus exames colhidos e até o nascimento do bebê, será acompanhada com ultrassonografia em alguns momentos e a criança também terá todos os exames colhidos e será acompanhada até o final do terceiro ano de vida no ambulatório do IFF. Se o bebê já tiver nascido, você deverá trazer todos os exames que você fez no pré-natal, seu cartão de pré-natal se tiver e somente o seu bebê será acompanhado.

Os seguintes exames serão obtidos para fins desta pesquisa:

- 1- Na gestante: Exame de sangue e ou urina para saber se teve contato com o vírus da Zika e outros vírus como citomegalovírus, rubéola, dengue e chikungunha e toxoplasmose; Ultrassonografias seriadas e outros exames que forem necessários para o seu adequado pré-natal. Estes exames serão colhidos se você apresentar algum sintoma para virose como vermelhidão da pele, febre, dor no corpo, dor na cabeça. Se você não apresentar sintomas vamos colher sangue para armazenar e fazer testes sorológicos em cada trimestre da gravidez ou a cada vez que você precisar de colher sangue para a sua gravidez. Se a ultrassonografia apresentar alguma anomalia congênita e você tiver indicação obstétrica, será também realizada punção de líquido amniótico para realização de testes genéticos e pesquisa do vírus.
- 2- No recém-nascido: Exame de sangue para saber se teve contato com o vírus da Zika e outros vírus como citomegalovírus, rubéola, dengue e chikungunha e toxoplasmose; ultrassonografia da moleira e/ou tomografia e/ou ressonância nuclear magnética, eletroencefalograma, exames com oftalmologista, exames auditivos e exame neurológico. Todos estes exames serão feitos e colhidos logo após o nascimento. Depois o recém-nascido será acompanhado até completar 3 anos. Exames para acompanhar o desenvolvimento serão realizados e também outros exames auditivos e oftalmológicos se necessários;
- 3- Sua placenta e o sangue do cordão umbilical também serão examinados. Será colhido sangue do cordão umbilical para evitar coletas de sangue no bebê;

- 4- Se você perder o bebê, também estamos solicitando sua autorização para que ele seja examinado pela anatomia patológica com exames específicos (morfológicos e de imunohistoquímica) para tentar descobrir os motivos.
- 5- Se você estiver amamentando e tiver vermelhidão na pele e/ou outros sintomas de zika, também iremos colher amostras de sangue suas e de seu bebe e também amostras do seu leite sequenciais.

Como atualmente, existem poucos conhecimentos científicos sobre a Zika, estamos pedindo sua autorização para armazenar amostras de sangue/urina, de placenta e de tecidos fetais (se houver perda do bebê) em um local específico (biorepositório) para futuros estudos. As amostras serão usadas para estudar viroses e suas consequências na gravidez. Se houver alguma alteração nos seus exames ou alterações no seu bebe solicitamos também autorização para uso de imagem através de fotografias que não serão identificadas.

Os riscos relacionados a sua participação na pesquisa são os mesmo que ocorrem em uma coleta de sangue, como hematomas e dor, tanto em você como no seu bebe. Os exames oftalmológicos necessitam de colírios para dilatar a pupila o que pode ocasionar ardência passageira. Ultrassonografias não doem e outros exames que envolvam radiação só serão realizados se houver alteração na ultrassonografia ou alguma indicação muito importante. Se estes exames forem alterados os exames de ressonância magnética serão realizados já que eles são necessários para o acompanhamento do bebe. Exames de ressonância costumam necessitar de anestesia ou sedação que será feita por profissional capacitado. Os exames para testar o desenvolvimento adequado não causam dor e apenas precisam de um certo tempo para realização. Punção de líquido amniótico tem um risco de perda fetal associado ao procedimento de 0,5% (a perda de um feto a cada 200 exames realizados) e só será indicada se estritamente necessária para melhorar o diagnóstico.

Os benefícios estão ligados ao acompanhamento da sua gravidez e do desenvolvimento do seu recém-nascido no IFF, com vários exames. Você receberá uma cópia dos resultados de todos os exames.

