

**MINISTÉRIO DA SAÚDE**

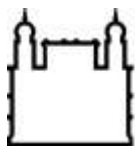
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós- Graduação Medicina Tropical

LACTENTES EXPOSTOS AO ZIKA VIRUS DURANTE A  
GESTAÇÃO: ESTUDO LONGITUDINAL NO RIO DE  
JANEIRO, BRASIL

Liége Maria Abreu de Carvalho

Rio de Janeiro  
Dezembro de 2021



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

*LIÉGE MARIA ABREU DE CARVALHO*

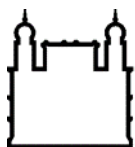
**LACTENTES EXPOSTOS AO ZIKA VIRUS DURANTE A GESTAÇÃO:  
ESTUDO LONGITUDINAL NO RIO DE JANEIRO, BRASIL**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências na área de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

**Orientadora:** Dra. Patrícia Brasil

**RIO DE JANEIRO**

Dezembro de 2021



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

CARVALHO, LIÉGE MARIA ABREU DE.

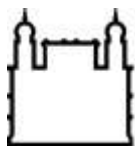
LACTENTES EXPOSTOS AO ZIKA VIRUS DURANTE A GESTAÇÃO: ESTUDO LONGITUDINAL NO RIO DE JANEIRO, BRASIL / LIÉGE MARIA ABREU DE CARVALHO. - Rio de Janeiro, 2021.  
XX; 96 f.; il.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2021.

Orientadora: PATRÍCIA BRASIL.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. ZIKA VIRUS. 2. TRANSMISSÃO VERTICAL. 3. ESTUDOS DE COORTE.  
I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

***LIÉGE MARIA ABREU DE CARVALHO***

**LACTENTES EXPOSTOS AO ZIKA VIRUS DURANTE A GESTAÇÃO:  
ESTUDO LONGITUDINAL NO RIO DE JANEIRO, BRASIL**

**ORIENTADOR: Dra. Patrícia Brasil**

**Aprovada em: 15/12/2021**

**EXAMINADORES:**

Prof. Dra. Vanessa Salete de Paula (Presidente da banca)

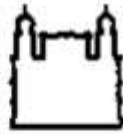
Prof. Dra. Thalita Fernandes de Abreu

Prof. Dra. Heloisa Viscaíno Fernandes

Prof. Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto

Prof. Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa

Rio de Janeiro, 15 de dezembro de 2021



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado acadêmico em Medicina Tropical de **Liege Maria Abreu de Carvalho**, sob orientação da Dra. Patricia Brasil. Ao décimo quinto dia do mês de dezembro de dois mil vinte e um, realizou-se às nove horas, de forma síncrona remota, o exame da tese de doutorado acadêmico intitulada: "**Lactentes expostos ao Zika virus durante a gestação: estudo longitudinal no Rio de Janeiro, Brasil**", no Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Medicina - área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias, na linha de pesquisa: Infecções e Doenças produzidas por vírus. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr<sup>o</sup>. Vanessa Saete de Paula – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr<sup>o</sup>. Heloisa Viscaíno Fernandes Souza Pereira – UERJ/RJ, Dr<sup>o</sup>. Thalita Fernandes de Abreu – UFRJ/RJ e como suplentes: Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto – IOC/FIOCRUZ e Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa – IOC/FIOCRUZ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela **APROVAÇÃO** da defesa da tese de doutorado acadêmico. De acordo com o regulamento do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Medicina está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Presidente da Banca atesta a decisão e a participação da aluna e de todos o membros da banca de forma síncrona remota. O Coordenador Adjunto do Programa Dr. Marco Aurélio Pereira Horta, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 15 de dezembro de 2021.

Dra. Vanessa Saete de Paula (Presidente da Banca):

Dr. Marco Aurélio Pereira Horta (Coordenador Adjunto do Programa):

***Dedico essa tese às mães, parceiras desta caminhada.  
Mães de espera, partos, impactos, espantos e encontros.***

***Mães de fibra, de afeto, de pulso e passos.***

***Mães de recomeços, de provações.***

***A elas, este trabalho.***

***Elas que ensinam e firmam antigos e novos saberes***

***De afeto e ação.***

***Mães que refazem e reforçam o cordão.***

(Texto e dedicatória: poema de Delayne Brasil, feito para este fim)

## AGRADECIMENTOS

À minha filha Nina, a quem retirei muita atenção, paciência e acompanhamento. Você é a razão da minha vida e do grande amor que hoje carrego no meu coração. Te amo!

Aos meus pais, José Armando “*in memoriam*” e Odinéa, pelo apoio, amor, carinho e dedicação e por terem me mostrado o caminho do respeito, simplicidade, dignidade, honestidade e amor ao próximo.

Ao meu pai, que hoje não estando hoje por aqui, segue comigo em todos os momentos da minha vida.

A minha família, especialmente minha tia Olian, pelo apoio e incentivo incondicional, sinônimo de força e união.

Às minhas amigas Adriana, Lisia e Claudia, pela amizade, carinho e companheirismo de sempre; por estar sempre torcendo pelas minhas conquistas, que desde a infância crescem ao meu lado, compartilhando de histórias e tantos aprendizados. Lisia sempre me ajudando na escrita das dissertações!

Aos meus avós, partiram, mas deixaram comigo um mundo de lembranças e histórias preciosas.

Agradeço a Dra. Patricia Brasil, a oportunidade de tê-la como orientadora. Tenho muito orgulho de citá-la como uma das responsáveis pela minha formação profissional. Agradeço pela confiança, pela amizade, conselhos e paciência.

Às amigas, Denise, Maria Helena e Mayumi, aprendemos a trabalhar em grupo, a respeitar o próximo e, principalmente, que é muito mais fácil multiplicar quando sabemos dividir.

A toda equipe do Laboratório de Doenças Febris Agudas, é uma honra poder trabalhar com esse grupo maravilhoso. Obrigada por caminhar ao meu lado. Tenho certeza de que sem cada um de vocês não teria acabado a minha tese.

À Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Programa de pós-graduação Stricru Sensu em Medicina Tropical (PGMT) por me fazer realizar os meus sonhos. Aos professores que me transmitiram tantos conhecimentos e que me permitiram apresentar um melhor desempenho no meu processo de formação profissional. Especialmente a Dra. Vanessa pela força e carinho.

Aos meus amigos, irmãos que eu não tive. Mesmo com a distância, sempre se fizeram presentes na minha vida e estarão sempre em meu coração. Obrigada pelo companheirismo, apoio e amizade incondicional.



## EPÍGRAFE

“O que melhora o atendimento é o contato afetivo de uma pessoa com a outra. O que cura é a alegria, o que cura é a falta de preconceito” (Nise da Silveira).

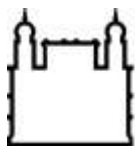
“Aprendi a amar a vida, não desistir de lutar, renascer da derrota, renunciar às palavras e pensamentos negativos.

Acreditar nos valores humanos e a ser otimista.

Aprendi que mais vale tentar do que recuar...

Antes acreditar que duvidar, o que vale na vida não é o ponto de partida e sim a nossa caminhada.”

Cora Coralina



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### LACTENTES EXPOSTOS AO ZIKA VIRUS DURANTE A GESTAÇÃO: ESTUDO LONGITUDINAL NO RIO DE JANEIRO, BRASIL

#### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

**Liege Maria Abreu de Carvalho**

Zika é uma doença viral emergente, recentemente identificada, que tem como agente etiológico o Zika vírus (ZIKV), um arbovírus, da família *Flaviviridae* transmitido principalmente pela picada do mosquito do gênero *Aedes* (*A. aegypti*) hematófago infectado. Chegou às Américas recentemente (2013-2014) e apesar da maioria das pessoas apresentar infecções com sinais e sintomas leves, a partir de 2015 foi observado um aumento importante da incidência de microcefalia, 20 vezes a mais que nos anos anteriores em bebês no Brasil, associada à infecção pelo ZIKV durante a gestação.<sup>1</sup>

Embora a associação entre a infecção pelo ZIKV e a microcefalia já esteja confirmada, pouco ainda se conhece sobre a evolução dos bebês expostos “*in útero*” e seus outros possíveis desfechos e consequências relacionados ao Sistema Nervoso Central (SNC).

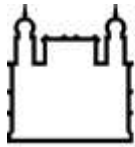
Entre 2015-2016 iniciamos um estudo de coorte prospectivo para o acompanhamento de bebês expostos ao ZIKV durante a gestação, por uma equipe multidisciplinar (pediatras infectologistas, neuropediatras, fisioterapeutas, psicólogos, oftalmologistas e otorrinolaringologistas). Duzentos e dezesseis crianças foram acompanhadas durante os dois primeiros anos de vida em consultas de puericultura e especialidades no Instituto Fernandes Figueira e no Instituto Nacional de Infectologia, pelo Laboratório de Doenças Febris Agudas para avaliação do neurodesenvolvimento, alterações morfológicas e alterações relacionadas ao SNC. Foram realizados exames de neuroimagem como ultrassom transfontanela (USTF), tomografia computadorizada

de crânio (TCC) e Ressonância Magnética Cerebral (RNMC) e avaliações neurosensoriais como fundoscopia, Potencial Evocado Auditivo (BERA: *brain-stem evoked response*), sempre que devidamente autorizado pelos responsáveis.

Este foi o primeiro estudo de coorte com seguimento de 216 bebês com exposição confirmada ao ZIKV (pela reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-qPCR)); do nascimento aos três anos de vida, para avaliação do neurodesenvolvimento e pesquisa de outros sinais e sintomas relacionados à exposição ao ZIKV intra-útero e suas consequências ao longo de setembro de 2015 a junho de 2016.

A microcefalia foi identificada em 3,7%, déficits visuais ocorreram em 7% dos lactentes, déficits auditivos em 12% e retardo no neurodesenvolvimento em 28,7% dos lactentes acompanhados. Na ausência de alterações estruturais do SNC o exame de imagem foi pouco útil como preditor de retardo no neurodesenvolvimento.

Observamos que a microcefalia era o desfecho mais grave e que crianças sem alterações (sem microcefalia por exemplo) ao nascimento, podem apresentar atraso no neurodesenvolvimento e outros espectros de fenotípicos. Concluimos que todas as crianças expostas ao ZIKV no útero devem ser seguidas até idade escolar para detecção de déficits neurocognitivos, independentemente da presença de alterações congênitas. Quanto mais cedo a identificação das alterações no neurodesenvolvimento e em outros sistemas orgânicos destas crianças, mais precocemente poderemos intervir com estímulos precoces com um programa de acompanhamento e intervenção clínico-terapêutica multiprofissional, buscando o melhor desenvolvimento possível, por meio da mitigação de sequelas do desenvolvimento neuropsicomotor, bem como de efeitos na aquisição da linguagem, na socialização e na estruturação subjetiva, podendo contribuir, inclusive, na estruturação do vínculo mãe/bebê e na compreensão e no acolhimento familiar dessas crianças. e assim melhorar suas habilidades cognitivas, sociais, comportamentais e sua qualidade de vida.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **LACTENTES EXPOSTOS AO ZIKA VIRUS DURANTE A GESTAÇÃO: ESTUDO LONGITUDINAL NO RIO DE JANEIRO, BRASIL**

#### **ABSTRACT**

#### **TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL**

**Liége Maria Abreu de Carvalho**

Zika is an emerging viral disease, recently identified, whose etiological agent is the ZIKV. Although the association between ZIKV infection and microcephaly is already confirmed, little is known about the evolution of babies exposed to ZIKV in utero and its other possible outcomes related mainly to the Central Nervous System (CNS).

Between 2015-2016 we have started a prospective cohort study with a multidisciplinary team (pediatricians' infectious diseases, neuropediatricians, physiotherapists, psychologists, ophthalmologists and otolaryngologists) to monitor babies exposed to ZIKV during pregnancy. Two hundred and sixteen children were monitored during the first two years of life in childcare and specialty consultations to assess neurodevelopment, morphological changes, nutritional difficulties and changes related to the CNS, at the Fernandes Figueira Institute and at the National Institute of Infectology, by the Laboratory of Acute Febrile Diseases. In addition to this follow-up, neuroimaging exams were performed, such as transfontanellar ultrasound (USTF), cranial computed tomography (CCT) and Cerebral Magnetic Resonance (CMR) and neurosensory evaluations such as funduscopy, Auditory Evoked Potential (BERA: brain-stem evoked response), always duly authorized by those responsible.

This was the first follow-up cohort study of 216 infants with confirmed exposure to ZIKV (by real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) during pregnancy, from birth to two years of age, for neurodevelopmental assessment and research of other signs and symptoms related to intrauterine exposure to ZIKV and its consequences over the study period.

Visual deficits occurred in 7% of infants, hearing deficits in 12% and neurodevelopmental delay in 31% of infants followed. In the absence of structural changes in the CNS, the imaging exam was of little use as a predictor of neurodevelopmental delay.

We observed that microcephaly was more serious outcome and children without changes (without microcephaly, for example) at birth may present neurodevelopmental delay and varied spectrum of phenotypes, and so we concluded that all children exposed to ZIKV in utero should be followed for a long-time term for neurocognitive deficits, regardless of congenital changes. All children exposed to ZIKV in utero should be followed long-term for neurocognitive deficits, regardless of phenotypic changes.

The earlier the identification of changes in neurodevelopment and other organic systems of these children, the earlier we can intervene and thus improve their cognitive, social, behavioral skills and their quality of life.

# ÍNDICE

<b>RESUMO.....</b>	<b>x</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Referencial Teórico.....	3
1.1.1 História.....	3
1.2 Epidemiologia.....	6
1.2.1 Epidemia Brasileira x Microcefalia.....	6
1.3 Vírus ZIKA (ZIKV).....	10
1.4 Análise Filogenética.....	13
1.5 Ciclo de replicação viral.....	15
1.6 Transmissão vetorial.....	16
1.7 Transmissão não vetorial.....	18
1.8 Transmissão vertical.....	19
1.9 Patogênese do ZIKV no SNC .....	25
1.10 Característica da Infecção Congênita pelo ZIKV .....	28
1.11 Diagnóstico da Infecção pelo ZIKV .....	31
1.11.1 Diagnóstico Clínico da Infecção pelo ZIKV.....	31
1.11.2 Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo ZIKV.....	32
1.11.3 Diagnóstico da Infecção Congênita pelo ZIKV. ....	34
1.12 Neurodesenvolvimento.....	35
1.13 Bayley III e HINE.....	37
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>40</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>44</b>
3.1 Objetivo Geral.....	44
3.2 Objetivos Específicos.....	44
<b>4 MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
4.1 Delineamento do projeto.....	45
4.2 Casuística.....	45
4.2.1 Plano de Recrutamento .....	45
4.2.1 Critérios de Inclusão.....	45
4.2.2 Critérios de Exclusão.....	45

4.4 Seguimento.....	46
4.5 Variáveis de Interesse.....	46
4.6 Definição das Variáveis.....	47
4.7 Avaliação do Neurodesenvolvimento.....	48
4.7.1 BAYLEY III (BSID III) e HINE .....	48
4.8 Avaliação de neuroimagem.....	48
4.9 Gerenciamento dos dados.....	49
4.10 Métodos Estatísticos e Análise dos Resultados.....	49
4.11 Considerações Éticas.....	50
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>7. CONCLUSÃO/PERSPECTIVAS.....</b>	<b>71</b>
<b>8. Termo de Consentimento Livre e esclarecido.....</b>	<b>73</b>
<b>9. Bibliografia.....</b>	<b>75</b>
<b>10. Anexos .....</b>	<b>91</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Surtos de ZIKV entre 2007 e 2016.....	4
<b>Figura 2.</b> Dispersão do ZIKV no Brasil de 2014 a 2016 de acordo com os casos reportados produzidos pelo MS e secretarias estaduais de saúde.....	8
<b>Figura 3.</b> Distribuição dos casos cumulativos de microcefalia confirmados no Brasil (641 casos até 27 de fevereiro de 2016) .....	9
<b>Figura 4.</b> Casos Prováveis de Zika vírus em gestantes e proporção de casos prováveis de Zika em gestantes, Brasil, 2016 a 2019.....	10
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática do genoma do ZIKV e suas proteínas codificadas.....	11
<b>Figura 6.</b> Árvore filogenética com representação das duas linhagens de ZIKV identificadas que estão em destaque: a vermelho (asiático) e verde (africano).....	14
<b>Figura 7.</b> Ciclo replicativo do ZIKV.....	16
<b>Figura 8.</b> Ciclo de transmissão silvático e urbano do ZIKV.....	18

<b>Figura 9.</b> Cinética semiquantitativa das cargas de RNA do zika vírus em vários tipos de amostras clínicas de acordo com o tempo após o início da doença.....	20
<b>Figura 10.</b> Alterações hormonais e imunológicas durante a gestação.....	21
<b>Figura 11.</b> Casos de síndrome congênita do ZIKV: confirmados, em investigação e descartados.....	23
<b>Figura 12.</b> Casos de síndrome congênita do ZIKV, confirmados, em investigação e descartados, Brasil, semanas epidemiológicas 2015 – 2016.....	25
<b>Figura 13.</b> Tropismo celular e tecidual do ZIKV.....	27
<b>Figura 14.</b> Tropismo celular e tecidual de ZIKV.....	32
<b>Figura 15.</b> Defeitos de Migração Neuronal.....	33
<b>Figura 16.</b> Bêbe com SCZ.....	34
<b>Figura 17.</b> Brain calcifications in a 37-week fetus with congenital Zika virus infection acquired during the 12th week of gestation.....	35
<b>Figura 18.</b> Fluxograma da captura e acompanhamento dos bebês expostos ao ZIKV durante a gestação.....	52
<b>Figura 19.</b> Avaliações pelo Bayley-III em 146 crianças entre 7 a 32 meses.....	54
<b>Figura 20.</b> Idade Gestacional da infecção materna pelo vírus Zika em 244 gestantes.....	57
<b>Figura 21.</b> Pontuações individuais do Bayley III em 12 a 18 meses de idade, relacionado com resultados dos exames de imagens.....	58

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Risco absoluto de desfechos adversos em lactentes expostos ao ZIKV.....	53
--	----



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- BERA:** Audiometria do tronco cerebral do inglês **Brain-stem Evoked Response**
- C** - Capsídeo
- CDC** - Centro para Controle de Doenças e Prevenção dos Estados Unidos da América
- CHIKV**- vírus da Chikungunya
- CTLs** - Células T citotóxicas
- DENV** – vírus da Dengue
- DFA** – Doenças febris agudas
- DP** – Desvio padrão
- E** - Envelope
- ECDC** - Centro Europeu para Controle de Doenças
- EDTA** - Ácido Etilenodiamino Tetra-cético
- ER** - Retículo Endoplasmático
- FIOCRUZ** - Fundação Oswaldo Cruz
- HINE**- Hammersmith Infant Neurological Examination
- IgG** - Imunoglobulina G
- IgM** - Imunoglobulina M
- ILMD** - Instituto Leônidas e Maria Deane
- INF** - Interferon
- ISGs** - Genes estimuladores de Interferon (Interferon-stimulated genes)
- MC**- Microcefalia
- MS**- Ministério da Saúde
- NK** - Células natural killer
- NPC**- Células progenitoras neurais
- NS** - Proteína Não-Estrutural
- NAbs** - Anticorpos Neutralizantes
- OMS** - Organização Mundial de Saúde
- OPAS** – Organização Pan Americana de Saúde
- prM** - Proteína pré-membrana
- RNA** - Ácido ribonucleico
- RN**- Recém- nascido
- RNMC**- Ressonância Magnética de Crânio
- RT- qPCR** - Reação em Cadeia da Polimerase

**SE** - Semana Epidemiológica  
**SGB**- Síndrome de Guillain Barré  
**SCZ**- Síndrome Congênita do Zika Virus  
**SNC**- Sistema Nervoso Central  
**SVS**- Secretaria de Vigilância em Saúde  
**PIG**- Pequeno para idade gestacional  
**PN**- Peso de nascimento  
**TCLE** - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
**TCC**- Tomografia Computadorizada de Crânio  
**USTNF**- Ultrassonografia Transfontanela  
**ZIKV** - Zika vírus

# 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas tem-se observado o aumento de doenças transmitidas pelo vetor *Aedes aegypti*, especialmente dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV) e Zika vírus (ZIKV).