A sua participação e de seu filho/a nesta pesquisa é voluntária e você pode abandonar ou retirar-se do estudo a qualquer momento, sem que isso cause qualquer prejuízo ao tratamento ou acompanhamento do bebe nesta instituição. Em caso de saída do estudo você e seu bebê continuaram a ser atendidos no IFF conforme rotina atual da instituição. Sua participação no estudo não implicará em custos adicionais, não haverá qualquer despesa com a realização dos procedimentos previstos neste estudo. Também não haverá nenhuma forma de pagamento pela sua participação. Se houver dano a você ou seu bebe relacionado a procedimentos da pesquisa você terá direito a indenização. Todos os resultados dos exames ficarão no seu prontuário médico.

Este documento foi elaborado em três vias. Você receberá a via original deste documento assinado e com todas as páginas rubricadas, tanto pela pesquisadora quanto por você ou o responsável que assinar.

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Fernandes Figueira é um comitê de avaliação ética dos projetos de pesquisa que estejam em curso na instituição. O CEP funciona de segunda à sexta-feira, no horário das 08 às 17 h, e se encontra à disposições para eventuais esclarecimentos éticos e outras providências que se façam necessárias (e mail: cepiff@iff.fiocruz.br; telefone: 2554-1730/fax: 2552-8491).

Estamos solicitando abaixo seu consentimento livre, esclarecido e voluntario na qualidade de participante da pesquisa e responsável pelo recém-nascido:

Em relação a filmagem e uso de imagem você pode:

[] autorizar voluntariamente a fotografia/filmagem do seu filho (a) e a utilização das imagens obtidas exclusivamente em meios de divulgação acadêmicos.

_____ assinatura

[] não autorizar a fotografia/filmagem do seu filho (a) e a utilização de imagens obtidas.

_____ assinatura

Declaração:

1- Declaro que li e entendi todo o conteúdo deste documento.

2 – Declaro que entendi que a participação na pesquisa pode ocorrer sem que meu filho (a) seja fotografado e/ou filmado, a não ser que eu tenha autorizado a filmagem ou fotografia.

3- Declaro que autorizo o armazenamento de material biológico para futuros estudos [] _____ assinatura

4- Declaro estar recebendo uma via original deste documento assinado pelo Investigador Responsável e por mim, tendo todas as folhas por nós rubricadas.

Responsável:

Data:

Telefone:

Testemunha

Documento:

Endereço/telefone:

Pesquisadora Responsável

Data:

Instituto Fernandes Figueira

Av. Rui Barbosa 716 Flamengo

Tel.: 2554-1739

Apêndice II – Ficha de coleta de dados



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



IFF

INSTITUTO NACIONAL
DE SAÚDE DA MULHER, DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE | FERNANDES FIGUEIRA

EXPOSIÇÃO VERTICAL AO VÍRUS ZIKA

Z-Código: _____

1. Identificação

Nome do paciente: _____

Prontuário: _____

Sexo: () Masc () Fem () Indeterminado Data Nascimento: ___/___/___

Local: _____

Classificação:

() Exposto assintomático [() gestação () periparto () Leite Materno]

Sintomático: () SZC () Alteração laboratorial isolada () Alteração imagem isolada

() Alteração clínica: () Neurológica () Outra: _____

Nome da Mãe: _____

DN Mãe: ___/___/___ Idade mãe: _____ anos Pront Mãe: _____

Raça/Cor: () Branca () Preta () Amarela () Parda () Indígena

(Etnia: _____) () Ignorado Escolaridade (maior nível completo):

() Sem escolaridade () Fundamental () Fundamental II () Médio () Superior

() Ignorado

Ocupação: _____

Nome do Pai: _____ DN Pai: ___/___/___

Idade pai: _____ anos

Endereço

atual: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ UF: _____ C

EP _____

Tel. Mãe: () _____ Tel. Pai: () _____ Tel. Fixo: () _____

Tipo de residência: () casa () apartamento () outro _____

Comunidade: () não () sim

Nº pessoas que moram na casa: _____ Renda familiar mensal: _____ reais

Auxílio governamental: () não () sim, qual? () BPC () BF () TFD () Passe () Outro: _____