No primeiro semestre de 2015 o Brasil enfrentou uma epidemia pelo Zika Virus com magnitude até então nunca observada no Brasil e no mundo.<sup>1</sup> Alterações climáticas, urbanização extensa, uso não controlado de inseticidas, falta de controle efetivo dos vetores, expansão da distribuição geográfica dos vetores, adaptação a novos hospedeiros de reservatório, sem imunidade para tal e a globalização, são fatores importantes na implicação da emergência desse vírus.<sup>2,3</sup> No segundo semestre de 2015, no Nordeste do país (Bahia, Pernambuco, Paraíba) médicos evidenciaram um aumento de 20 vezes do nascimento de bebês com microcefalias (MC)<sup>3,4,5</sup> se comparado aos anos anteriores, em mães que tiveram infecção com exantema, *Dengue like*, durante a gestação<sup>6</sup>.

Frente às crescentes evidências apontando a associação da infecção pelo ZIKV com a ocorrência de microcefalia<sup>1-5</sup> e a elevada probabilidade de um surto epidêmico desta infecção, houve uma importante união de forças de profissionais em todas as áreas da saúde para cuidar das pessoas atingidas, sejam as mães, seus filhos ou suas famílias.<sup>7,8,9,10</sup>

Em setembro de 2015 o Ministério da Saúde (MS), reconheceu a possível associação entre microcefalia e infecção pelo ZIKV e o que parecia uma doença branda, onde a maioria dos pacientes apresentava-se oligossintomático ou mesmo assintomático, mostrou-se devastadora em bebês com infecção vertical.<sup>10</sup>

Em 01 de fevereiro de 2016, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou esse evento como uma emergência de saúde pública de importância internacional que foi mantido por um período de 9 meses.<sup>11,12</sup> Uma nova infecção congênita cujo agente etiológico demonstrava um forte tropismo pelo SNC, especialmente às células progenitoras neuronais (NPC), foi descrita.<sup>13,14,15,16,17</sup>

Estudos mostraram que a infecção congênita pelo ZIKV está associada a importantes malformações do SNC, além da microcefalia, levando a consequências graves, muitas vezes incapacitantes, ao longo da vida dos bebês expostos.<sup>16,17</sup>

A Síndrome Congênita do ZIKV (SCZ) foi descrita com microcefalia associada ao colapso de calota craniana, malformações do desenvolvimento do córtex cerebral,

afilamento cortical e calcificações cortico-subcorticais, alterações musculares, comprometimento na visão e audição, contraturas congênicas (artrogripose).<sup>18-21</sup> Os sinais clínicos consequentes às alterações do SNC, incluem irritabilidade, hipertonia, hemiparesia, movimentos extrapiramidais (como distonia e discinesia), crises epiléticas, disfagia, entre outros.<sup>5</sup> De acordo com achados de neuroimagem relatados, uma série de anormalidades neurológicas podem ser esperadas dependendo da extensão e localização do dano.<sup>17,21,22,23</sup>

Alguns estudos demonstraram que nem todos os fetos expostos ao ZIKV apresentarão anomalias congênicas evidentes intraúteross ou ao nascer. A microcefalia (MC) pode estar ausente no nascimento e se desenvolver ao longo dos primeiros anos de vida. Na ausência de um fenótipo alterado, a detecção de lesão por ZIKV no cérebro fetal nos primeiros meses de vida é clinicamente difícil.<sup>21</sup> Semelhante a outros vírus neuro trópicos, o ZIKV pode acarretar lesões sutis que apenas serão detectadas mais tarde durante vida, com atraso do neurodesenvolvimento leve ou até mesmo grave. Essas crianças podem apresentar deficiências cognitivas ao longo de sua vida, além de déficits sensoriais.<sup>23</sup> A SCZ atinge consideravelmente a qualidade de vida das crianças, aumenta a morbidade infantil, pelos seus impactos no desenvolvimento físico, sensório-motor e neurológico como um todo da criança no decorrer do seu desenvolvimento.

O surto de ZIKV no Brasil recuou, no entanto, os impactos sociais e econômicos de natureza tardia e duradoura tornaram-se um grande problema de saúde pública.<sup>11</sup>

Até o momento, não existe uma vacina aprovada ou terapia específica para prevenir ou tratar a infecção por ZIKV. Tampouco há terapias para evitar danos no feto após a infecção por ZIKV durante a gravidez ou para evitar resultados graves causados pelo vírus.<sup>23,24</sup>

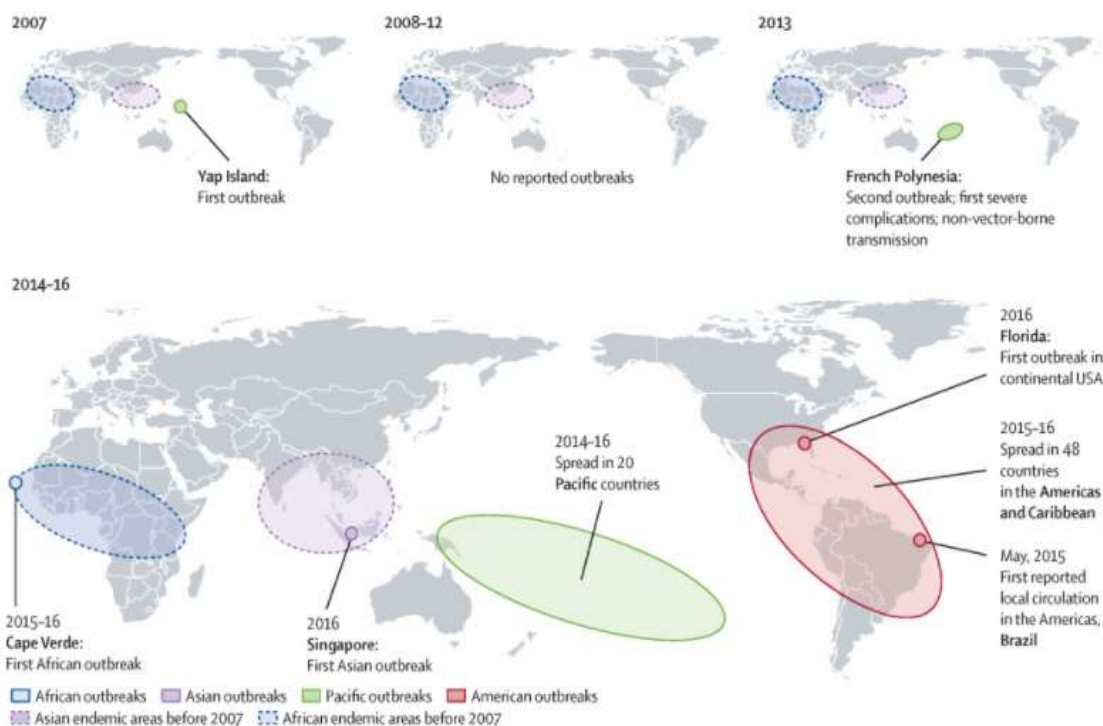
O objetivo do nosso estudo foi investigar os desfechos da infecção confirmada (RT-qPCR) pelo ZIKV na gestação ao longo dos 3 primeiros anos de vida da criança; e identificar marcadores de gravidade do neurodesenvolvimento que permitissem intervenções oportunas ao melhor desenvolvimento dos lactentes expostos.

## 1.1 Referencial Teórico

### 1.1.1 História

O ZIKV foi descoberto em 1947 na floresta de Zika, em Uganda, na África, onde o vírus circulava entre os macacos e em mosquitos do gênero *Aedes*. O primeiro caso em humanos só foi documentado em 1954 em uma menina de 10 anos que morava na Nigéria. Até então o vírus se restringia à África e à Ásia com poucos casos relatados. Lentamente foi se espalhando para o restante da Ásia e Oceania, causando pequenos surtos da doença, até que em 2007 um surto maior foi detectado em Yap, uma ilha na Micronésia, onde 70% da população foi infectada.<sup>24,25</sup> Inicialmente a doença foi confundida com dengue, apesar de alguns pacientes apresentarem apenas febre e conjuntivite não purulenta. Esse surto durou aproximadamente 3 meses.

Em 2013 e 2014 foram relatados surtos desta infecção nas Ilhas do Pacífico, incluindo Ilha Cook, Polinésia Francesa, Ilha de Páscoa e Nova Caledônia com aproximadamente 30.000 infectados.<sup>25,26</sup> A magnitude do surto aconteceu provavelmente pelo baixo nível de imunidade preexistente ao ZIKV e altas densidades dos vetores competentes. Na Polinésia Francesa, diferentemente dos surtos anteriores, foram relatados casos de complicações neurológicas graves como a Síndrome de Guillain Barré (SGB). Após o surto na Polinésia o ZIKV se espalhou rapidamente pelas ilhas do Pacífico<sup>2</sup> e então chegou as Américas e Caribe em 2015 e 2016.<sup>26</sup> Cerca de 153.322 infecções confirmadas, 507.851 suspeitas e 14 casos de morte por infecção viral por zika foram relatados pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) até 13 de outubro de 2016.<sup>27</sup>



**An update on Zika virus infection. Published Online June 21, 2017.**

**Figura 1.** Surtos de ZIKV entre 2007 e 2016. The Lancet, 2017.

Em 01 de fevereiro de 2016, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou esse evento como uma emergência de saúde pública de importância internacional mantida por um período de nove meses [1,5-8,11].

Tal declaração desencadeou uma mobilização internacional de pesquisa para tentar responder inúmeros questionamentos sobre as propriedades do vírus Zika, até aquele momento considerado um agente de baixa patogenicidade.

De acordo com previsão da OMS, eram esperados entre 3 e 4 milhões de infecções pelo vírus Zika em 2016 apenas nas Américas.<sup>26</sup> Até outubro de 2016, pessoas de 73 países diferentes foram afetadas por esse vírus desde 2007.<sup>27</sup>

Há evidências de que o ZIKV provavelmente foi introduzido entre 2013 e o início de 2014 no Brasil, favorecido pelos eventos esportivos como a Copa das Confederações de Futebol (entre 15 e 30 de junho) e a Copa do Mundo (junho 2014), que atraiu turistas do mundo inteiro.<sup>21</sup>

As estimativas sugerem que, entre 500.000 e 1,5 milhões de pessoas foram infectadas até 2016, e a infecção pelo ZIKV logo se tornou uma epidemia nacional

preocupante, com suspeita de que poderia causar importantes danos cerebrais e microcefalia em fetos. <sup>1,21,22, 23</sup>

No Brasil, em 28 de novembro de 2015 o Ministério da Saúde reconheceu a relação entre o aumento na prevalência de microcefalias com a infecção pela ZIKV durante a gestação <sup>24,25</sup>, com base nas investigações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais.<sup>26</sup>

O potencial do surgimento e da magnitude da epidemia no país está fortemente associado com a ampla distribuição dos principais vetores além da suscetibilidade da população à essa infecção.<sup>28</sup>

O Brasil foi o país mais afetado pela epidemia de ZIKV no mundo. Até junho de 2016, 8.165 casos suspeitos de microcefalia foram registrados. Entre eles, 3466 casos foram descartados, 1638 confirmados e 3061 ainda estavam em investigação, sendo a maioria dos casos confirmados, da região nordeste do Brasil<sup>28,29,30</sup>.

Em 2021 foram registrados 5.710 casos prováveis em todo o Brasil, uma queda de 17,6% em comparação com o mesmo período de 2020 no país. Porém, as únicas regiões que registraram aumento no número de casos de zika, em relação ao ano anterior, foram as regiões Norte (28,3%) e Sul (36,6%).

## 1.2 Epidemiologia

### 1.2.1 *Epidemia Brasileira X Microcefalia*

O Ministério da Saúde do Brasil começou a receber notificações e monitorar casos de doença exantemática sem causa definida na Região Nordeste a partir do final do mês de fevereiro de 2015, com relato de casos nos estados da Bahia, Maranhão, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Sergipe e Paraíba. A maioria dos casos apresentou evolução benigna com regressão espontânea, mesmo sem intervenção clínica, com mais de 6.800 casos identificados até aquele momento. Em 29 de abril, pesquisadores do Nordeste (Bahia e Rio Grande do Norte) anunciaram a identificação do vírus Zika.<sup>11</sup>

As autoridades sanitárias brasileiras notificaram em maio de 2015 à Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e assim foi divulgado um alerta epidemiológico sobre a doença. O documento descrevia a infecção pelo vírus Zika e fornecia recomendações aos Estados-membros para fortalecerem seus sistemas de vigilância epidemiológica para dengue e Chikungunya e para aumentar sua sensibilidade para detectar possíveis casos de infecção pelo ZIKV. O alerta também incluía detalhes sobre testes laboratoriais, tratamento dos casos e medidas de prevenção e controle, incluindo recomendações para viajantes.<sup>1</sup>

No início de dezembro de 2015, 18 estados no Brasil confirmaram a transmissão autóctone do vírus nas regiões norte, nordeste, sudeste, centro-oeste e sul: Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Rio de Janeiro, Roraima, São Paulo, Espírito Santo, Amazonas, Rondônia e Tocantins.<sup>1</sup>

A circulação de ZIKV foi confirmada em nosso país, no entanto é impossível conhecer o número real de infecções pelo ZIKV, pois é uma doença em que cerca de 80% dos casos infectados não irão manifestar sinais ou sintomas da doença e grande parte dos doentes não irá procurar serviços de saúde, dificultando ainda mais o conhecimento da magnitude dessa doença.<sup>2</sup>

Durante o início da epidemia no Brasil, as autoridades reconheceram a relação entre o vírus Zika e ocorrência de surtos de mortes por microcefalia em crianças possivelmente expostas ao vírus durante a gestação, levando a alta suspeição pela forte relação espaço-temporal da doença e a presença de microcefalia nesses bebês.



Em novembro de 2015, pesquisadores do Instituto Evandro Chagas, da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), isolaram o vírus Zika no cérebro de um recém-nascido com microcefalia que faleceu.<sup>28</sup> O ácido ribonucleico (RNA) do vírus Zika também foi identificado no líquido amniótico de duas gestantes cujos fetos tinham microcefalia.<sup>12</sup> Recém-nascidos (RN) que tiveram o diagnóstico de microcefalia ou que morreram cinco minutos após o nascimento e cujas mães foram infectadas na gestação também foram identificados.<sup>28</sup>

Com a estimativa pelo Ministério da Saúde de que 0,5 a 1,5 milhões de pessoas poderiam ser infectadas no ano de 2015, a infecção pelo ZIKV tornou-se uma grande preocupação e problema de Saúde Pública no Brasil.<sup>28-29-30</sup>

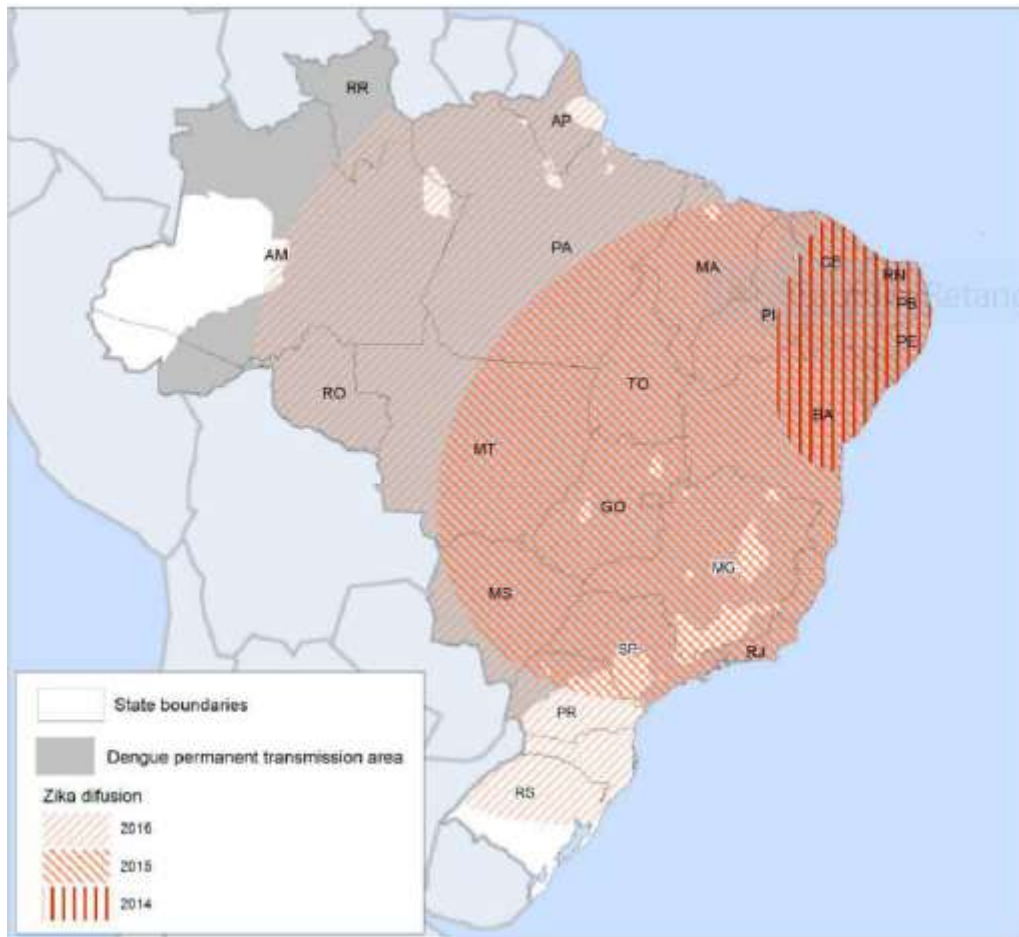
Esse fato foi inédito na literatura médica mundial e a partir daí foram iniciadas uma série de discussões entre especialistas para identificar causas e definir critério diagnóstico. Foi registrada alteração no padrão de ocorrência de microcefalia com um aumento claro no número de casos em várias partes do Nordeste. Os padrões da distribuição de casos suspeitos de microcefalia pós-infecciosa apresentaram características de dispersão. Os primeiros três meses de gravidez de mulheres com crianças com microcefalia corresponderam a um maior período de circulação do vírus na região Nordeste do Brasil.

Segundo o Ministério da Saúde, uma média anual de 200 casos de microcefalia ocorreram antes do primeiro caso relatado em maio de 2015, até setembro de 2016, foram confirmados 1.949 casos no país, a maioria com fortes evidências de associação com o ZIKV.

O coeficiente de prevalência de microcefalia ao nascer no Brasil alcançou 54,6 casos por 100 mil nascidos vivos (NV) em 2015. A região com o maior coeficiente foi o Nordeste: (139 casos por 100 mil NV), o que corresponde a 28 vezes a média anual dos coeficientes para essa região no período, 42 de 2000 a 2014 (5,0 casos por 100 mil NV)<sup>30,31</sup>. No Brasil até janeiro de 2016, 3.530 casos suspeitos de microcefalia foram identificados em 724 municípios de vinte e um estados.<sup>31,32</sup>

O número de notificações de crianças recém-nascidas com alterações no crescimento e desenvolvimento possivelmente relacionados à infecção pelo ZIKV no Brasil, em 2017, foi de 2.160 casos prováveis, e 949 casos confirmados<sup>32</sup>. A maioria dos casos foi registrada na região Nordeste do país (65,7%), sendo que os cinco estados com maior número de casos foram Pernambuco (21,3%), Bahia (14,3%), Paraíba (9,0%), São Paulo (8,1%) e Rio de Janeiro (7,8%)<sup>29</sup>. A Figura 2 mostra a Dispersão do ZIKV

no Brasil de 2014 a 2016 de acordo com os casos reportados produzidos pelo MS e secretarias estaduais de saúde até a semana 32 de 2018. Foram registrados 973 casos prováveis, sendo 355 confirmados por critério clínico epidemiológico ou laboratorial<sup>32</sup>.



**Figura-2-** Dispersão do ZIKV no Brasil de 2014 a 2016 de acordo com os casos reportados produzidos pelo MS e secretarias estaduais de saúde<sup>1</sup>. SVS/MS, 2015.



população geral. Até a semana epidemiológica 18 de 2019, essa proporção atingiu 24,8%. (Figura- 4)



**Figura 4.** Casos prováveis de Zika em gestantes e proporção de casos prováveis de Zika em gestantes, Brasil, 2016 a 2019

### 1.3 Vírus ZIKA (ZIKV)

O vírus Zika é um arbovírus membro da família *Flaviridae*, do gênero *flavivirus*. A maioria dos vírus desta família é transmitida por picadas de mosquitos.

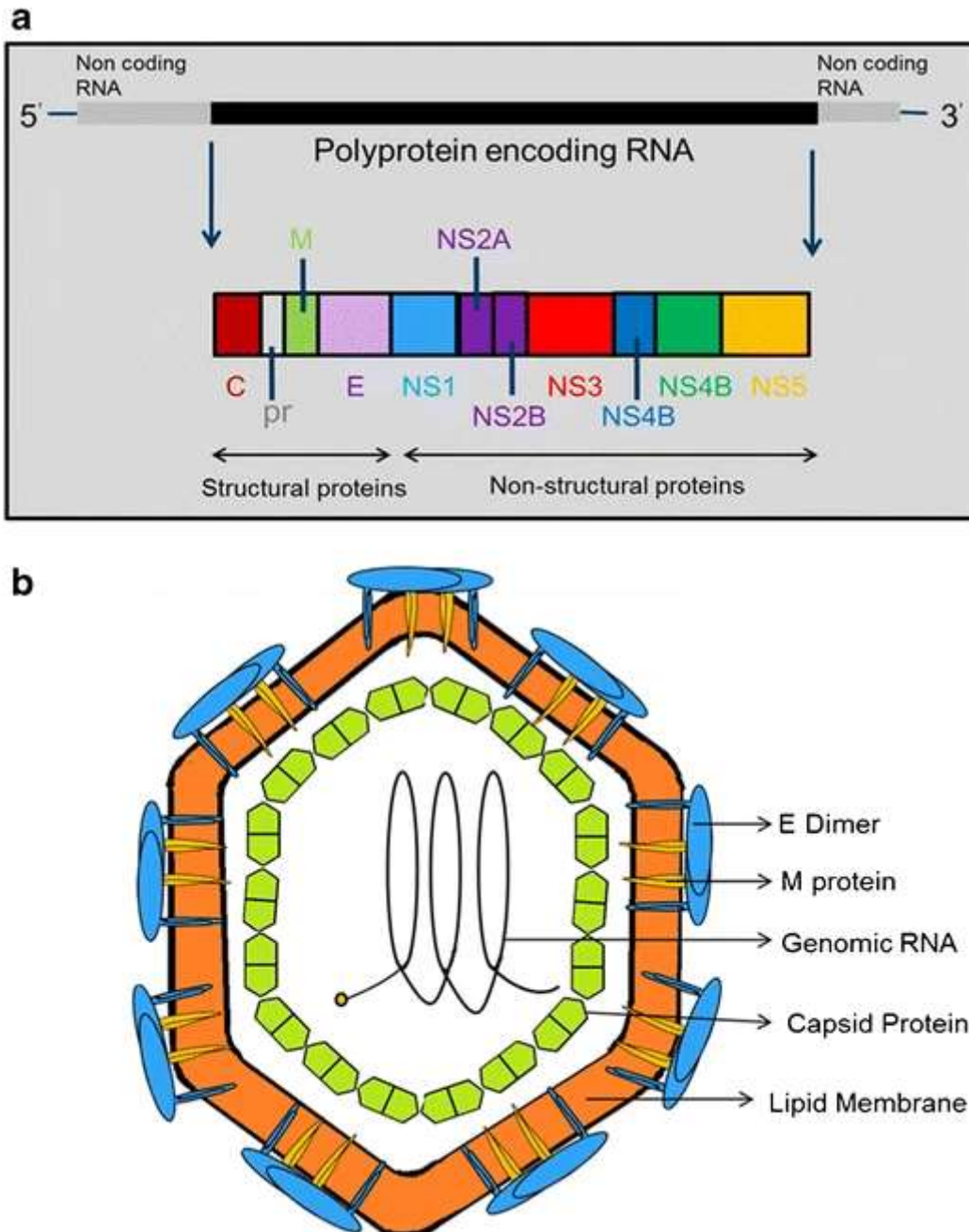
A família *Flaviviridae* corresponde a uma família de vírus que é composta pelos seguintes gêneros:

- 1)-Gênero *Flavivirus* com 67 espécies de vírus humanos e animais identificadas. Apresenta como principais representantes os vírus da febre amarela, do Nilo Ocidental, Dengue, da encefalite japonesa e o ZIKV;
- 2)- Gênero *Hepacivirus* com um representante, o vírus da hepatite C;
- 3)- Gênero *Pestivirus* com vírus que infectam animais mamíferos como o da diarreia viral bovina e o da peste suína. (ICTV <https://ictv.global/taxonomy/> acessado em 12/2021).

A família *Flaviviridae* conserva características de morfologia da partícula viral, organização do genoma e estratégias de multiplicação similares, são assim nomeados

a partir do vírus da febre amarela, “flavivírus” que significa amarelo em latim. (Figura-5b).

Tal como outros membros do gênero *flavivírus*, os Zika vírus são envelopados e contêm um genoma de RNA de cadeia simples de polaridade positiva (ssRNA) com cerca de 11 kilobases que é traduzido como uma única poli proteína, posteriormente, clivada por proteases virais ou do hospedeiro em três proteínas estruturais e sete proteínas não estruturais (NS).



**Figura 5.** Representação esquemática do genoma do ZIKV e suas proteínas codificadas. a) O RNA de ZIKV de 10.617 nucleotídeos codifica uma poli proteína que fornece três proteínas estruturais do envelope, pré-membrana / membrana, proteína da cápside e sete proteínas não estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. b) Proteínas

estruturais, como proteínas de membrana e de envelope, são exibidas na superfície externa da membrana viral e permitem que a membrana lipídica se enrole em torno do nucleocapsídeo.<sup>33</sup>

O principal papel da proteína E é a participação na replicação viral e no processo de ligação e fusão às células do hospedeiro, sendo por isso a proteína de superfície mais abundante do vírus Zika. É formada por três domínios (DI, DII, DIII). Possui apenas um local de glicosilação (Asn154) que aparece como uma pequena projeção na superfície do vírus.<sup>36,37</sup> A presença de locais de glicosilação tem sido associada a danos neurológicos em cepas asiáticas causadoras de SGB e MC.<sup>35</sup> O primeiro domínio está envolvido na organização da estrutura do invólucro, enquanto os outros dois domínios participam, por esta ordem, no contato entre monómeros e na ligação ao receptor, com papel importante para a entrada do vírus na célula hospedeira.<sup>35,36</sup>

A proteína M surge por clivagem do domínio pr da proteína M. Este processo é mediado pela intervenção de proteases e da proteína prM, que irão por sua vez dar origem à proteína M na superfície dos *virions*, que estão num estágio de maturação mais avançado. É importante lembrar que a prM tem como função evitar agregação prematura da proteína E. As duas proteínas supramencionadas desempenham funções imunogênicas.<sup>35-37</sup>

A proteína NS1, é crucial ao processo de replicação viral e controla ainda as respostas imunes inatas. Esta promove a interação das proteínas prM e E durante o processo de maturação do vírus.<sup>34-37</sup>

Em seguida surge a proteína NS2B que funciona como cofator da NS3, formando uma protease NS2B-NS3, que é fundamental no processo de replicação viral. Em relação às proteínas não estruturais NS2A, NS4A e NS4B ainda não se conhece plenamente todas as suas funções, à exceção daquelas que fazem parte do complexo de replicação viral na membrana do retículo endoplasmático.<sup>33-37</sup>

A proteína NS3 é um elemento necessário à replicação viral, que apresenta domínios de helicase e de protease. Consequentemente, estes domínios são responsáveis pelas clivagens da poli proteína viral, que requer a ligação do co-factor NS2B.<sup>36</sup>

Das proteínas não estruturais destaca-se a NS5, que é uma proteína essencial à replicação viral e é composta por uma extremidade metil transferase (MTase) N-

terminal, responsável pelo capping na extremidade 5' do genoma e a metilação. Tem ainda outra extremidade, uma RNA polimerase dependente RNA C-terminal (RdRp), que desempenha a função de síntese do RNA viral.<sup>37,38,39</sup>

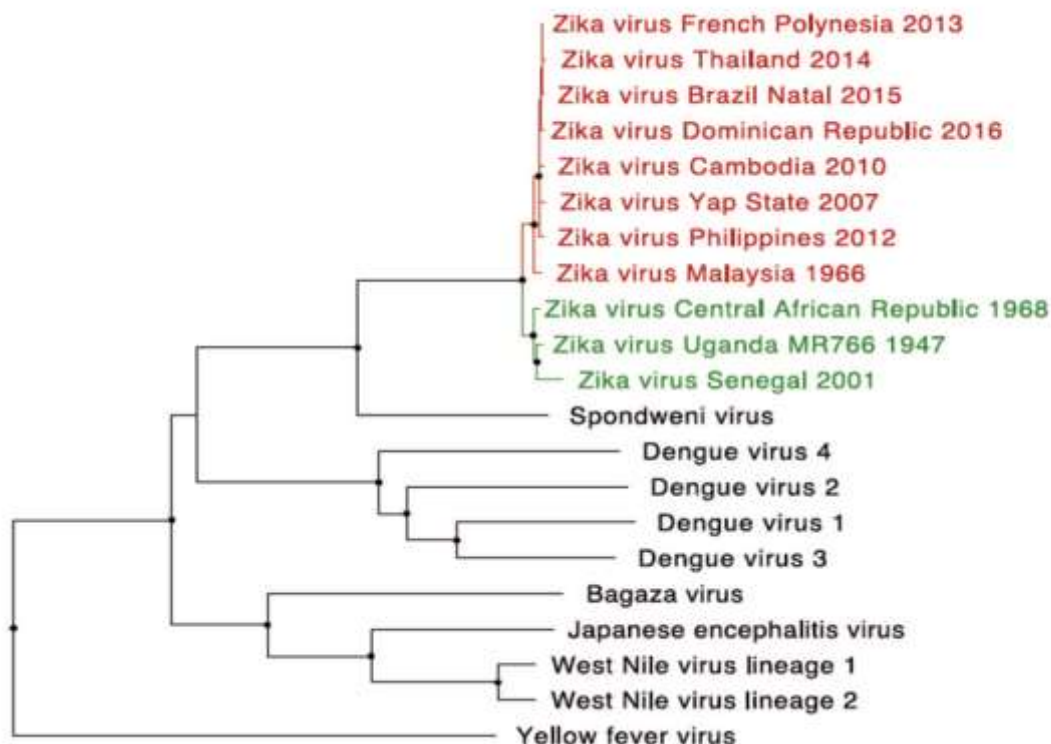
#### 1.4 Análise Filogenética

O ZIKV se correlaciona filogeneticamente com outros que também são transmitidos pelos mosquitos, tais como o DENV, o vírus do West Nile (WNV), a encefalite japonesa (JEV) e a febre amarela (YF)<sup>36</sup>. Figura-6

Os vírus da família *Flaviviridae* conservam características de morfologia da partícula viral, organização do genoma e estratégias de multiplicação similares.<sup>39</sup>

O ZIKV tem duas linhagens principais: a Africana e a Asiática, que são geograficamente e temporariamente distintas. A primeira inclui estirpes isoladas na África Central e Ocidental, enquanto a segunda inclui estirpes isoladas no Sudeste Asiático, mais concretamente na região do Pacífico e em todo o continente americano.<sup>34</sup>

As duas linhagens diferem em cerca de 90% de sua sequência de nucleotídeos e 59 aminoácidos na poliproteína.



**Figura 6.** Árvore filogenética com representação das duas linhagens de ZIKV identificadas que estão em destaque: a vermelho (asiático) e verde (africano).<sup>34</sup>

Estudos filogenéticos apontam que a estirpe brasileira tem uma estreita ligação com a epidemia verificada na Polinésia na Ilha Yap, compartilhando a mesma linhagem asiática.<sup>34,40</sup> Provavelmente, dois desses eventos ocorreram, um na de YAP e outro na Polinésia Francesa. O vírus em sua trajetória sofreu recombinações genéticas que podem ser responsáveis por sua maior patogenicidade se associando, direta ou indiretamente, a ocorrência de danos ao SNC de fetos humanos (S139N sofrida no gene que codifica uma proteína estrutural do vírus PrM, ocorrida em 2013).<sup>40</sup>

Esta hipótese foi levantada após a comparação de isolados do ZIKV de epidemias da América do Sul entre 2015 e 2016, que causavam microcefalia, com um vírus que circulou no Camboja, na Ásia, em 2010, que não causava microcefalia.<sup>41,42</sup> Já outros estudos sugerem que a resposta imunológica a anticorpos anti-flavivírus heterólogos, principalmente do vírus da Dengue possa estar envolvida nas complicações associadas à infecção por ZIKV.<sup>41</sup>



Além disso, várias outras alterações ocorreram como por exemplo, uma maior adaptação do ZIKV aos mosquitos do gênero *Aedes*, na América do Sul, facilitando sua transmissão.

Uma hipótese alternativa é que o surgimento de doença grave esteja associado ao ZIKV, em função da sua alta incidência. Eventos de baixa frequência como SGB e microcefalia só podem ser reconhecidos durante uma epidemia com grande número de casos que no caso do Brasil atingiu com particular intensidade as pessoas negligenciadas pelas políticas públicas – ou seja, as pessoas que não têm acesso a condições adequadas de habitação e saneamento, de infraestrutura sanitária e a melhor informação sobre prevenção de doenças e redes de apoio (públicas, comunitárias e familiares) de amparar, por meio dos serviços, as crianças e famílias afetadas pela microcefalia.

### **1.5 Ciclo de replicação viral**

O ciclo da replicação do ZIKV inicia-se com a ligação das partículas virais aos receptores da membrana plasmática da célula hospedeira. Os receptores são: moléculas de adesão intercelulares específicas, tais como: as não integrinas (3-grabbing non-integrin), imunoglobulinas transmembranas, a mucina e as famílias Tyro-3, AXL e Mer.<sup>42</sup>

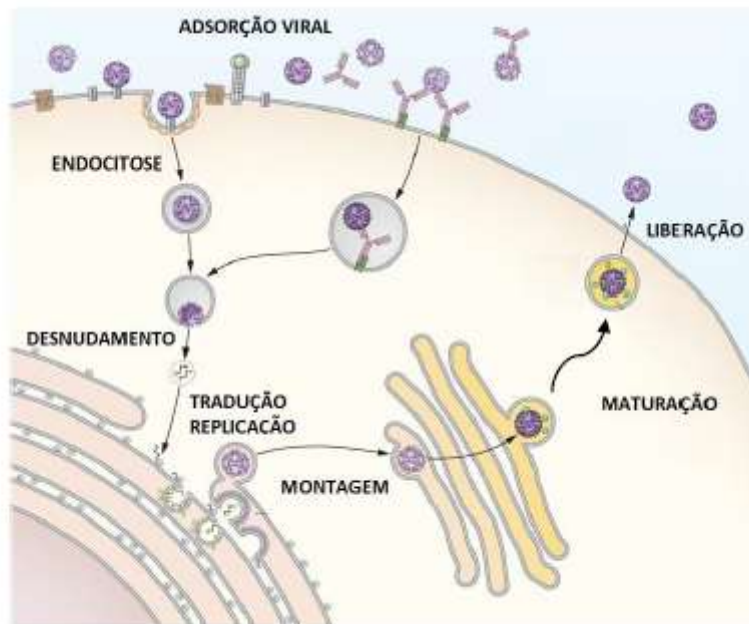
As partículas então são internalizadas em vesículas revestidas por clatrina por endocitose e dão origem ao endossoma. Após a entrada, ocorre a perda da nucleocápsideo que é libertada para o citoplasma, em consequência da fusão do invólucro viral com a membrana do endossoma, mediada por uma diminuição do pH e pela proteína do invólucro viral (E).<sup>35</sup>

O RNA viral é liberado para o citoplasma do hospedeiro, onde acontece a sua tradução numa única poliproteína que mais tarde será clivada, por proteases virais e celulares, em três proteínas estruturais (C, E e M) e em sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5).

O RNA viral é replicado continuamente pelas proteínas não estruturais, em locais que estão intimamente ligados com a membrana celular. Por outro lado, este RNA viral, juntamente com as proteínas do capsídeo são envolvidos pelas proteínas

prM e E.<sup>35,36, 42</sup> A partir daí as partículas virais são transportadas para o complexo de Golgi onde irão sofrer maturação. Nesta fase ocorrem mudanças conformacionais, sendo a primeira a nível das proteínas virais (clivagem), proteína prM em M. Ocorre também a exibição do domínio de fusão de proteína E que irá se ligar aos receptores da célula hospedeira quando for libertado.<sup>42,35</sup>

Através da exocitose as partículas virais são liberadas para o exterior da célula (Figura – 7).<sup>35,43</sup>



**Figura 7.** Ciclo replicativo do ZIKV.

**Fonte:** Adaptado de [https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/yellow\\_fever\\_virus](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/yellow_fever_virus).

## 1.6 Transmissão vetorial

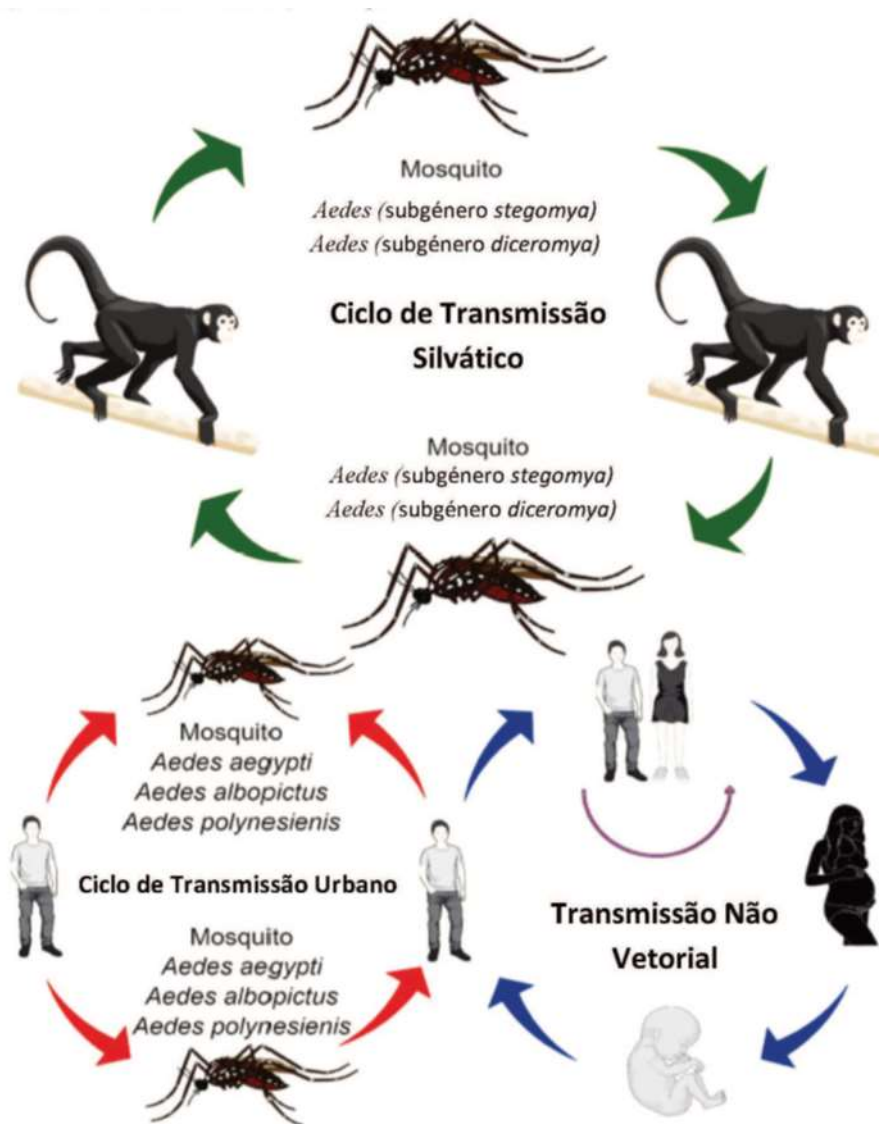
O ZIKV, tal como outros *flavivirus*, é transmitido por duas vias possíveis: a via vetorial e a via não vetorial.<sup>42</sup>

A via mais comum e competente é a vetorial, através da picada do mosquito infectado.