2. História gestacional

Pré-natal? () Não () Sim

Nº consultas: Total: _____ Data da 1ª: ____ / ____ / ____ Idade gest.: ____ sem

Trimestre:

() 1º () 2º () 3º

Gestação planejada: () não () sim

Desenvolveu alguma complicação durante a gestação? () Não () Sim, qual: () ITU

() Anemia

() Diabetes gestacional () HAS gestacional () Pré-eclampsia () Placenta prévia () Oligodrâmnio

() Polidrâmnio () Insuficiência do colo uterino () Hiperemese gravídica (

) Anomalias anatômicas do útero () Deslocamento de placenta () Crescimento intrauterino restrito () Incisura

() Outras:

Dengue anterior: () não () sim () ignorado nº de vezes: _____ Quando: há _____ ano(s) **Chikungunya anterior:** () não () sim () ignorado nº de vezes: _____ Quando: há _____ ano(s)

Contato ou convívio com pessoas com quadro sugestivo de Zika/Chikungunya/dengue durante a gestação: () não () sim Período:

Diagnóstico laboratorial de alguma doença infecciosa? () Não () Sim, qual:
 () Toxoplasmose () Rubéola () Citomegalovírus () Sífilis () Herpes simples ()
 Parvovírus () HIV
 () Dengue () Chikungunya () Outras.
 Especificar: _____

Febre > 38° sem rash: () não () sim

Período: _____

Você teve manchas vermelhas no corpo durante a gestação? () não () sim
 Quantas vezes? _____

1º episódio: Quando? () 1º Trim () 2º Trim () 3º Trim _____ sem
 gestação _____ mês gestação

Data do início do exantema: ___ / ___ / ___ Duração? _____ d

Iniciou onde? () Cabeça/pescoço () Tronco () MMSS () MMII () Difuso
 por todo corpo

Disseminou? () Não () Sim, p/ onde? () Cabeça/pescoço () Tronco ()
 MMSS () MMII () todo corpo

Outros sinais e sintomas? () Febre, temperatura máxima? _____ °C
 duração: _____ d

() Prurido () Tosse () Coriza () Cefaleia () Mialgia () Artralgia, quanto
 tempo? _____ d () Vômitos () Linfadenopatia () Hiperemia conjuntival ()
 Dor retroorbital () Outros: _____ **Se teve outros**

sintomas, o rash surgiu: () Primeiro () Logo após () Dias após os outros
 sintomas

Tomou remédio? () Não () Sim, qual? _-

Teve atendimento médico? () Não () Sim, qual diagnóstico
 clínico? _____

Diagnóstico laboratorial de Zika? () Não () Sim

() Sorologia: () IgM+ () IgM- () IgG+ () IgG- () sem resultado

Data: ___ / ___ / ___ LAB: _____

() PCR: () sg () urina () Líq. Amniótico () Pos () Neg () Ign

Data: ___ / ___ / ___ LAB: _____

()PCR: ()sg ()urina ()Líqu. Amniótico ()Pos ()Neg ()Ign

Data:___/___/___ LAB:_____

()PCR: ()sg ()urina ()Líqu. Amniótico ()Pos ()Neg ()Ign

Data:___/___/___ LAB:_____

2º episódio: Quando? ()1º Trim ()2º Trim ()3º Trim _____sem
gestação _____mês gestação

Data do início do exantema: ___/___/___ Duração? _____d

Iniciou onde? ()Cabeça/pescoço ()Tronco ()MMSS ()MMII ()Difuso
por todo corpo

Disseminou? ()Não ()Sim, p/ onde? ()Cabeça/pescoço ()Tronco ()
MMSS ()MMII ()todo corpo