A rápida expansão do ZIKV nas Américas foi causada pelo comportamento do seu vetor. É altamente adaptável a lugares domésticos e vivem em associação com humanos em suas casas urbanas. Seus ovos são resistentes a dissecação e a larva se desenvolve rapidamente em climas tropicais e subtropicais.<sup>43, 44</sup>

A transmissão do ZIKV por picada de mosquitos é complexa, porque envolve várias espécies de mosquitos. Até o momento, o ZIKV foi isolado de 17 espécies de mosquitos *Aedes*, bem como dos mosquitos *Anopheles gambiae*, *Anopheles coustani*, *Culex perfuscus* e *Mansonia uniformis*.<sup>45,46,47</sup> Entre esses vários tipos de mosquitos, a transmissão do ZIKV para humanos foi relatada apenas pelas fêmeas de *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *A. hensilli* (responsável pelo surto na Ilha Yap) e *A. polynesiensis* (responsável pelo surto na Polinésia Francesa).<sup>47</sup> Os mosquitos *A. albopictus* são suspeitos de transmissão mais ampla do vírus devido à sua extensa distribuição geográfica em regiões tropicais, subtropicais e temperadas. Nas Américas, *A. aegypti* e *A. albopictus* são identificados como os principais vetores de transmissão humana.<sup>24,45, 47,48,49,50</sup>

O vírus é mantido em circulação através de dois ciclos: o silvático e o urbano (Figura 8). No ciclo silvático o vírus circula apenas entre os primatas não humanos (principais reservatórios) e os mosquitos. Já no ciclo urbano, o vírus circula entre os mosquitos e os humanos.<sup>43,48</sup>



**Figura 8.** Ciclo de transmissão silvático e urbano do ZIKV.  
**Fonte:** (adaptado Rather, Lone, Bajpai, Paek e Lim, 2017).

Ao longo de milhares de anos o gênero *Aedes* foi se adaptando ao ambiente doméstico para se reproduzir. Nessa medida, começaram por depositar os ovos em reservatórios de água estagnada. Numa segunda fase, para conseguirem sobreviver, começaram a se alimentar do sangue humano através da picada de mais de um indivíduo. Este mecanismo permitiu que não somente este vírus, mas também outros se adaptassem de modo a conseguir infectar o homem.

Normalmente as picadas ocorrem durante o dia, quer dentro, ou fora das habitações.<sup>43,45,47,51</sup>

O ZIKV tem uma alta capacidade de se espalhar mundialmente uma vez que existe uma ampla distribuição de mosquitos do gênero *Aedes* por todo o mundo.<sup>45</sup>

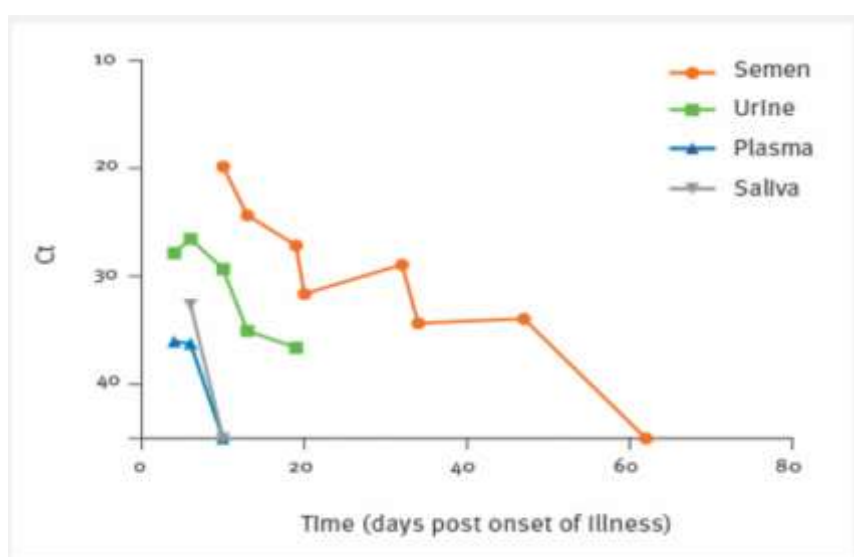
Os mosquitos *Aedes aegypti*, além de serem responsáveis pela transmissão de Zika, também estão envolvidos na transmissão de outros arbovirus como dengue (DENV) e Chikungunya (CHIKV) e foram os responsáveis pela epidemia de Zika ocorrida no Brasil.<sup>45</sup>

### 1.7 Transmissão não vetorial

O ZIKV é também transmitido por via sexual, vertical (mãe-filho)<sup>52</sup>, por transfusões de sangue<sup>53,54,55</sup> e transplante de órgãos. Treze países já relataram transmissão de pessoa a pessoa, provavelmente por via sexual.<sup>52</sup> O vírus pode ser transmitido de homem para mulher, de homem para homem, e ainda de mulher para homem.<sup>54</sup>

O vírus Zika foi isolado em outros fluidos corporais como: saliva, líquido cefalorraquidiano, urina<sup>54</sup> e leite materno<sup>53,62,63,65,66</sup>, onde, apesar de infectivos, não há evidências epidemiológicas da sua transmissão. No entanto, podem ser utilizadas como materiais de detecção do ZIKV, uma vez que a carga viral permanece detectável por períodos mais longos do que no sangue.<sup>55,56,57,58,59,60,61</sup> Figura-9

Como a epidemia foi decorrente da primeira circulação do vírus no país, uma grande parte da nossa população pode ainda ser suscetível ao ZIKV. Conseqüentemente devemos manter alto grau de vigilância/suspeição da doença, principalmente nas gestantes após a epidemia.



**Figura 9.** Cinética semiquantitativa das cargas de RNA do Zika vírus em vários tipos de amostras clínicas de acordo com o tempo após o início da doença, em um viajante holandês retornando de Barbados, março de 2016 \*

## 1.8 Transmissão vertical

O ZIKV pode ser transmitido por via vertical, isto é, gestantes infectadas pelo ZIKV podem transmiti-lo para o feto durante a gestação através da placenta ou no periparto.

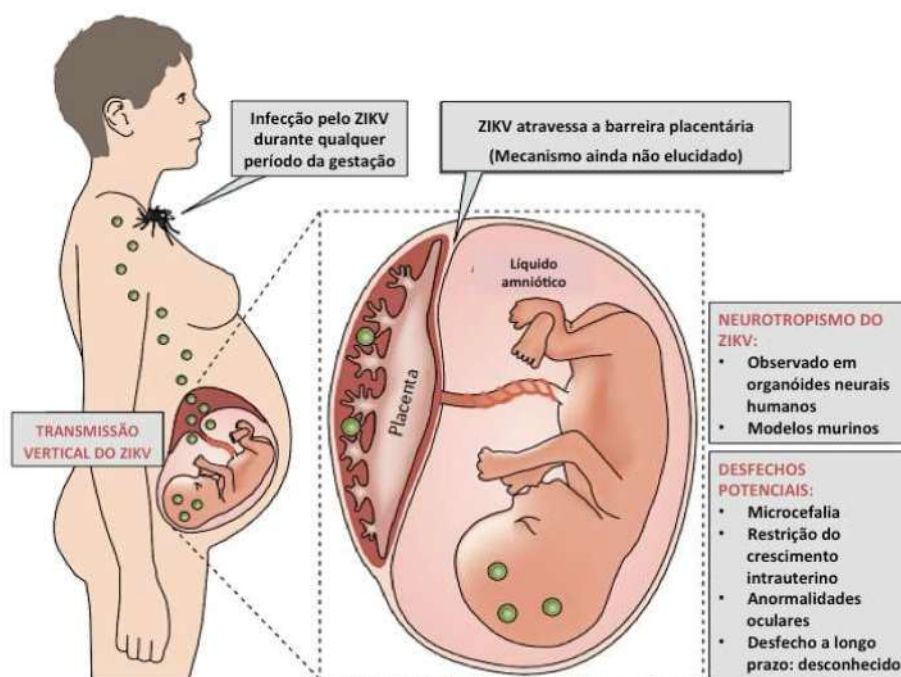
A habilidade do ZIKV infectar e desenvolver alterações fetais se deve a capacidade do vírus atravessar a barreira placentária.<sup>66,67,68,69,70,71,72,79</sup> A placenta faz o contato entre o sangue materno e as vilosidades coriônicas fetais. Cada vilosidade é revestida por trofoblastos que fornecem sangue e macrófagos placentários para o feto. Hoje sabemos que o ZIKV alcança a placenta fetal e o cordão umbilical, citotrofoblastos através de macrófagos placentários (células de Hofbauer). Isso resulta na indução de interferon 1, citocinas pro inflamatórias. No entanto, diferentemente de outras infecções congênicas, o ZIKV não causa reação inflamatória importante na placenta e, portanto, não causa a morte celular deste tecido.

O exato mecanismo de penetração do ZIKV na barreira placentária ainda não está bem estabelecido, no entanto, na transmissão vertical a principal rota da mãe para o feto está descrita na Figura-10.

1. Causam danos as vilosidades e chegam à camada de sinciciotrofoblasto
2. Infectam diretamente a camada de sinciciotrofoblasto
3. Infectam as células endoteliais da micro-vasculatura materna e os trofoblastos extra vilosos.
4. Atravessam a barreira placentária através das células imunes maternas
5. São transportados de forma paracelular e transcelular (ex, através de imunoglobulina) do sangue materno pelas vilosidades para os capilares fetal.
6. Infectam ascendentemente o concepto (menos comum).

Qualquer infecção viral placentária que desencadeie uma resposta inflamatória moderada pode não terminar com a morte fetal e sim ativar o sistema imune

materno e do feto promovendo resposta inflamatória que pode causar sequelas neurológicas e outras, como na infecção pelo ZIKV.<sup>79</sup> Figura-10



**Figura 10.** Transmissão vertical e doença congênita induzida por ZIKV.  
**Fonte:** Adaptado de Coyne & Lazear, 2016).<sup>79</sup>

A Zika congênita ocorre quando uma mulher é infectada pelo ZIKV durante a gestação, antes do parto.

A transmissão vertical do ZIKV não ocorre em todas as gestantes infectadas e a infecção congênita sintomática também não irá ocorrer em todos os fetos expostos ao ZIKV. Na literatura a taxa de transmissão vertical varia entre 26 a 35%.<sup>62, 63, 64,65</sup>

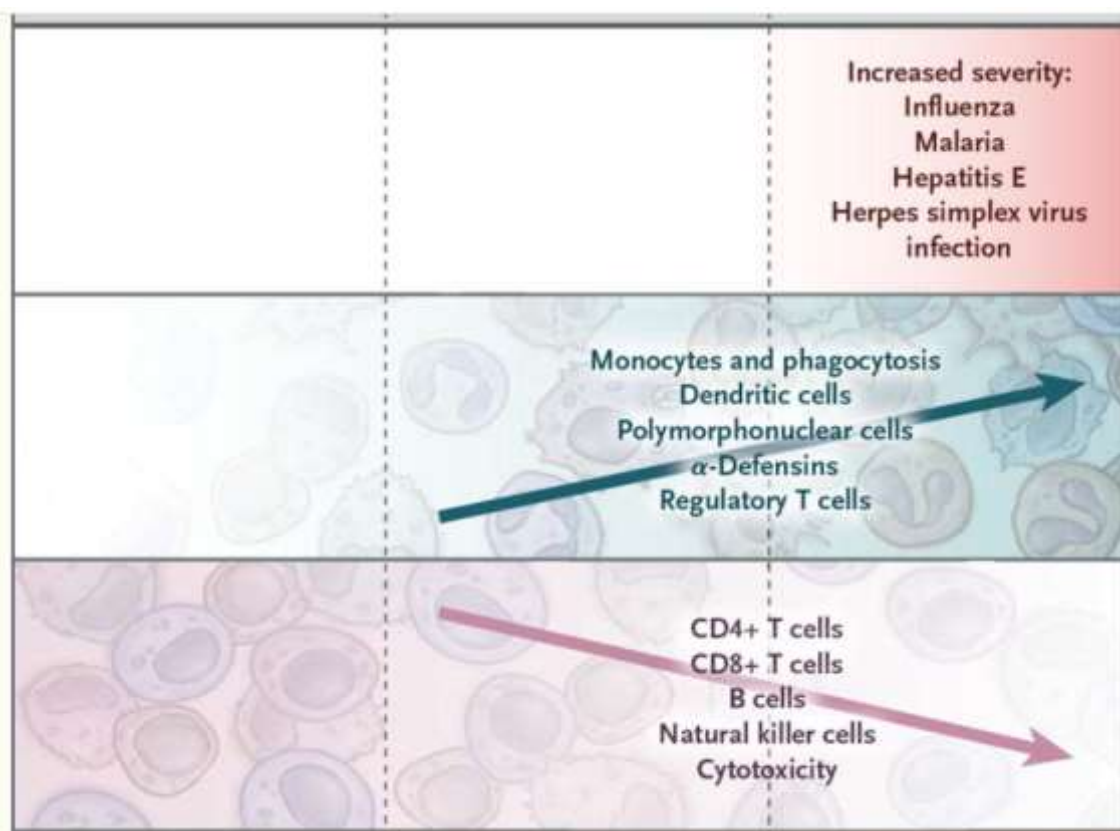
Pouco se sabe até o momento sobre a taxa de infecção entre gestantes assintomáticas ou oligossintomáticas e sua taxa de transmissão vertical; até o momento não foram realizados estudos com essa população.

Normalmente, como visto com outros agentes etiológicos, as gestantes são mais gravemente afetadas do que as mulheres não gestantes.<sup>71,72</sup>

As alterações imunológicas durante a gravidez podem ajudar a explicar a gravidade alterada e a suscetibilidade a doenças infecciosas na gestação. Conforme a gravidez avança, os níveis hormonais mudam e são consideravelmente mais altos

do que em qualquer outro momento. A interação entre os hormônios sexuais e o sistema imunológico é complexa e multifatorial, e afeta muitos sistemas orgânicos.<sup>67</sup>

As diminuições da imunidade adaptativa observadas em estágios mais avançados da gravidez são consistentes com o aumento da transmissão de certas doenças infecciosas durante esse período na gravidez. Diminuições no número e na função das células CD4 +, CD8 + e *natural killer* podem afetar as respostas antivirais, antifúngicas ou antiparasitárias e retardar a eliminação do microrganismo agressor. No entanto, o aumento da imunidade inata observado durante a gravidez pode ajudar a prevenir a gravidade das lesões.<sup>68,69,70,72</sup> Figura-11



**Figura 11.** Alterações hormonais e imunológicas durante a gestação.

**Fonte:** Pregnancy and infection. Review. N Engl J Med 2014 Jun 5;370(23):2211-8. doi: 10.1056/NEJMr1213566<sup>68</sup>

Diversas teorias têm sido propostas para explicar as alterações imunológicas que ocorrem durante a gestação. No entanto, as informações sobre as tendências longitudinais dessas alterações durante a gravidez são limitadas.



A elucidação das alterações e adaptações imunológicas que ocorrem durante a gravidez sugere que os conceitos mais antigos de gravidez como um estado de imunossupressão sistêmica são simplificados demais. Um modelo mais útil pode ser a visão da gravidez como uma condição imunológica modulada, não um estado de imunossupressão.<sup>69</sup>

Além disso, a placenta é um sítio imunológico ativo, capaz de interagir e responder a patógenos. O tropismo placentário de patógenos específicos (por exemplo, *Listeria* ou *P. falciparum*) afeta a suscetibilidade e a gravidade de certas doenças infecciosas durante a gravidez, bem como os resultados da gravidez.<sup>69,70</sup> A infecção placentária que induz a produção de citocinas inflamatórias pode ativar o sistema imunológico materno e causar dano placentário e aborto espontâneo ou parto prematuro.<sup>71,72</sup> Embora uma infecção viral da placenta que desencadeia uma resposta inflamatória leve possa não interromper a gravidez, ela pode ativar o sistema imunológico materno ou do feto, potencialmente promovendo uma resposta inflamatória que pode levar ao dano do neurodesenvolvimento de longo prazo ou outras sequelas, incluindo doenças da prole na idade adulta.<sup>73,74</sup>

Apesar do período embrionário ser considerado o de maior risco para múltiplas complicações decorrentes de processo infeccioso, sabe-se que o sistema nervoso central permanece suscetível a complicações durante toda a gestação e até após o nascimento, durante o seu crescimento.<sup>12,13</sup> O perfil de gravidade das complicações da infecção pelo vírus Zika na gestação dependerá de um conjunto de fatores, tais como: imunidade materna, estágio de desenvolvimento do conceito, carga viral, virulência viral, linhagem do ZIKV mais virulenta e mecanismo patogênico específico do vírus zika.<sup>73,74</sup>

Alguns trabalhos mostram que anticorpos (Acs) DENV podem aumentar a captação de ZIKV nos sincícios trofoblastos e nas células endoteliais fetais da placenta em um mecanismo dependente de receptor Fc neonatal fetal, Fc RN, apoiando o papel de aprimoramento dependente de Acs da patologia ao ZIKV *in vivo* em humanos. Mães com Acs contra DENV demonstrariam ter filhos com fenótipo de microcefalia mais grave.<sup>74,75,76</sup>

A transmissão perinatal do ZIKV ocorre quando a gestante é infectada nas 2 semanas antes do parto ou no momento do nascimento. Quando a transmissão para

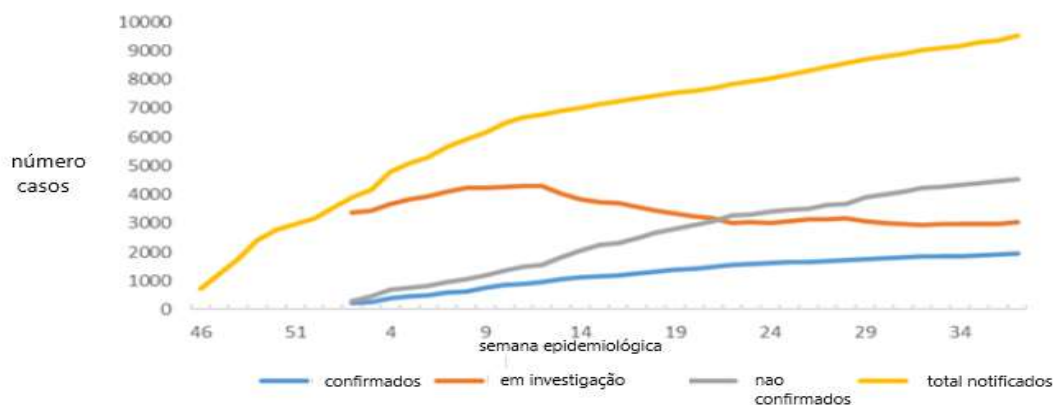
o bebê é perinatal, o recém nato pode desenvolver sintomas como exantema maculopapular, conjuntivite, artralgia e febre. <sup>12</sup>

A transmissão perinatal por outros flavivirus está associada à doença grave ao nascimento como na dengue, quando os recém-nascidos podem apresentar anemia, plaquetopenia, leucopenia e hemorragia ou na infecção perinatal por CHIKV quando os recém-natos podem apresentar quadro de sepse neonatal associada ao acometimento neurológico.<sup>73</sup>

O momento gestacional em que a mãe é infectada pelo ZIKV parece ter, como em outras infecções congênicas, uma importante relação com o grau de acometimento do feto. Sendo assim, quanto mais tardia a infecção durante a gestação, menor o envolvimento do feto, como já citado anteriormente, apesar de mais frequente a transmissão mãe-feto. <sup>77</sup>

A apresentação clínica da infecção pelo ZIKV parece ser similar em mulheres grávidas e não grávidas, e a infecção congênita, portanto, sugere que possa acontecer mesmo em grávidas assintomáticas.<sup>52,72</sup>

Viremia persistente na gestante pode agir como fator prognóstico, pois RNA viral detectado até 107 dias após início dos sintomas pode indicar replicação viral no feto ou na placenta.<sup>52,54</sup>



**Figura 12.** Casos de síndrome congênita do ZIKV: confirmados, em investigação e descartados. **Fonte:** Brasil, semanas epidemiológicas 2015-2016.

Tomando como base outras infecções congênitas, lactentes infectados pelo ZIKV durante a gestação podem ser assintomáticos ao nascimento e as alterações neurológicas ou outras, aparecerem meses ou anos após, como, por exemplo, na infecção congênita por citomegalovírus e toxoplasmose.<sup>78,79</sup> Figura-12

### **1.9 Patogênese do ZIKV no SNC, suas alterações e Microcefalia**

A infecção pelo vírus Zika e sua associação com microcefalia e síndrome de Guillain-Barré criaram uma urgência para entender os mecanismos dessa doença.<sup>83,84</sup> A probabilidade de microcefalia (sem outros fenótipos possíveis) fetal em gestantes infectadas pelo vírus Zika variou nos trabalhos científicos entre 1 a 13%.<sup>84</sup>

A provável causa de microcefalia e outras lesões do SNC pode ser explicada pelo fato de o ZIKV preferencialmente infectar células progenitoras neurais (NPCs, do inglês neural progenitor cells)<sup>15,85</sup> Como demonstrado em estudos anteriores, o ZIKV tem a capacidade de infectar estas células, resultando em alterações na expressão de proteínas relacionadas ao ciclo celular, indução do apoptose e comprometimento da produção de novos neurônios<sup>15,86</sup> A proliferação e a autorrenovação das NPCs, bem como a sua diferenciação, migração neuronal e maturação, são essenciais para o desenvolvimento embrionário normal do cérebro de mamíferos.<sup>85,86</sup> Dessa forma, a função do circuito neural pode ser drasticamente afetada pelas variações no número de células neurais que são produzidas durante o desenvolvimento. Assim, a incapacidade de produzir novos neurônios, por sua vez, pode levar à microcefalia fetal.

Analogamente, a infecção de culturas de organoides de neuroesferas humanas *in vitro* com o ZIKV comprometeu seu crescimento e levou a um aumento da morte celular<sup>87</sup> A infecção direta de NPCs pode não ser o único fator que contribui para a microcefalia induzida por ZIKV. A infecção de células da crista neural craniana pode resultar na produção de citocinas inflamatórias que agem de forma parácrina causando a eliminação das NPCs ao promover o processo de apoptose.<sup>88</sup>

O mecanismo através do qual o ZIKV interage com a maquinaria molecular do hospedeiro e compromete a neurogênese *in vivo* ainda não está bem elucidado, mas alguns autores sugerem que a expressão da proteína NS2A do ZIKV (mas não a proteína NS2A de DENV), diminui a proliferação, causa a diferenciação prematura de

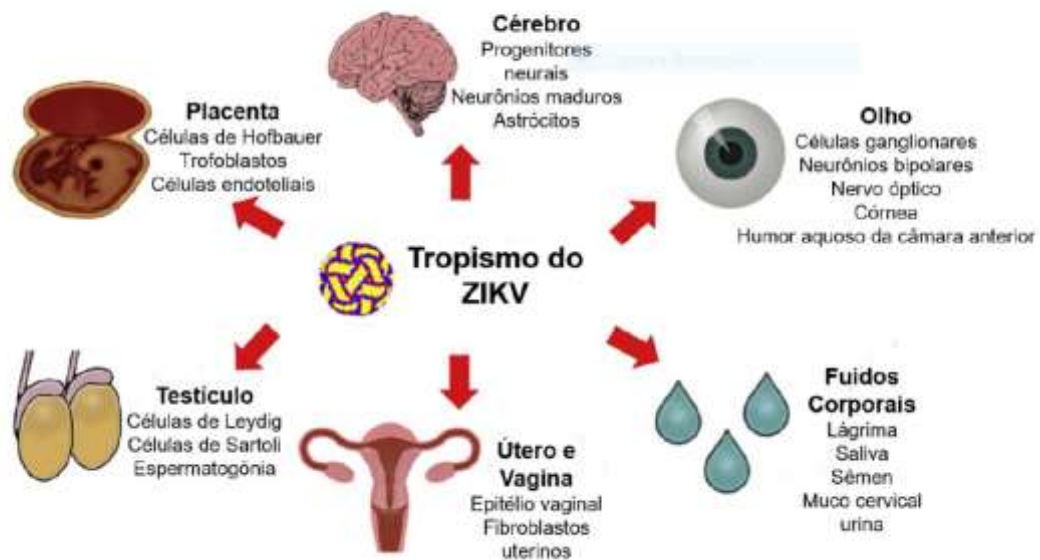
células gliais radiais (CGRs) e favorece o posicionamento anormal de neurônios jovens.

Conforme indicado, o ZIKV infecta células radiais da glia (RGs), que também são importantes para o desenvolvimento do CNS.<sup>178</sup> RGs estão alojados profundamente dentro do embrião e cérebro fetal de onde projetam fibras radiais para a superfície da pia do córtex.<sup>179</sup> As fibras radiais formam um esqueleto de tecido que orienta a migração de neurônios recém-nascidos para suas posições corretas na placa cortical. RGs também atuam como células-tronco neurais, com potencial para diferenciar em diversos tipos de células neuronais e gliais, incluindo neurônios, oligodendrócitos e astrócitos. Portanto, a erradicação de RGs (por exemplo, por infecções virais) pode levar a defeitos graves de desenvolvimento e formação cortical limitada. Partículas de ZIKV foram detectadas nos RGs de cérebros de camundongos infectados.<sup>116</sup> A infecção por ZIKV de RGs pode ser facilitado pela expressão do candidato ZIKV putativo receptor AXL no córtex, com expressão muito forte na fronteira com o ventrículo lateral e o SVZ externo,<sup>180</sup> uma região onde RGs são conhecidos por residirem em humanos.<sup>181</sup>

Isto ocorre através de interações entre os componentes de NS2A com os complexos de junções de adesão que permitem a aderência célula-célula, como evidenciado no córtex embrionário de camundongos, cujas alterações resultaram em formações aberrantes dessas junções e de suportes (*scaffolds*) de fibras gliais radiais. De forma similar, reduziu a proliferação de CGRs e levou ao déficit de junções de adesão em organoides de prosencéfalo humano.<sup>89</sup>

Isso indica que a infecção pelo ZIKV está associada com a inibição da migração de neurônios levando a patologias como a lisencefalia, agiria. Figura- 14

Além disso, estudos em humanos e em modelo animal demonstraram que a infecção pelo ZIKV pode resultar na persistência de vírus infecciosos e ácido nucleico viral em vários fluidos corporais (por exemplo, sêmen, saliva, lágrimas e urina) e em órgãos-alvo, incluindo os locais imunoprivilegiados (por exemplo, olhos, cérebro e testículos) e no trato genital feminino<sup>91</sup> Figura - 13

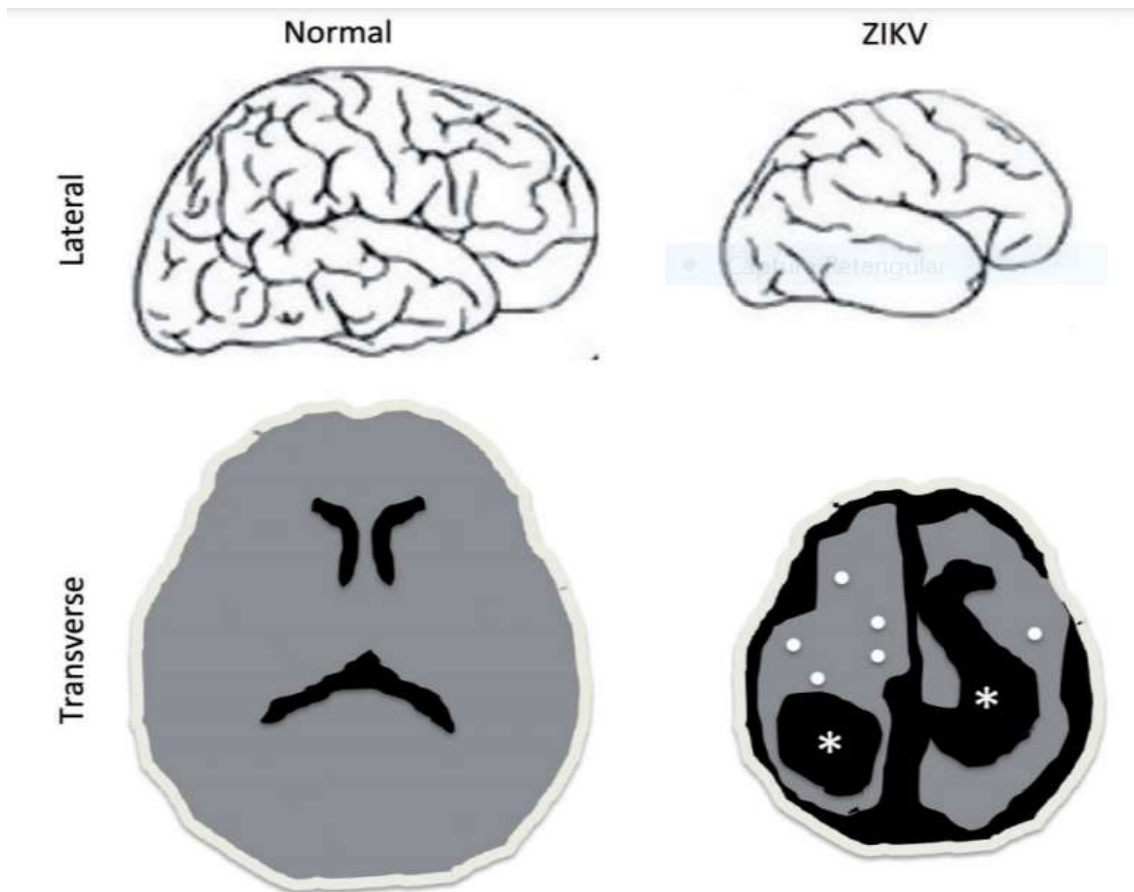


**Figura 13.** Tropismo celular e tecidual de ZIKV.

Estudos em humanos e em modelos animais (camundongos e primatas não-humanos) detectaram a presença de ZIKV no cérebro, olho, fluidos corporais, útero e vagina, testículo e placenta. **Fonte:** Adaptado de MINER e DIAMOND, 2017.<sup>91</sup>

Em resumo, a morte celular, defeitos de migração neuronal e proliferação mal direcionada e reduzida associada à infecção por ZIKV de NPCs podem levar a formação de um córtex mais fino do prosencéfalo em desenvolvimento. <sup>86,87,88,89</sup>

Figura-14



**Figura 14-** Defeitos de migração neuronal.

Durante a formação do córtex neural, os progenitores neurais são gerados na zona subventricular (SVZ) de onde eles migram ao longo das fibras glias radiais para a superfície da pia mater. O córtex se desenvolve de forma de “dentro pra fora”. Os neurônios primogênicos se diferenciam e ocupam as camadas VI e V, e os produzidos posteriormente residirão nas camadas IV, III, II e I. Desse modo, a camada I é a última a se formar. Presume-se que a depleção induzida por ZIKV de NPCs resultou de uma microcefalia ao córtex neural mais fino.  
<sup>15</sup> Funções celulares e moleculares putativas do vírus Zika em neuropatologias fetais e pediátricas. **Fonte:** Gharbaran R, et al.2018

### 1.10 Características da infecção congênita pelo ZIKV

As características clínicas da Síndrome Congênita do ZIKV são consequências da alteração direta da injúria neuronal e da perda volumétrica do tecido cerebral. Embora várias características sejam similares ao TORCH, há 5 características que raramente são vistas em outras infecções congênitas e unicamente na infecção pelo ZIKV:

- 1- Microcefalia grave com colapso do crânio, consistente com sequência de ruptura cerebral fetal.

- 2- Córtex cerebral com calcificações subcorticais.
- 3- Cicatriz macular e manchas retiniais pigmentares focais.
- 4- Contraturas congênicas (artrogriposes).
- 5- Hipertonia grave e sintomas de envolvimento do sistema extrapiramidal.



**Figura 15.** Bebê com Síndrome Congênita da Zika.

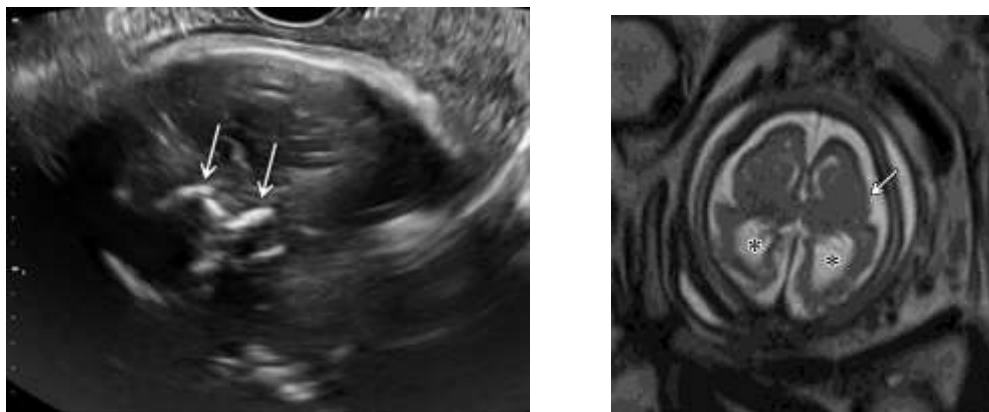
Embora a microcefalia seja o desfecho mais grave observado na Síndrome Congênita do Zika, várias outras alterações neurológicas podem ser observadas. Figura - 15

A variabilidade nos resultados pré-natal após infecção pelo ZIKV sugere um espectro fenotípico contínuo ou agrupamentos fenotípicos discretos. Neste ponto, há mais evidências em apoio de clusters fenotípicos discretos, mas efeitos quantitativos sutis podem demorar mais para serem percebidos.<sup>84,85,86</sup>

Os principais achados radiológicos na infecção intrauterina pelo Zika vírus com envolvimento do sistema nervoso central incluem microcefalia, ventriculomegalia e

calcificações multifocais no córtex e substância branca subcortical, bem como atrofia cortical.

A RM perinatal e a TC permitem o diagnóstico de paquigiria, disgenesia do corpo caloso e uma pequena fontanela anterior com fechamento prematuro de suturas cranianas.<sup>91,92,93,94,95</sup> Figura-16



**Figura 16.** Calcificações cerebrais em um feto de 37 semanas com infecção congênita pelo zika vírus adquirido durante a 12<sup>a</sup> semana de gestação.

(a) Imagem de US transabdominal mostra calcificações (seta) na superfície do cérebro. (b) Microcefalia com atrofia cortical e ventriculomegalia em feto de 36 semanas com infecção congênita pelo zika vírus adquirido no primeiro trimestre de gestação. Imagem axial de RM fetal ponderada em T2 mostra microcefalia com atrofia cortical difusa, que é mais evidente nos lobos occipitais, juntamente com ventriculomegalia associada (\*). Um padrão simplificado de sulcos corticais e giros (seta) também é mostrado<sup>95</sup>.

Como consequência clínica das alterações estruturais do SNC, destacam-se a hipertonia global grave com hiperreflexia, irritabilidade, hiperexcitabilidade, choro excessivo, distúrbio de deglutição, além de respostas auditivas e visuais comprometidas. Algumas crianças apresentam crises convulsivas já no período neonatal, e um aumento ou diminuição da frequência destas crises durante o seu seguimento. As crises epilépticas são mais evidentes a partir dos três meses de idade e os espasmos epilépticos o tipo mais comum.

Os exames de imagem do SNC (ultrassonografia transfontanela, tomografia e ressonância magnética) passaram a ajudar a definir essa nova síndrome, com características distintas das observadas em recém-nascidos com microcefalia provocada por outras infecções congênitas, mostrando marcantes calcificações difusas, puntiformes e predominando na junção córtico-subcortical, podendo estar presente ainda no tronco, núcleos da base e região periventricular. Outros achados



incluem comprometimento do padrão de migração neuronal, além de dilatação ventricular, atrofia cortical, atrofia de tronco ou cerebelo e disgenesias do corpo caloso<sup>96</sup>. A análise do eletroencefalograma evidencia anormalidades de natureza não epileptiforme inespecíficas, mas também variáveis anormalidades epileptiformes (focais, multifocal ou generalizada, podendo evoluir para o padrão hipsarrítmico), devendo fazer parte do protocolo de seguimento dessas crianças.<sup>81,96,97</sup>

Numa frequência menor de pacientes foram identificadas deformidades ósseas, em especial a artrogripose (contraturas congênicas) e pés tortos congênicos, consequência da baixa mobilidade do feto intraútero.

Anormalidades oculares já foram documentadas nessa população, sendo descritos casos de atrofia macular, além de nistagmo horizontal, alteração na retina, no nervo óptico e bem como alterações auditivas avaliadas pelo BERA/PEATE (Potencial Evocado Auditivo do Tronco Encefálico: uma análise metacognitiva ("processamento") dos eventos sonoros ("auditivo") e que envolvem, predominantemente as estruturas do sistema nervoso ("central" = vias auditivas e córtex)).<sup>97,98</sup>

Embora o fenótipo de SCZ tenha sido descrito em detalhes em série de casos, o impacto do risco específico de desfechos adversos fetal, como morte fetal, baixo peso, pequeno para idade gestacional, prematuridade pela infecção congênita pelo ZIKV ainda não foram bem quantificados em estudos epidemiológicos robustos.

## **1.11 Diagnóstico da infecção pelo ZIKV**

### **1.11.1 Diagnóstico Clínico da Infecção pelo ZIKV**

Muitas pessoas infectadas com o ZIKV são assintomáticas. Constatações clínicas características são febre baixa (menor que 38,5 C) de início súbito por 1 a 2 dias, exantema maculopapular pruriginoso de duração de 2 a 7 dias, artralgia e/ou artrite (intensidade leve a moderada) e conjuntivite não purulenta em grande parte dos casos. Outros sintomas geralmente relatados incluem mialgia e dor de cabeça. A manifestação clínica da doença é geralmente leve com sintomas que duram de alguns dias a uma semana. Doença grave que requer hospitalização é incomum, e o índice

de letalidade é baixo. No entanto, houve relato de casos de encefalite, meningoencefalite e síndrome de Guillain-Barré em pacientes após suspeita de infecção pelo Zika vírus.<sup>20,25,26</sup>

Os sinais e sintomas são inespecíficos e os principais diagnósticos diferenciais são as infecções causadas pelos DENV e CHIKV.

Até o momento, no entanto, ainda não sabemos quando a apresentação clínica da infecção pelo ZIKV em gestantes difere em relação a população geral e até o momento a maioria dos estudos epidemiológicos realizados não foram capazes de lançar luz sobre esta questão, pois recrutaram apenas gestantes sintomáticas, suspeitas da infecção pelo ZIKV.<sup>25</sup> Halai et al., mostra em seu trabalho que não há associação entre gravidade dos sintomas maternos e alterações no concepto, assim como níveis de viremia.<sup>159</sup>

### **1.11.2 Diagnóstico laboratorial da Infecção pelo ZIKV**

O teste de laboratório padrão-ouro para o diagnóstico de infecções virais é a cultura viral. No entanto, ele vai depender de alguns fatores como o momento da coleta e a carga viral nas amostras, além da dificuldade da sua reprodução nos laboratórios.