Outros sinais e sintomas? ()Febre, temperatura máxima?_____°C
duração:_____d

()Prurido ()Tosse ()Coriza ()Cefaleia ()Mialgia ()Artralgia, quanto
tempo?_____d ()Vômitos ()Linfoadenopatia ()Hiperemia conjuntival ()
Dor retroorbital ()Outros:_____ **Se teve outros**

sintomas, o rash surgiu: ()Primeiro ()Logo após ()Dias após os outros
sintomas

Tomou remédio? ()Não ()Sim, qual? _-

Teve atendimento médico? ()Não ()Sim, qual diagnóstico
clínico?_____

Diagnóstico laboratorial de Zika? ()Não ()Sim

()Sorologia: ()IgM+ ()IgM- ()IgG+ ()IgG- ()sem resultado

Data:___/___/___ LAB:_____

()PCR: ()sg ()urina ()Líqu. Amniótico ()Pos ()Neg ()Ign

Data:___/___/___ LAB:_____

()PCR: ()sg ()urina ()Líqu. Amniótico ()Pos ()Neg ()Ign

Data:___/___/___ LAB:_____

()PCR: ()sg ()urina ()Líqu. Amniótico ()Pos ()Neg ()Ign

Data:___/___/___ LAB:_____

Hábitos durante a gestação

Álcool: Fez uso de bebida alcoólica durante a gestação? () Não () Sim () Até confirmar, _____ sem

Com que frequência você utilizava bebidas alcoólicas por semana? (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7 ou mais)

Quantas doses ou drinks você costumava tomar nesses dias? (1) (2) (3 ou mais)

Com que frequência tomava mais que três doses ou drinks na mesma ocasião?

() Nunca

() mensalmente ou menos () Mensalmente () Semanalmente (

) Diariamente () Ignorada

Tabagismo: Em relação ao cigarro, você diria que:

() Nunca fumei () Fumei no passado, mas na gestação não

() Fumei <10 cigarros por dia () Fumei 10 a 20 por dia () Fumei > 20 por dia

() Não sei

Se fumante, há quantos anos fuma diariamente? _____

Se ex-fumante, parou de fumar há quanto tempo? _____ () dias () semanas

() meses () anos

Drogas ilícitas: () Não () Sim Qual? () Maconha () Cocaína cheirada (

) Qualquer droga injetável

() Crack ou merla () Lança-perfume, loló, cola, éter, solventes, esmalte, tinta, clorofórmio () LSD

() Ecstasy () Anfetamina ou remédios para emagrecer

Padrão de uso:

US obstétrica Alterada: () Não fez US () Não () Sim Data ___/___/___
 _____ Sem gest

Microcefalia: () sim () não PC _____ Calcificações: () sim () não

Ventriculomegalia: () sim () não

Outros

achados: _____

Última US normal antes da alterada: Data ___/___/___ _____ Sem gest

Exames na gestação:

Exame	Data	Resultado				
Anti-HIV	___/___/___ ___	() Pos	() Neg	() Ign		
Toxoplas mose	___/___/___ ___	() IgG+	() IgG-	() IgM+	() IgM-	() Ign
CMV	___/___/___ ___	() IgG+	() IgG-	() IgM+	() IgM-	() Ign
HSV	___/___/___ ___	() IgG+	() IgG-	() IgM+	() IgM-	() Ign
Sífilis (VDRL)	___/___/___ ___	() Não Reator	___/___ -			
Outros						
	___/___/___ ___					
	___/___/___ ___					

3. História Familiar

PC da mãe: _____ PC do pai: _____

Há algum grau de parentesco entre os pais? () Não () Sim, qual?

_____ Você possui alguma malformação

congenita? () Não () Sim, qual(is)? _____ Há alguém

na sua família, ou na do seu companheiro, que nasceu com microcefalia? () Não

() Sim Você fazia uso de algum medicamento de uso contínuo? () Não () Sim, qual(is)?

Teve diagnóstico de alguma doença pré-existente? () Não () Sim, qual(is)?