Hoje, o método de escolha para o diagnóstico de ZIKV é a detecção molecular do RNA deste vírus no sangue, no entanto, a janela para a positividade deste teste é curta especialmente no sangue (até 7 dias após início dos sintomas). Na urina essa janela pode se estender por até 30 dias. Assim, RT-qPCR negativo não descarta a infecção pelo já descrito acima<sup>102</sup> e, portanto, mesmo com a alta sensibilidade e especificidade, o processo de detecção do genoma do vírus, não é isento de dificuldades.<sup>102,109</sup> Figura- 9

Após a fase aguda, podemos lançar mão de métodos indiretos como a detecção de ACs contra o ZIKV. Os testes sorológicos (Enzyme-linked immunosorbent Assay) são afetados pelo período da infecção que foi coletado. A imunoglobulina M (IgM) pode ser detectada por imunoensaio enzimático no terceiro dia do início dos sintomas e pode durar mais de 2 meses.<sup>98,101</sup> Os anticorpos IgG surgem após o IgM e geralmente persistem por 3 meses e 5 meses.<sup>101,103</sup> IgM negativa não pode afastar a

infecção já que a espécime pode ter sido coletada antes do aparecimento desses anticorpos, ou após sua queda. Inversamente, anticorpos IgM podem ser detectados meses após a infecção; para gestantes, é especialmente difícil determinar se a infecção ocorreu antes, durante ou após a gestação.<sup>104</sup> Em adição, reação cruzada ocorre de Anticorpos IgM para ZIKV com outros flavivirus e assim, podemos ter falsos positivos como resultado do teste.<sup>105,106</sup>

Anticorpos neutralizantes detectados pelo teste de neutralização por redução em placa (PRNT) podem ser mais específicos do que a detecção de IgM por ELISA para infecção primária por ZIKV, mas também podem ter resultados indeterminados para infecção secundária, incluindo pacientes com vacinação posterior de febre amarela ou expostos a outros *flavivirus*.<sup>106,107</sup> Isso é especialmente problemático em áreas onde há co-circulação de múltiplos *flavivirus* com os mesmos vetores. Pacientes com infecção primária por ZIKV e infecção passada por DENV provavelmente têm maior título (geralmente 4 vezes) de IgM e / ou anticorpos neutralizantes contra o ZIKV do que contra o DENV ou outros *Flavivirus*<sup>106</sup>. Em áreas com casos locais de DENV, mas não de ZIKV, um teste sérico positivo para o antígeno DENV NS1 com aumento externo da IgM ou a combinação de uma resposta IgM positiva à DENV e a falta de uma soroconversão de IgG na amostra sérica de fase inversa deve mostrar ao clínico que investigue outro *Flavivirus*, como o ZIKV. Além disso, coinfeções com outros arbovírus transmitidos por mosquitos, como DENV, CHIKV, WNV e vírus da encefalite japonesa, são sempre possíveis e devem ser excluídas por testes laboratoriais mais extensivos, se clinicamente indicado.<sup>108,109</sup>

O diagnóstico rápido e preciso da infecção por ZIKV durante as epidemias recentes foi alcançado principalmente pela aplicação de RT-qPCR usando primers direcionados ao gene E ou NS5 do ZIKV.<sup>106,110,111,112</sup>

Alternativamente, o sequenciamento de RT-qPCR utilizando primers universais que são conservados em regiões nos genomas, como o gene NS5, de múltiplos flavivirus, podem permitir a detecção simultânea de > 50 *flavivirus* diferentes.<sup>113</sup> As amostras de soro devem ser coletadas na fase inicial da doença, porque a viremia geralmente dura pouco (geralmente 5 dias, raramente até 11 dias) e pode estar abaixo do nível detectável (102 cópias / mL).<sup>54,106</sup> Alternativamente, as amostras de urina podem ter cargas de RNA viral mais altas (> 10<sup>6</sup> cópias / mL) do que as amostras de soro e podem ser persistentemente positivas para > 30 dias após o início dos sintomas.<sup>114</sup> FIGURA -9 Em poucos casos, o RNA do ZIKV também foi

detectado em amostras de saliva e de swab nasofaríngeo de pacientes cujas amostras de soros apresentaram resultado negativo para o ZIKV. Portanto, essas amostras também devem ser coletadas em casos suspeitos de infecção pelo ZIKV.<sup>115, 116</sup> A coleta de líquido amniótico deve ser considerada em mulheres grávidas com resultado positivo no teste de ZIKV ou se os fetos mostrarem evidências ultrassonográficas sugestivas de infecção congênita pelo ZIKV<sup>106,117</sup> Tecidos do cordão umbilical de neonato com suspeita de infecção congênita por ZIKV devem ser enviados para exame virológico e / ou histopatológico para estabelecimento do diagnóstico.

O RNA do ZIKV também pode ser detectado em tecidos de órgãos nos casos raros de mortes suspeitas relacionadas ao ZIKV. Os estudos futuros devem estratificar melhor o uso clínico desses testes e desenvolver testes no local de atendimento (por exemplo: testes de antígenos que pode ser amplamente utilizado em regiões menos desenvolvidas sem as facilidades e a experiência para testes moleculares ou sorológicos como ELISA.<sup>99,100,105</sup>

### **1.11.3 Diagnóstico de Infecção Congênita pelo ZIKV**

O CDC recomenda que testes laboratoriais devam ser realizados em todos os bebês com clínica sugestiva de infecção congênita, que viajaram ou moram em áreas de transmissão. No bebê devemos realizar RT-qPCR para o ZIKV do soro ou urina e IgM ELISA no soro e esses dois exames podem ser realizados no líquido cerebrospinal quando este estiver disponível. Testagem no cordão umbilical para diagnóstico de infecção vertical, não é recomendado pelo risco de contaminação pelo sangue materno. Para a distinção entre infecção congênita, perinatal ou pós natal, o CDC recomenda a realização desses testes até os 2 primeiros dias de vida. A infecção congênita é confirmada quando o RNA viral é detectado em espécimes do RN a

despeito do IgM. RN com IgM positiva para o ZIKV pelo ELISA, mas com RT-qPCR negativo para ZIKV serão classificados como provável infecção congênita pelo ZIKV. Se os resultados dos dois testes forem negativos, mas a clínica for altamente suspeita, o CDC sugere que seja utilizado o teste de neutralização (PRNT) aos 18 meses de vida, embora o PRNT não consiga distinguir entre anticorpos maternos ou infantis.<sup>123</sup>

O teste de neutralização por redução de placa (PRNT), pode ser usado para ajudar a identificar resultados falso-positivos. Se a amostra inicial do bebê for IgM positivo e RT-qPCR negativo, mas o PRNT não foi realizado na amostra da mãe, o PRNT para Zika e vírus da dengue deve ser realizado na amostra inicial do bebê. Se o PRNT do Zika vírus for negativo, isso sugere que o teste de IgM do Zika vírus do bebê é um falso positivo.

Se os resultados do PRNT aos 18 meses forem negativos, considera-se que o bebê não tem infecção congênita pelo Zika vírus. Se os resultados do PRNT forem positivos, a infecção congênita pelo Zika vírus é presumida, mas a infecção pós-natal não pode ser excluída, especialmente entre bebês que vivem em uma área com transmissão ativa do Zika vírus e apresentem lesões do SNC.<sup>123</sup>

## **1.12 Neurodesenvolvimento**

A ciência define o desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM) como um processo de mudanças no comportamento motor e cognitivo de um indivíduo de acordo com a idade.

Em outras palavras, é a capacidade que o indivíduo possui após o amadurecimento do sistema nervoso e cerebral para desenvolver tanto sinapses mentais quanto habilidades motoras.

Esse processo de mudança é muito importante para o ser humano, afinal, quando o bebê nasce, seu sistema nervoso central ainda não está completamente desenvolvido. Como consequência disso, ele é totalmente dependente das pessoas que fazem parte de seu convívio.

Contudo, é a partir da sua estimulação, tanto sensorial quanto motora, que o seu desenvolvimento ocorrerá e se manterá em constante evolução, auxiliando também no seu processo de aprendizagem.

É fundamental avaliar as fases de desenvolvimento das crianças nos primeiros 6-18 meses de vida, época em que alguma intervenção terapêutica pode ser mais eficaz.

A forma de posicionar as mãos na boca, o primeiro sorriso, a primeira resposta ao estímulo visual de luzes e cores, as primeiras palavras, o engatinhar e até mesmo o andar; todos esses momentos fazem parte do desenvolvimento neuropsicomotor infantil.

Por isso, desde o nascimento até os 6 ou 7 anos, a criança desenvolve habilidades que precisam ser avaliadas com atenção, pois, se houver alguma inconsistência nesse sentido, o acompanhamento profissional específico precisa ser acionado.

A ciência classifica o desenvolvimento neuropsicomotor no sentido craniocaudal, portanto, em primeiro lugar, a criança firma a cabeça, a seguir o tronco e, depois, os membros inferiores.

A maturidade cerebral também ocorre no sentido pósterior anterior, portanto, primeiro a criança fixa o olhar, a seguir leva a mão aos objetos etc.

A avaliação do desenvolvimento pelo pediatra é baseada nos marcos definidos pela escala de desenvolvimento Denver II. Deve-se avaliar o desenvolvimento social, motor e da linguagem.

- Desenvolvimento social
- Desenvolvimento motor
- Desenvolvimento da linguagem
- Desenvolvimento do desenho

Na avaliação neuropsicológica infantil devemos acompanhar cada etapa desta da evolução da criança que consiste em:

### **Desenvolvimento Social**

- Olhar o examinador e segui-lo em 180° = 2 meses
- Sorriso social = 3 meses
- Leva mão a objetos = 4 meses
- Apreensão a estranhos = 10 meses
- Dá tchau, bate palma = 15 meses

- Imita atividades diárias = 18 meses

### **Desenvolvimento Motor**

- Sustento cefálico = 4 meses
- Sentar com apoio = 6 meses
- Sentar sem apoio = 9 meses
- Pinça superior = 9 meses
- Em pé com apoio = 10 meses
- Andar sem apoio = 18 meses

### **Desenvolvimento da Linguagem**

- Lalação = 6 meses
- Primeiras palavras = 12 meses
- Palavra frase = 18 meses
- Junta duas palavras = 2 anos
- Frases gramaticais = 3 anos

Ao avaliar o desenvolvimento neuropsicomotor de uma criança, o profissional deve estar preparado para sinalizar as possíveis tomadas de decisões quanto à reabilitação desse pequeno paciente, bem como saber auxiliar a família neste momento.<sup>128,129</sup>

#### **1.13 BAYLEY III (BSID III) e HINE (Hammersmith Infant Neurological Examination)**

O Bayley Screening Test é uma ferramenta de triagem do desenvolvimento para crianças até 42 meses baseada na *Bayley scales of infant and toddler development*, ou Bayley III e demonstra ser um teste de alta confiabilidade na triagem de crianças de risco para atraso no desenvolvimento.

É considerada padrão ouro para avaliação do neurodesenvolvimento, pois fornece resultados confiáveis, válidos e precisos. Entretanto é um teste extenso, dura cerca de 90 minutos de avaliação o que o torna difícil de ser implantando dentro de um serviço de seguimento de crianças de risco ou até mesmo na assistência primária.

Pode ser aplicado ainda em lactentes pré-termo, crianças com HIV, autistas ou portadoras de Síndrome de Down. A escala motora grossa é composta por 72 itens e a motora fina por 66 itens, já o domínio da linguagem é composto por 97 itens e a escala cognitiva por 91 itens. O ambiente para a realização do exame deve ser

silencioso, ventilado e bem iluminado, com espaço suficiente para a criança andar, correr e pular. A pontuação consiste em fornecer um ponto para um comportamento da criança observado e zero para um comportamento não observado.

A BSID apresenta custo elevado, pois requer uso de kit específico com materiais de estímulo que inclui um manual. Há a necessidade de um treinamento dos profissionais para a sua aplicação.<sup>128,129,130,131</sup>

Os resultados obtidos pelas subescalas motora e mental são úteis para fornecer a família um feedback sobre o desenvolvimento do seu filho, servindo para monitorar a evolução do tratamento de crianças com riscos de alterações motoras. É útil ainda para a tomada de decisões em uma intervenção precoce. Os dados desta escala são considerados válidos, confiáveis e objetivos, sendo bastante empregados em pesquisas científicas.<sup>130</sup>

O desenvolvimento é classificado por escores, usando pontuações padrões para o escore composto, que varia de 40 a 160 pontos em todas as suas subescalas. O desvio da pontuação de um indivíduo a partir da média normativa (100 + ou - 15) indica um maior grau de atraso no desenvolvimento. Temos como resultado normal, moderadamente alterado, gravemente alterado (pontuação e DP). Bayley-pontuação III dentro de 1 desvio padrão (DP) acima ou abaixo da normalidade de 100 foi considerado normal para esse domínio específico. Uma pontuação entre 1 a 2 DP acima da normalidade (116 a 130) foram considerados acima da média e 1 a 2 DP abaixo da normalidade (70 a 85) moderadamente abaixo da média. Uma pontuação acima de 2 DP da normalidade (> 130) foi considerada muito acima da média e 2 DP abaixo da normalidade muito abaixo da média (<70). O sistema de pontuação é consistente com o publicado anteriormente em estudos de desenvolvimento.<sup>131-133</sup>

O Exame neurológico infantil Hammersmith (HINE) é uma escala que é realizada em bebês com maior risco de aparecimento de sequelas de neurodesenvolvimento. É composto de avaliações das funções dos nervos cranianos a postura, movimentos, reflexos e tônus muscular de acordo com a idade, momento de balbucio, palavras isoladas (para palavras isoladas pelo menos 5–10 palavras com um papel semântico), sorriso responsivo e dedo indicador apontando para um objeto.<sup>135,136,137</sup>

Um dos benefícios do HINE em comparação com as outras ferramentas de avaliação é que o protocolo não só identifica a criança com risco de Paralisia Cerebral mas também promove uma informação adicional sobre o tipo e a gravidade da sequela



motora, além de identificar também alterações relacionadas a outros aspectos das funções neurológicas, como as alterações auditivas, visuais e alimentares e isso é particularmente importante, pois o comprometimento da paralisia cerebral não se limita à sequela motora e tais achados podem aumentar a precisão do diagnóstico.<sup>135</sup>

A Avaliação Neurológica de Hammersmith (HINE) é um exame padronizado, classificável e pode ser usado tanto na prática clínica quanto para fins de pesquisa. É uma avaliação de fácil execução e relativamente rápida e acessível, com boa confiabilidade interobservador mesmo se feita por profissionais com pouca experiência.

## 2 JUSTIFICATIVA

Antecedendo o Plano Nacional de Enfrentamento à Microcefalia no Brasil lançado pelo Ministério da Saúde em dezembro de 2015, a Fiocruz de Manguinhos recebia gestantes com exantema de todo o estado do Rio de Janeiro para investigação diagnóstica de Zika. Neste mesmo mês o Laboratório de Doenças Febris Agudas do Instituto Nacional de Infectologia (INI) dividiu a responsabilidade dessa Emergência de Saúde Pública com o atendimento de casos na população geral e também em gestantes, investigação e seguimento desse subgrupo populacional, com o apoio do Centro de Saúde da ENSP e Instituto Fernandes Figueira, com quem tem parceria estabelecida desde 2012.

A exemplo de outras infecções congênicas, o desenvolvimento de anomalias congênicas associadas ao ZIKV depende de diferentes fatores. Além do largo espectro das alterações neurológicas possíveis, observamos que há alteração no padrão clínico individual desses casos, similar às infecções congênicas por arbovírus em animais, como descrito na literatura.<sup>116,117</sup>

Apesar do número crescente de trabalhos sendo publicados sobre a infecção pelo ZIKV, nossa casuística foi um diferencial com 216 bebês nascidos vivos. Além disso as consequências e evolução clínica dos lactentes expostos ao ZIKV, nos dois primeiros anos de vida e ao longo dela ainda foi pouco explorado. É de suma importância descrever a dinâmica evolutiva da síndrome clínica recém-diagnosticada, o desenvolvimento desses bebês e o surgimento de novos sintomas e complicações a longo prazo, considerando diversos possíveis desfechos em relação ao SNC e o prognóstico das crianças afetadas.

O seguimento da coorte de lactentes, composta por 216 bebês nascidos vivos, faz parte do projeto “Zika na Gestaçã”, de gestantes sintomáticas, com RT-qPCR positivo para Zika vírus, no período de setembro de 2015 e junho de 2016.

A importância desse trabalho está no número de gestantes acompanhadas e todas com o diagnóstico confirmado.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo Geral**

Descrever a evolução clínica dos bebês expostos ao ZIKV durante a gestação e as consequências desta infecção nos três primeiros anos de vida em crianças nascidas com ou sem microcefalia.

### **3.2 Objetivos Específicos**

1. Estimar o risco absoluto dos desfechos adversos em lactentes, associados à exposição ao ZIKV intraútero.
2. Descrever os achados de neurodesenvolvimento dos bebês expostos ao ZIKV durante a gestação do nascimento aos 3 anos de vida.
3. Relacionando os exames de imagem do SNC com neurodesenvolvimento dos bebês.

## **4 MÉTODOS**

### **4.1 Delineamento do projeto**

Estudo prospectivo de bebês expostos ao ZIKV durante a gestação.

### **4.2 Casuística**

#### ***4.2.1 Plano de recrutamento***

Gestantes residentes em Manguinhos e na região metropolitana do Rio de Janeiro que apresentassem doença exantemática no período de setembro de 2015 a junho de 2016 e procurassem o ambulatório de Doenças Febris Agudas de (DFA) ou o Centro de Saúde Escola Germano Sinval Faria da ENSP eram convidadas a participar do estudo. Todas as gestações foram acompanhadas até dezembro de 2017.

#### ***4.2.2 Critérios de Inclusão***

Lactentes expostos à infecção pelo ZIKV durante a gestação: bebês nascidos de mães com sintomatologia sugestiva e RT-qPCR positivo para ZIKV (na urina e/ou no sangue) durante a gestação e com assinatura do TCLE.

#### ***4.2.3 Critérios de Exclusão***

Lactentes cujas mães tiverem apresentado durante a gestação alguma infecção por doenças do grupo STORCH (Sífilis, Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovírus, Herpes).

Lactentes cujas mães apresentaram testes RT-qPCR negativo para ZIKV.

Lactentes cujos pais não permitiram o acompanhamento de seus filhos, retiraram o termo de consentimento, ou que desistiram do acompanhamento.

### **4.3 Seguimento**

Após a alta pós-parto, os lactentes foram chamados aos 1, 2, 3, 6, 9, 12, 18, 24 e 36 meses de vida para acompanhamento. O acompanhamento das crianças ocorreu na possibilidade de os pais retornarem aos ambulatórios. Os dados foram coletados até 36 meses de idade.

Cada consulta incluía exame físico com avaliação do neurodesenvolvimento pelo Bayley III ou HINE de acordo com a idade da criança, coleta de sangue e urina. Todas as crianças eram encaminhadas ao grupo multidisciplinar (oftalmologista infantil, otorrinolaringologista, geneticista, psicólogos, fisioterapeutas e neuropediatra) do IFF.

#### **4.4 Variáveis de Interesse**

Dados antropométricos: idade gestacional, sexo, peso ao nascimento, estatura, perímetro cefálico.

Complicações clínicas: convulsões, artrogripose, exame neurológico alterado, retardo no neurodesenvolvimento conforme Bayley III e Hine.

O exame físico incluiu a documentação de qualquer anormalidade clínica ou anomalia congênita.

Exames de imagem foram realizados sendo a Ultrassonografia transfontanela (USTNF) no primeiro mês de vida havendo e conforme resultado, indicação de realização de tomografia de crânio (TCC) ou ressonância magnética (RNM). As crianças eram universalmente encaminhadas para exame oftalmológico (fundoscopia e RET-CAM) e exame auditivo (Potencial Evocado Auditivo –BERA).

A avaliação do desenvolvimento psicomotor Bayley III e HINE complementava as avaliações clínicas pediátricas que eram realizadas através da escala de Denver II.

As avaliações do Bayley e HINE eram realizadas no IFF e no Centro de Saúde da ENSP por profissionais capacitados e certificados nos métodos e estes resultados alimentavam um banco de dados comum.

O gerenciamento do banco de dados era realizado pela equipe central responsável pela coorte e os dados disponibilizados para braços de pesquisas credenciados conforme as normas estabelecidas no início do estudo. Assim, como garantia de proteção de dados os pesquisadores tinham acesso franquiado apenas aos dados relativos ao trabalho sob suas responsabilidades.

Foram considerados como desfechos adversos: prematuridade; presença de anomalia congênita (microcefalia) ou displasia/contraturas (artrogripose); pequeno para a idade gestacional (PIG); exame neurológico alterado; alterações visuais ou auditivas (neurossensoriais); anomalias estruturais no exame de imagem do SNC. As medidas antropométricas peso, estatura e PC foram utilizados para avaliar características biométricas. O perímetro cefálico foi medido com uma fita métrica não elástica colocada entre a testa e o occipital, o peso foi medido em balanças de bebê reclinada. Z-pontuações para estas medidas foram em seguida calculadas utilizando o intercrescimento-21 st curvas <sup>13-15</sup>, que tenham em conta o sexo e a idade gestacional do recém-nascido. Este escore é uma terminologia utilizada para representar a variabilidade de um determinado parâmetro entre indivíduos e representa a distância, em forma de desvio-padrão, que os valores daquele parâmetro podem assumir na população em relação ao valor médio. O comprimento da criança foi mensurado através de um estadiômetro horizontal.

As curvas levaram em consideração a Idade gestacional e sexo da criança, considerando percentis ou escores Z. Aos recém-nascidos pré-termo (RNPT), foram utilizadas curvas específicas como Inthergrowth-21st.

#### **4.5 Definição das Variáveis**

**Microcefalia leve-** é definida quando a medida do PC está entre 2 a 3 DP abaixo da média para idade gestacional e sexo.

**Microcefalia grave-** é definida quando a medida do PC está abaixo de 3 DP da idade gestacional e sexo.

**Microcefalia primária-** na qual o PC anormal é observado ao nascimento.

**Microcefalia secundária-** que se desenvolve no período pós-natal. A microcefalia pós-natal ou secundária ocorre principalmente por infecções como meningites, encefalites, encefalopatia congênita pelo HIV<sup>126</sup>

**Prematuridade-** quando o nascimento ocorre antes de 37 semanas completas de gestação.

**Pequena para idade Gestacional (PIG)-** foi considerado PIG os RN que tinham peso ao nascer abaixo do percentil 10 para a idade gestacional.