() Diabetes () Outras doenças metabólicas () Hipertensão arterial sistêmica
 () Cardiopatia crônica () Doença renal crônica () Pneumopatias crônicas () Hemoglobinopatia () Câncer () Doença auto-imune () Doença neuroléptica
 () Outras, especificar _____

4. Heredograma

5. Histórico obstétrico/ginecológico: Considerar abortos, natimortos, gestação e filho atual

Primeira gestação? () Não () Sim F^o Malformação? () Não () Sim, qual? _____

G ____ P ____ A ____ (____ espontâneos e ____ provocados) ____ neomortos
 ____ natimortos

6. História Perinatal

Id Gest: ____ sem ____ dias () Capurro () Ballard DUM: ____/____/____ () PMT () Termo () Pós-termo

Gemelar: () Não () Sim, especificar: () 1^o Gemelar () 2^o Gemelar () 3^o

Gemelar

Tipo de parto: () Normal (Vaginal) () Fórceps () Cesáreo () Neomorto () Natimorto

7. Placenta: anatomia patológica: () não () sim () Ign, Resultado: () Ign () Normal () Alterada

8. RN:

Peso: _____g Comprimento: _____cm Perímetro torácico: _____cm
PC: _____cm (z-score: _____), PC medido 24-48h após? () não () sim
_____cm

Apgar: 1º minuto: _____ 5º minuto _____ 10º minuto _____ Alta maternidade:
_____ dias de vida

Alterações neonatais? () não () sim, especificar: () icterícia () sepse () taquipnéia transitória

() Membrana Hialina () Aspiração de mecônio () Enterocolite () Convulsões () outras, especificar:

9. Exames Laboratoriais RN:

Exame	Data	Resultado	Exame	Data	Resultado
TGO	/ /		Ht	/ /	
TGP	/ /		Hb	/ /	
FA	/ /		Leucometria	/ /	
Glicose	/ /		Plaquetas	/ /	

Avaliação Genética? () Não () Sim Data: ____/____/____ () Normal () Alterado

Exame do RN	Norma I	Alterações observadas
Pele / Anexos		() excesso de pele em região occipital () Fóvea
Crânio		PC: _____cm (z-score: _____), <i>marcar gráfico!</i> FA: ____X____cm (fechada: 0x0) () plana () abaulada () deprimida

		() Suturas cavalgadas _____ () Proeminência occipital () Fronte estreita com depressão frontal bilateral
Face		() Desproporção craniofacial
Olhos / Nariz		
Boca / Perioral		
Dentes		
Pescoço		() Excesso de pele
Adenomegalia		Cadeia: () cervical () axilar () inguinal _____ N° ____ Tamanho: _____ cm Característica: _____
Tórax e ausculta Cardiopulmonar		() sopro _____ _____
Abodome / Visceras		() Hérnia _____ () Hepatomegalia ____ cm ()) Esplenomegalia __ cm
Quadril		() Displasia
Genitália / Períneo		
MMSS		() Artrogripose MSD/MSE
MMII		() Artrogripose (MID / MIE) () Ortolani + (Dir / Esq) ()) Pé torto (1 / 2)
Dorso / Coluna Vertebra		() Dimple sacral
Sistema Nervoso / Sinais Neurológicos		() Hipertonia () Hipotonia () Hiperreflexia ()) Hiperexcitabilidade () convulsão () ADM
Pares Cranianos		

10. Outras Avaliações

	Data	N	Alterado	OBS
Cardiologia				
ECO1	/ /			
ECO2	/ /			
Holter	/ /			
Auditiva				
TAN (EOAE)	/ /			
EOAE 2	/ /			
PEATE 1	/ /			
PEATE 2	/ /			
Oftalmo			NO: (1)palidez (2)escavação (3)Hipoplasia Atrofia: (4)retiniana (5)macular (6)mobilização de pigmento (7)Coloboma Outros: descrever	Rever:
FO 1	/ / Óculos:(S)(N)		(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) Outros:	Rever:
FO 2	/ / Óculos:(S)(N)		(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) Outros:	Rever:
FO 3	/ / Óculos:(S)(N)		(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) Outros:	Rever:
FO 4	/ / Óculos:(S)(N)		(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) Outros:	Rever:
Imagem			(1)Microcefalia (2)Calcificação: (2.1)tálamo (2.2)periventriculares (2.3)parenquimatosas (2.4)cerebelo (3)Paquigiria (4)Lissencefalia	