**Baixo peso ao nascimento (BPN)**- foram considerados BPN recém-nascidos com menos de 2.500g, ou aqueles com pesos ao nascimento abaixo do INTERGROWTH-21st Project para idade gestacional e sexo.<sup>125</sup>

**Óbito fetal**- foi definido como morte do embrião ou feto em qualquer idade gestacional.

#### **4.6 Avaliação do Neurodesenvolvimento**

Para a avaliação do neurodesenvolvimento foi realizado o teste de Bayley III em três domínios: linguagem, cognição e motor em 146 crianças; e o exame neurológico infantil Hammersmith (HINE) em 70 crianças.

Na ausência da neuro avaliação pelo teste de Bayley-III, estágios de desenvolvimento foram investigados por uma adaptação do exame HINE, para avaliar o desenvolvimento neurológico, onde se faz os exames de função motora e estado de comportamento em lactentes de 2 a 36 meses (idade cronológica ou corrigida), relatados pelos pais.<sup>133</sup>

Os principais marcos psicomotores incluídos em nossa entrevista foram as habilidades motoras brutas que incluíram: sustentar a cabeça, sentar sem apoio, e o andar livremente. Quando a criança iniciava o balbucio, palavras isoladas, sorriso responsivo e dedo indicador apontando para um objeto.

As avaliações pelo HINE foram obtidas a partir da entrevista dos pais e da observação do lactente quando possível.<sup>134,135</sup>

#### **4.7 Avaliação de neuroimagem**

A ultrassonografia transfontanela (USTNF) era realizada sempre que possível no primeiro mês de vida e quando alterados eram distribuídos de acordo com a indicação neuropediátrica e disponibilidade nos serviços públicos/privados para realização de TCC ou RNM.

Cento e quinze crianças foram submetidas a exames radiológicos cranianos: ultrassonografia transfontanela (N=94), ressonância magnética (N=47) e tomografia computadorizada (N=25). Cento e uma crianças não realizaram exames de imagens.A

maioria que não realizou os exames foi devido ausência de características fenotípicas para SZC e que apresentavam seu neurodesenvolvimento normal de acordo com idade (USTNF só pode ser feito enquanto a fontanela estiver aberta - entre 9 e 18 meses de vida), falta de recursos para o comparecimento na data marcada, e dificuldades operacionais para realização desses exames.

Avaliação dos dados de imagem foi dicotômica, isto é, alterado e não alterado.

#### **4.8 Gerenciamento dos dados**

Um banco de dados eletrônico unificado foi projetado pela equipe de gerenciamento de dados no INI Fiocruz-RJ, que contém as informações registradas nas fichas de atendimento. Os dados foram digitados no local da pesquisa para este banco de dados e transmitidos periodicamente ao centro de coordenação na Fiocruz. Consultas de dados foram geradas mensalmente.

#### **4.9 Métodos Estatísticos e Análise dos Resultados**

Tamanho da amostra: a estimativa de amostragem foi de conveniência, isto é: foi realizado o seguimento de 216 lactentes com idade entre 1 e 36 meses, expostos ao ZIKV durante a gestação para avaliação dos desfechos ao longo desses anos.

Destes, um subgrupo de 115 lactentes foi submetido a exames de imagem do SNC; e 104 avaliação de neurodesenvolvimento. Um total de 94 lactentes realizaram ambas as avaliações.

Para associação entre exame de imagem alterada/não alterada e escores de Bayley III, testes de correlação foram usados para determinar os valores de R e R<sup>2</sup> e a regressão linear simples foi usada para determinar os valores de P.

Foi realizada análise descritiva dos dados clínicos dos recém-natos. Foi medido o risco absoluto dos desfechos adversos no lactente exposto ao ZIKV intraútero: microcefalia, pequeno para idade gestacional (PIG), óbitos fetais, alterações fenotípicas (microcefalia), alterações do neurodesenvolvimento, alterações visuais (fundo de olho) e auditivas (BERA) e alterações de imagem (USTF, TCC e RNMc).

A regressão logística multivariada foi usada para examinar as associações entre neurodesenvolvimento, resultados neurossensoriais (alterações auditivas e visuais) e as associações entre idade gestacional (semanas) da infecção pelo ZIKV.



Avaliações auditivas foram realizadas através do BERA, alteração do neurodesenvolvimento através do Bayley III, perda fetal, microcefalia medindo PC e avaliação de alterações de fundo de olho.

Covariáveis incluindo idade materna no parto, prematuridade, peso ao nascimento (PN), foram examinadas pela colinearidade, usando qui-quadrado para covariáveis nominais e análise de correlação para variáveis contínuas.

As análises estatísticas foram realizadas usando o pacote R (versão R 3.0.1, *The R429 Foundation for Statistical Computing*, [www.r-project.org](http://www.r-project.org)).

#### **4.10 Considerações Éticas**

ESTE PROJETO E UM SUBPROJETO DO “ESTUDO DA HISTÓRIA NATURAL DA INFECCAO POR ZIKV E CHIKV NA GESTACAO” CAAE – 0026.0.009.000-07.

O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi assinado pelos pais ou responsáveis de maneira consistente seguindo a Declaração de Helsinque 466/12. Associação Médica Mundial. Declaração da Associação Médica Mundial de Helsinque: princípios éticos para pesquisas médicas envolvendo seres humanos.<sup>139</sup>

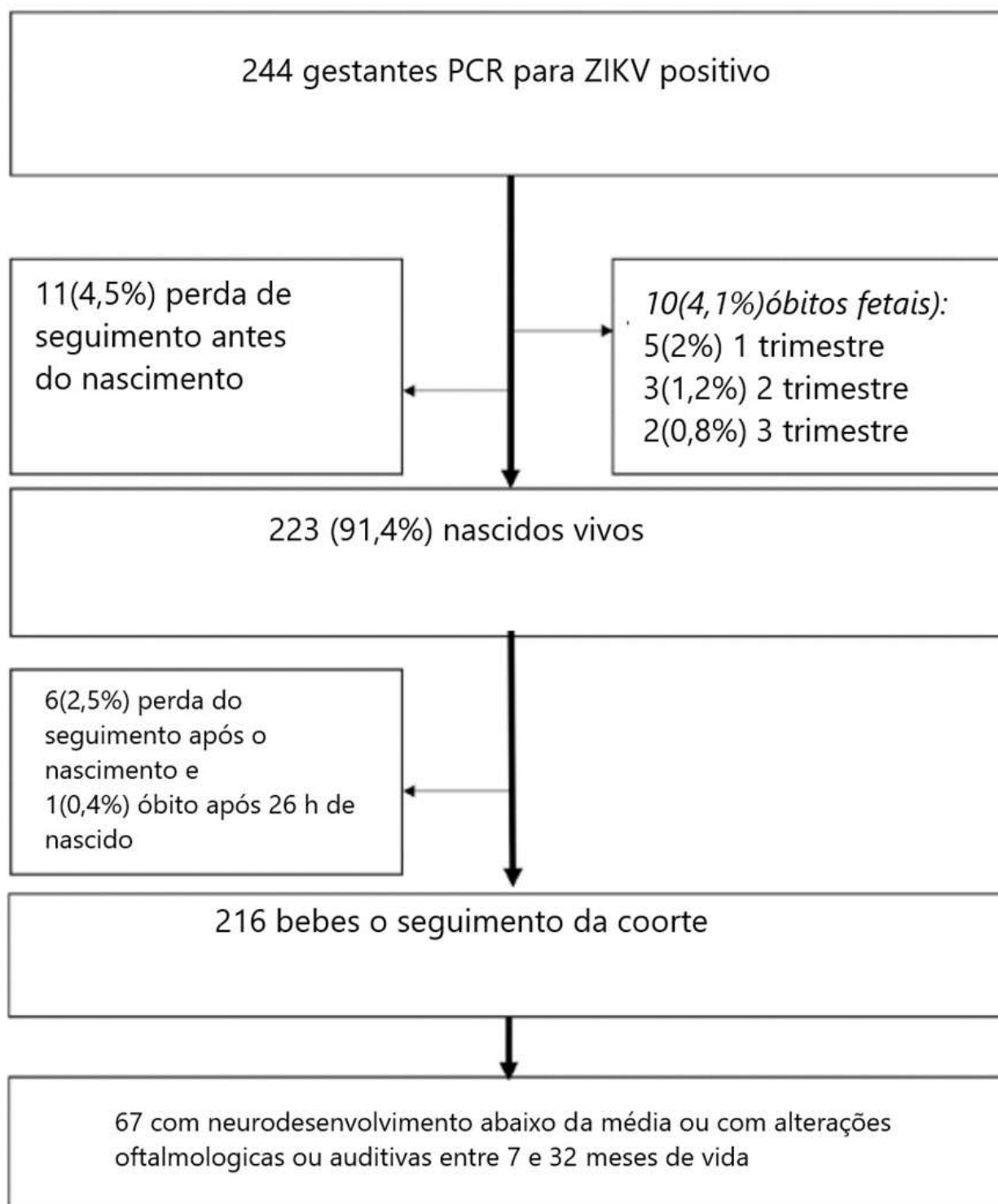
## 5 RESULTADOS

De setembro 2015 a junho de 2016, 244 gestantes que apresentavam exantema, clínica sugestiva de infecção e RT-qPCR positivo para ZIKV em urina ou sangue, foram recrutadas para o estudo. Todas as gestações terminaram até dezembro de 2017. Se

Destas 244 gestações, tivemos 223 (91,4%) bebês nascidos vivos. Houve perda de seguimento antes do nascimento de 11 bebês, sendo 10 (4,1%) óbitos fetais: 5(2%) deles no primeiro trimestre, 3(1,2%) no segundo trimestre e 2(0,8%) no terceiro trimestre e uma gestante não continuou o seu acompanhamento.

Seis bebês (2,5%) abandonaram o seguimento após o nascimento e 1 foi a óbito após 26 horas do nascimento por insuficiência respiratória aguda.

Continuamos seguindo 216 bebês na coorte e destes 67 apresentaram alguma avaliação do seu neurodesenvolvimento abaixo da média para idade ou com alterações oftalmológicas ou auditivas entre 7 e 32 meses de vida. Figura-17



**Figura 17.** Fluxograma de recrutamento e seguimento dos bebês expostos ao ZIKV durante a gestação. \*lactente com artrogripose, mas sem microcefalia. Óbito por insuficiência cardiorrespiratória

A distribuição por gênero, sexo, taxa de prematuridade, e desfechos de 216 bebês são apresentados na Tabela 1.

A média de idade das gestantes incluídas no estudo ao nascimento dos bebês foi 30,5 anos (+ ou – 6,3 anos).

Dos 216 bebês que aderiram ao seguimento da coorte, 106 (49,1%) eram meninas e 110 meninos (50,9%).

Vinte e oito bebês nasceram prematuros, sendo que 18 entre 35 e 37 semanas de gestação e 10, com menos de 35 semanas de gestação.

Embora 4,6% dos bebês fossem pequenos para a idade gestacional ao nascer, apenas 2 de 216 bebês (1%) tiveram problemas de desenvolvimento no seguimento (escores  $Z < -2 DP$ ).

Das 216 crianças acompanhadas, a microcefalia foi identificada em 8 (3,7%), incluindo 2 lactentes com microcefalia secundária. Duas das 8 crianças nascidas com microcefalia se resolveram: uma delas com microcefalia primária desenvolveu perímetro cefálico normal com seu crescimento e o outro apresentou normalidade após cirurgia de craniossinostose. Ambos tiveram neurodesenvolvimento normal e também exames de fundoscopia e audiometria/(BERA) sem alterações no segundo ano de vida. **Tabela-1**

**Tabela 1.** Risco absoluto de desfechos adversos em lactentes expostos ao ZIKV intraútero

Demografia no nascimento	N=216			100%		
Média de idade materna ao nascer e DP	30,3 anos			± 6,3 anos		
Gênero infantil						
Feminino	106			49,1%		
Masculino	110			50,9%		
Bêbe prematuro	28			13,0%		
<37 à ≥ 35	18			8,3%		
< 35 semanas	10			4,6%		
Pequeno para idade gestacional	10			4,6%		
Microcefalia	8			3,7%		
Primário	4			1,9%		
Secundário*	2			0,9%		
Resolvido**	2			0,9%		
Entrevistas e Bayley III avaliações do neurodesenvolvimento em 7 - 32 meses de idade (n=216)*	Normal (N)	%	Anormal (N)	%		N
	154	71,3%	62	28,7%		
Avaliações Bayley-III (N=146)			Entre -1DP e -2DP(N)	%	Abaixo de -2DP(N)	%
Todos (N= 146)	87	59,6%	41	28,1%	18	12,3%
Cognitiva (N=146)	132	90,4%	6	4,1%	8	5,5%
Linguagem (N=146)	95	65,1%	34	23,3%	17	11,6%
Motor (N=146)	122	83,6%	17	11,6%	7	4,8%
Outras avaliações neurossensoriais						
Audição (N= 146)	101	89%	13	12%		
Exames oftalmológicos funduscópios (N=137)	128	94%	9	7%		

**Legenda:** \*2 bebês nasceram com perímetro cefálico normal e desenvolveram microcefalia no primeiro ano de vida. \*\*Um bebê nasceu com microcefalia e ao longo do tempo normalizou o perímetro cefálico. Um bebê nasceu com craniossinostose e obteve melhora do perímetro cefálico após cirurgia.

Todos os 216 bebês tiveram avaliação de desenvolvimento neurológico através da escala de Bayley III e/ou HINE entre 2 e 32 meses de vida. A faixa etária no momento da última avaliação do neurodesenvolvimento foi de 7 a 32 meses (idade mediana de 18 meses). Apenas 5 crianças tiveram avaliações Bayley-III abaixo de 12 meses de idade.

Os bebês cujos pais não foram à consulta presencial ou os que não quiseram ou não puderam retornar nas avaliações subsequentes, tiveram o neurodesenvolvimento avaliado através dos questionários HINE (70).

Como podemos ver na tabela 1, das 216 crianças avaliadas pelo Bayley III ou HINE, 71,3% das crianças (N = 154) tiveram avaliações de neurodesenvolvimento normais. Das 146 crianças avaliadas apenas pelo Bayley, 59 delas, (40%) tiveram resultados de Bayley-III  $\leq -1$  DP em pelo menos em um dos 3 domínios funcionais. Quando as crianças avaliadas por meio do HINE e questionários de neurodesenvolvimento foram incluídas, 62 das 216 crianças expostas ao ZIKV no período pré-natal (28,7%) pontuaram abaixo da média em pelo menos uma avaliação. Entre as 146 crianças com resultados de Bayley-III, 28,1% tiveram desempenho abaixo da média (-1SD a -2DP), e 12,3% tiveram desempenho muito abaixo da média ( $<-2DP$ ) nos domínios cognitivo e / ou motor e / ou de linguagem. O desenvolvimento da linguagem foi o mais afetado, com 34,9% das crianças apresentando resultados de Bayley-III abaixo de -1 DP; 9,6% apresentaram atraso no desenvolvimento cognitivo e 16,4% no desenvolvimento motor. Os resultados do Bayley-III tiveram uma distribuição enviesada para pontuações mais baixas; apenas 10% das crianças estavam acima de 1 DP em qualquer domínio; nenhuma criança apresentou pontuação acima de 2 DP. Em contraste, 30% das crianças tiveram pontuações abaixo da média.

Sessenta e sete de 216 bebês apresentaram neurodesenvolvimento abaixo da média e/ou alterações auditivas e/ou de fundoscopia Figura-17.

Cento e quarenta e seis bebês (67,6%) tiveram avaliação pelo Bayley III e 70 (32,4%) pelo HINE. Dos avaliados pelo Bayley III (146), 87 (59,6%) bebês apresentaram resultado dentro da normalidade. Na avaliação da cognição, 132 dos 146 (90,4%) bebês, apresentaram resultado normal em relação a este domínio. Noventa e cinco bebês (65,1%), apresentaram avaliações normais para linguagem e 122 (83,6%) na avaliação motora. Apenas 5 bebês foram avaliados pelo Bayley III abaixo dos 12 meses. Entre 70 crianças avaliadas pelo HINE 67 (96%), apresentaram questionários de neurodesenvolvimento normais entre 7 e 24 meses. Todas as avaliações pelo HINE foram realizadas no segundo ano de vida. Tabela- 1

Realizamos exames oftalmológicos em 137 bebês e avaliações auditivas em 114 bebês. Dos que realizaram exame de fundo de olho, 137 bebês de 216, 128 (94%) tiveram seus exames dentro da normalidade. Dos bebês que foram avaliados para audição, 101(89%) apresentaram exames normais. Tabela-1

Entre os bebês com alterações foram identificados, 41 crianças com alteração no neurodesenvolvimento (entre 1 e 2 DP abaixo da média) para a idade. Entre as 18

crianças com pontuações bem abaixo da média (12%), 6 eram microcefálicas e 3 crianças apresentaram espectro autista. As últimas nasceram com fenótipo normal (ausência de microcefalia ou quaisquer outras alterações visíveis) e foram diagnosticadas com transtorno do espectro autista (TEA) aos 2 anos de vida

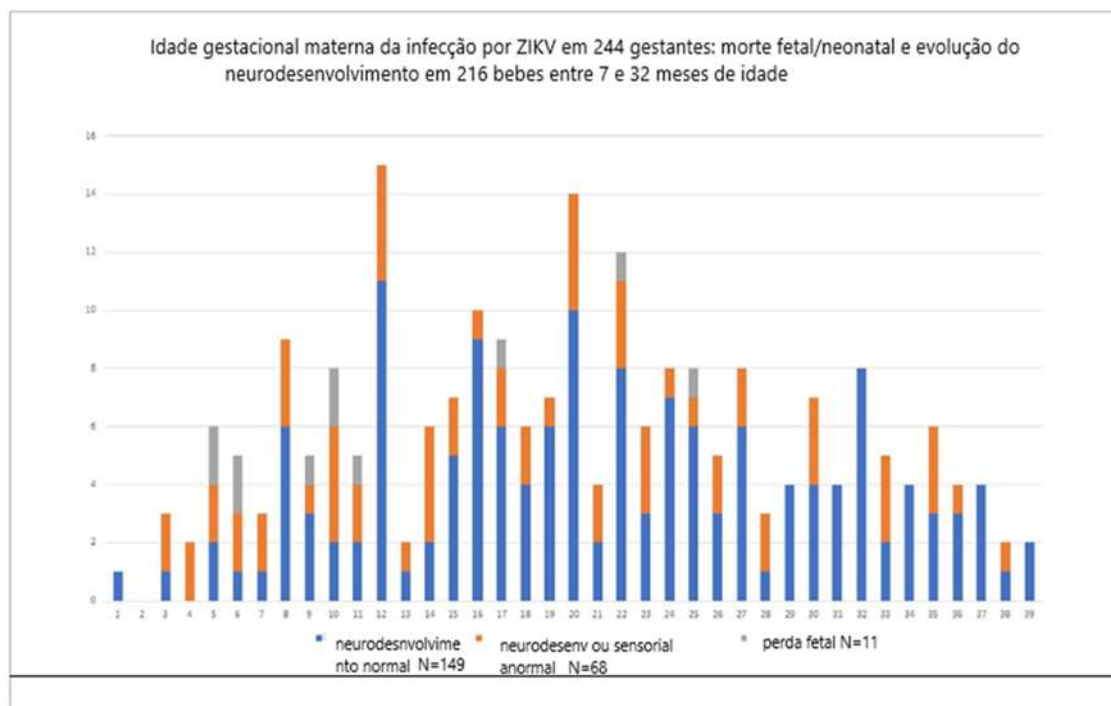
Dentre os domínios avaliados pelo Bayley, a linguagem foi o domínio mais afetado, com 23,3% das crianças mostrando resultados do Bayley III entre -1DP e 2 DP; 11,6% no desenvolvimento motor e 4,1% tiveram atraso no desenvolvimento cognitivo.

Apenas 10% das crianças apresentaram pontuações acima de 1 DP em qualquer domínio do Bayley III; nenhuma teve pontuação acima de 2 DP. Em contraste, 40% das crianças tiveram pontuações abaixo da média. (Figura- 19)

Critérios Bayley III: muito acima da média: > 2 DP, pontuação > 131; Acima da média: 1 a 2 DP, pontuação 116 a 130; média: -1 a 1 DP, pontuação 85 a 115; Abaixo da média: -1 a - 2 DP, pontuação 84 a 70; muito abaixo da média: <- 2 DP, pontuação <70.