			(5)Esquizecefalia (6)Hidrocef supratentorial (7)Dilatação IV Ventr. (8)Megacisterna Magna (9)Hemorragia (9.1)Grau I (9.2)parenquimatosa (10)Hipoplasia (11)Protuberância óssea (11.1)occipital (11.2)temporal (12)Sem indicação Outros: descrever	
US Abdome	/ /			
USTF	/ /		(1) (2)[(2.1) (2.2) (2.3) (2.4)] (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9)[(9.1) (9.2)] (10) (11)[(11.1)(11.2)] (12) Outros:	
TC crânio	/ /		(1) (2)[(2.1) (2.2) (2.3) (2.4)] (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9)[(9.1) (9.2)] (10) (11)[(11.1)(11.2)] (12) Outros:	
RNM	/ /		(1) (2)[(2.1) (2.2) (2.3) (2.4)] (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9)[(9.1) (9.2)] (10) (11)[(11.1)(11.2)] (12) Outros:	
Neurologi a				
EEG	/ /		_____ _____ _____ _____ _____	
PL	/ /		Aspecto: ()Límpido ()Purulento ()Hemorrágico ()Turvo	

			() Xantocrômico () Outros () Ignorado Hemácias: _____ mm ³ Leucócitos: _____ mm ³ PMN: _____ % MN _____ % Proteínas _____ mg/dl Glicose _____ mg/dl Cloreto _____ mg/dl	
Fono	/	/		

11. Outras Avaliações

	Material	Data	IgM	IgG	PCR
CMV					
Toxoplasmose					
Sífilis					
Chikungunya					
Dengue					
Vírus Zika	Sangue				
Vírus Zika	Urina				
Vírus Zika	Placenta				
Vírus Zika	Leite Materno				
Vírus Zika	Líquor				

Outros exames (data/exame/resultado):

12. Acompanhamento Neurológico:

Data	N	Alterado: (1)Hipertonia (2)Hipotonia (3)Hiperreflexia (4)ADM (5)convulsão (6)Hiperexcitabilidade Outros: Descrever	OBS
/ /		(1) (2) (3) (4) (5) (6)	
/ /		(1) (2) (3) (4) (5) (6)	
/ /		(1) (2) (3) (4) (5) (6)	
/ /		(1) (2) (3) (4) (5) (6)	
/ /		(1) (2) (3) (4) (5) (6)	
/ /		(1) (2) (3) (4) (5) (6)	
/ /		(1) (2) (3) (4) (5) (6)	
/ /		(1) (2) (3) (4) (5) (6)	
/ /		(1) (2) (3) (4) (5) (6)	

Medicação:

13. Avaliação do desenvolvimento:

Teste Aplicado	Data	Idade	N (p)	Alterado (Descrição)
Linguagem 12m				
Linguagem 24m				
Linguagem 36m				

14. Avaliação Nutricional: Ganho de peso

Sucção adequada neonatal? () não () sim Leite Materno: () não () sim, tempo:

Gastrostomia? () não () sim, data: ___/___/___ Idade: _____

Dificuldade de ganho de peso? () não () sim Idade: _____

Observação: _____

15. Intercorrências

Data	Idade	Problema	Evolução

16. Encerramento do caso

Data: ___/___/___

() abandono Data da última consulta: ___/___/___ Contato telefônico

Data: ___/___/___

() alta p/pediatria

() Outro

hospital: _____

() óbito Causa

mortis: _____

Necropsia: () não () sim, no IFF? () sim () não, onde? _____

Resultado: _____

17. Comentários:

Último preenchimento (**usar lápis**): ___/___/___ Última digitação (**usar lápis**): ___/___/___