Houve desfechos adversos dos bebês expostos ao ZIKV quando suas mães foram infectadas em qualquer idade gestacional: primeiro trimestre, segundo trimestre e terceiro trimestre. As perdas fetais ocorreram principalmente quando a mãe era infectada no primeiro trimestre da gestação e alterações no neurodesenvolvimento e sensoriais durante toda a gravidez. Figura- 18

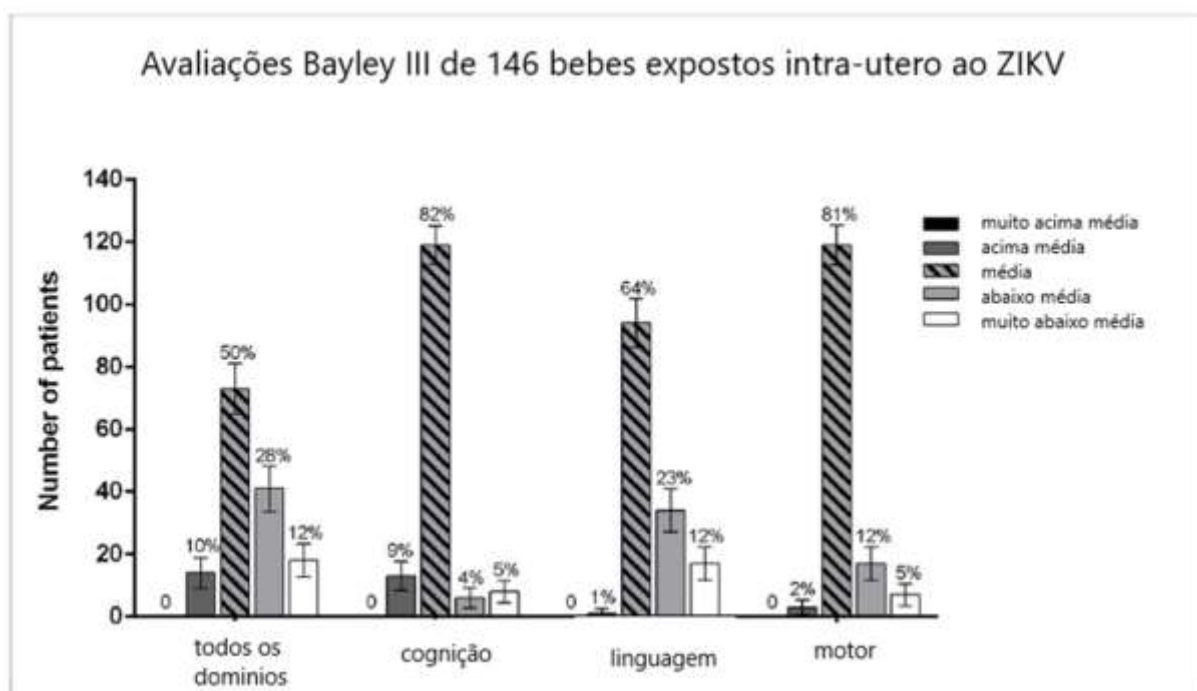
Uma perda fetal aconteceu em uma gestante infectada na vigésima quinta semana de gestação. Figura- 18



**Figura 18.** Idade Gestacional da infecção materna em semanas pelo vírus Zika em 244 gestantes. Gravidez adversa (perda fetal) e resultados do neurodesenvolvimento dos bebês por semana de infecção materna por ZIKV durante a gestação. Os desfechos infantis incluem neurodesenvolvimento abaixo da média/anormal e/ou anormalidades oculares e auditivas anormais entre 7 e 32 meses de idade.

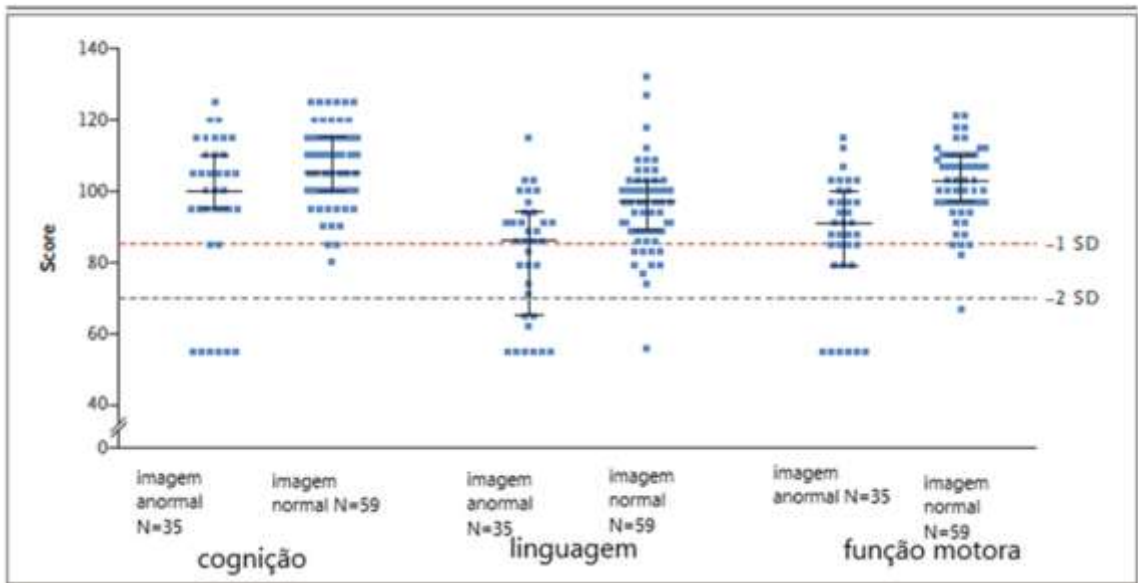
O exame de fundoscopia foi alterado em 9 de 137 crianças (7%) e incluía, atrofia de retina, hipoplasia macular, hipoplasia do nervo óptico ou palidez do nervo óptico. Treze de 114 crianças apresentaram algum déficit auditivo (12%) pelo BERA. Tabela-1.





**Figura 19.** Avaliações pelo Bayley-III em 146 crianças entre 7 a 32 meses.

Entre as 94 crianças que foram avaliadas por exame de imagem cerebral e pelo Bayley III, 59 delas apresentaram escores do Bayley III acima de 85 para todos os 3 domínios. Vinte e quatro crianças tiveram um ou mais dos domínios do Bayley III com pontuação entre 85 e 71 (1 a 2 DP abaixo da média) e 11 apresentaram pontuações de um ou mais domínios abaixo de 70 (2DP abaixo da média). Destas 94, 44 crianças apresentaram imagem craniana normal e Bayley acima de 85, 13 bebês com resultado de Bayley III entre 85 e 71, e 2 bebês com pontuação de 70 ou menos em um dos três domínios. Por outro lado, 15 crianças apresentaram exames de imagem craniana anormais com pontuações do Bayley III acima de 85, em 11 com pontuações entre 85 a 71, e em 9, abaixo de 70 pontos ou menos em um dos três domínios. Figura-20



**Figura 20.** Pontuações individuais do Bayley III em 12 a 18 meses de idade, relacionado com resultados dos exames de imagens.

## 6 DISCUSSÃO

Nas Américas, o Brasil foi o país do mundo que apresentou mais casos confirmados de microcefalia (82% dos casos confirmados) durante a epidemia do ZIKV.<sup>11</sup>

A região com maior coeficiente foi o Nordeste (139 casos por 100 mil nascidos vivos). Na região Sudeste a epidemia iniciou um pouco mais tardiamente e, de acordo com estudo realizado na época, o coeficiente de incidência foi de 25 casos por 100 mil nascidos vivos.<sup>28</sup>

Essa crise sanitária parece ter sido um processo gradual, e vários parecem ser os fatores: alterações climáticas, expansão da distribuição geográfica dos vetores, urbanização não controlada, adaptação do vírus a novos hospedeiros, falta de controle efetivo dos vetores, população suscetível; além de alterações genéticas do vírus (uma substituição de serina por asparagina na poliproteína do ZIKV aumentando assim sua infectividade), a análise evolutiva indica que esta variação de sequência ocorreu pouco antes do surto na Polinésia Francesa e foi mantida durante a propagação subsequente para as Américas.<sup>160</sup>

O surto do ZIKV também pode ser explicado com base na semelhança estrutural entre o ZIKV e os vírus da dengue. Os anticorpos produzidos contra esses flavivírus podem apresentar reação cruzada sem neutralização do vírus e também podem aumentar a infecção pelo ZIKV.<sup>118</sup>

Além das explicações anteriores para o surto de ZIKV listado acima, a infecção pelo ZIKV do vetor *A. aegypti* também pode causar neuroexcitação em mosquitos, o que pode contribuir para o aumento da atividade de locomoção diurna, aumentando as chances de transmissão para novos hospedeiros suscetíveis.<sup>161</sup>

Devido a possibilidade de alterações graves principalmente no SNC dos RN, dispersão acelerada da doença no país, o MS declarou Emergência de Saúde Pública Nacional em 11 de novembro de 2015 e assim vários órgãos como OPAS, OMS, institutos de pesquisas, se mobilizaram rapidamente reconhecendo a magnitude do evento, priorizando a pesquisa para o controle e a resposta a muitas perguntas.<sup>11</sup>

Nosso estudo começou no início da epidemia de Zika no Brasil com a pressão natural da urgência de investigação desta nova associação cujo desfecho, quando da

infecção vertical, poderia ser tão ou até mais grave do que a de outras infecções congênitas já bem conhecidas.

Como parte da fase inicial da resposta a emergência de saúde pública, o Laboratório de Doenças Febris Agudas (DFA) colaborou com o monitoramento de gestantes com sintomas sugestivos de infecção pelo ZIKV, realizando RT-qPCR na urina ou no soro, de setembro de 2015 a junho de 2016, e uma vez positivo, com o seu seguimento, dos fetos e bebês possivelmente infectados. Figura – 17 descreve o fluxo de inscrição.

Os bebês foram acompanhados desde o momento da infecção pré-natal materna até o segundo e terceiros anos de vida.

Hoje sabemos que a exposição ao ZIKV intraútero está associada há uma variedade de manifestações clínicas e essa coorte permitiu-nos estudar longitudinalmente a evolução natural de 216 bebês expostos ao ZIKV durante a gestação, seu desenvolvimento neurológico: motora, cognitiva e de linguagem; além de investigação de alterações visuais e auditivas e o impacto ao longo dos 3 primeiros anos de vida e seus diferentes desfechos possíveis ainda não demonstrados, mesmo quando ao nascimento não apresentavam anormalidades clínicas cerebrais óbvias.

Até esse momento o que já estava demonstrado é que o ZIKV poderia causar alterações graves nos bebês expostos ao ZIKV durante a gestação: microcefalia, hidrocefalia, artrogripose, entre outras; apenas a ponta do iceberg.

Somando-se ao descrito acima, realizamos exames de imagem, entre USTNF e/ou TCC e/ou RNM de crânio, durante o início da epidemia de ZIKV.

Cabe aqui ressaltar que as infecções virais verticais tendem a causar os mesmos tipos de neuropatologia e distúrbios do desenvolvimento em um continuum clínico.

Embora algumas características clássicas sejam bem específicas, estas infecções são quase clinicamente indistinguíveis por critérios de neuroimagem ou desfechos clínicos apenas. Desfechos clínicos graves como esses resultam da neuropatologia de sobreposição do vírus, por um lado, e do hospedeiro com resposta regulatória neuronal e gênica a infecções, por outro.

Hoje já está bem reconhecida que o ZIKV atravessa a barreira placentária e que é um agente teratogênico com tropismo pelas células progenitoras neuronais (NPCs); causa morte celular e interfere com a proliferação e migração neuronal no período de embriogênese, desenvolvimento cerebral.

Sabemos hoje que vários são os fatores que podem contribuir para o desfecho das infecções congênitas virais incluindo vírus, vetor, hospedeiro, médico, comunidade e ambiente, incluído no caso do ZIKV. Ainda não são claras as maneiras de interação destes fatores, que podem ser aditivas, sinérgicas ou antagônicas.

O Desfecho da infecção congênita pode incluir: bebês que não são afetados, bebês possivelmente não afetados, bebês provavelmente afetados ou bebês afetados.

Nossos bebês acompanhados desde o momento da infecção pré-natal da mãe até o segundo e terceiros anos de vida, nos permitiu a investigação de resultados do neurodesenvolvimento de longo prazo. A natureza prospectiva desta investigação nos permitiu quantificar o risco absoluto de microcefalia em bebês expostos ao ZIKV durante a gestação. Notamos 8 casos de MC (3,7%): 2 se desenvolveram no pós-natal e 2 se resolveram ao longo do tempo, um espontaneamente e o outro após cirurgia corretiva para craniossinostose. O ZIKV congênito foi associado à fusão precoce de suturas,<sup>72, 139, 146</sup> complementando o padrão de anomalias da síndrome congênita do ZIKV para médicos pediátricos.<sup>162</sup>

Em uma coorte de Jundiaí, SP, o risco relativo de microcefalia foi de 4,5% em bebês nascidos de mulheres ZIKV positivas. Esta taxa é consistente com outros estudos realizados em territórios Franceses, nas Américas e nos EUA.<sup>146</sup>

No estudo de Schüller-Faccini e colaboradores, ele descreve a microcefalia grave com pele excessiva do couro cabeludo em 11 casos (31%). Isso sugere uma lesão intrauterina aguda do cérebro, indicando atraso do crescimento cerebral, com continuidade do desenvolvimento da pele do couro cabeludo.<sup>3</sup> Quanto mais cedo a erupção ocorreu durante a gravidez, menor foi o perímetro cefálico médio no nascimento, sugerindo uma associação causal.

Estudos relatam haver uma relação entre o déficit de desenvolvimento neuromotor com o grau de microcefalia, assim quanto menor o perímetro cefálico, maior os danos cerebrais e suas repercussões.<sup>150</sup> Embora a microcefalia possa resultar de infecção em qualquer estágio da gestação, o risco é maior durante o primeiro trimestre.

A MC na infecção congênita pelo ZIKV parece ser mais grave do que na citomegalovirose e toxoplasmose congênitas. Na SZC observamos uma extensa

destruição cerebral causando o colapso dos ossos cranianos superiores sobre o osso occipital, empurrando para trás, causando esta malformação peculiar.

MC tem várias causas, mas mais comumente as infecções congênitas (TORCHS, HIV), agentes teratogênicos (metais pesados, álcool, radiações, anormalidades genéticas, restrição do crescimento intrauterino).

Todos os possíveis efeitos confundidores foram excluídos do nosso trabalho (TORCHS, álcool, HIV, fumo).

Dados epidemiológicos de vários países sugerem fortemente que a infecção viral durante o primeiro trimestre da gestação está associada ao maior risco de distúrbios graves do neurodesenvolvimento, incluindo microcefalia [25, 75] e outras anormalidades do desenvolvimento [76]. De forma consistente, o estudo populacional prospectivo de Coutinho et al. encontrou uma forte associação entre prognóstico infantil ruim quando as mães foram infectadas com o ZIKV durante o primeiro trimestre (<12 semanas) de gestação [16]. Esses achados foram corroborados por exames de neuroimagem, que mostraram uma taxa oito vezes maior de anormalidades cerebrais após a exposição no primeiro trimestre do que no final da gestação. O risco de anomalias fetais foi 14 vezes maior [76].

Encontramos dados similares com o descrito acima e demonstramos que pode haver desfechos adversos alterados em qualquer período da infecção materna durante a gestação. No entanto, quando a infecção acontece no primeiro trimestre, as lesões do SNC parecem ser mais graves, Figura- 19

Há um espectro de alterações clínicas de diferentes graus, com mais graves se seguindo à infecção vertical no primeiro e início do segundo trimestre de gestação, enquanto que as mais leves, possivelmente envolvendo danos estruturais mais discretos e risco de alterações neurofuncionais e neurossensoriais ocorreriam em decorrência da infecção vertical no terceiro trimestre.<sup>3,146</sup>

Geralmente, a placenta é mais permeável a passagem de agentes microbianos quanto mais tardia é a gestação, protegendo mais eficientemente o feto no início dessa. Por outro lado, após 20-25 semanas gestacionais, o feto é capaz de armar resposta imunológica específica contra o agente infectante<sup>2</sup> (apesar que ainda imatura), além de contar com a imunidade passiva humoral representada pela IgG materna cuja concentração se eleva e ativa progressivamente na segunda metade da gestação. De maneira geral, em consequência da combinação desses fatores, apesar de ser menos frequente a infecção fetal na primeira metade da gestação, maior é a

probabilidade de morte do embrião e infecção sintomática fetal, quando esta ocorre. Diferentemente, quanto mais próximo do termo gestacional, apesar de ser mais frequente o acometimento fetal, maior é a probabilidade de a infecção ser inaparente ou latente.

No estudo de Coutinho e col, de 92 fetos expostos durante o primeiro trimestre da gestação, 35,9% nasceram com algum defeito anormal, versus 2,8% e 1,9% no segundo e terceiro trimestre respectivamente.<sup>157</sup>

Ao longo do acompanhamento dos bebês, observamos crianças em diversas condições: RN com anormalidades de neuroimagem, com PC normal; com desenvolvimento de MC após o nascimento; e também com alterações em outros sistemas.

Nosso trabalho também pode demonstrar que bebês fenotipicamente normais ao nascimento, incluindo PC normal, podem apresentar alterações de neuroimagem e no desenvolvimento ao longo dos 36 meses de vida.<sup>133,134</sup> Um terço dos bebês teve resultados impactantes no desenvolvimento ao longo do tempo, independentemente do PC. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Hcini N; e col.<sup>12,13</sup>

Dezessete de 68 crianças (25%) com avaliações normais na primeira infância, apresentaram avaliações auditivas e oftalmológicas anormais e retardo no neurodesenvolvimento durante o acompanhamento, incluindo as três crianças que desenvolveram espectro autista e cujo diagnóstico foi feito ao longo do segundo ano de vida. Uma maior prevalência de autismo é referida também em outras infecções congênitas.<sup>130,151</sup> Foi postulado que a modulação neuroimune pode ter um papel na gênese do autismo em crianças expostas ao ZIKV durante a gestação.

Em uma coorte no Pará com 92 bebês expostos ao ZIKV na gestação, os pesquisadores notaram uma ocorrência significativa do Transtorno do Espectro Autista (TEA), reforçando o tropismo do vírus às células do SNC e mostrando de forma mais robusta a necessidade dessas crianças serem acompanhadas por um longo período de tempo mesmo na ausência de alterações estruturais ou de exames de imagens.<sup>148</sup>

Este dado está de acordo com Najeh e col que mostrou que aos 2 anos de idade, a infecção ao nascer ainda estava associada a um maior risco de comprometimento neurológico e / ou alteração neurossensorial 40% e aos 3 anos de vida, a suspeita de atraso no neurodesenvolvimento (<- 2DP) foi mais comum em 63,6% das crianças com teste positivo ao nascimento. Todos aqueles que testaram

positivo no nascimento e tinham anomalias cerebrais estruturais tinham evidências de atraso no desenvolvimento neurológico.<sup>90</sup>

Há mais evidências em apoio a clusters fenotípicos discretos, mas efeitos quantitativos sutis podem demorar mais para aparecer e conseqüentemente ser descrito.<sup>12,13</sup>

Por outro lado, metade das crianças com avaliações anormais do neurodesenvolvimento quando lactentes, tiveram avaliações normais no segundo e terceiro ano de vida. Isso inclui crianças com anormalidades funcionais precoces, com convulsões, hipotonia, bem como achados de neuroimagem também inespecíficas no período neonatal e infância precoce.

Um dos casos de microcefalia proporcional ao nascimento que regrediu com o tempo, foi resultante do CIR pela infecção placentária no qual ocorreu o fenômeno de “catch up” (processo de recuperação do crescimento dos RN que sofreram CIR é descrito um aumento da velocidade de crescimento) o outro, nascido com craniossinostose teve seu PC normalizado após cirurgia corretiva (escafocefalia). Todas as duas crianças apresentaram aos 36 meses de vida, neurodesenvolvimento normal.

Pudemos observar em nosso estudo alta frequência de desfechos anormais em relação ao neuro desenvolvimento (31%). Vários trabalhos também demonstram alta frequência de anormalidades do desenvolvimento psicomotor nessas crianças, independentemente da idade gestacional o qual a mãe foi infectada. Figura- 19

Das 146 crianças avaliadas pelo Bayley III (67,5%), 59 (40,4%) das crianças tiveram pontuações abaixo de 1 DP da média; em qualquer um dos três domínios. Quarenta e uma (28,1%) entre 1 e 2 DP e 18 (12,3%) abaixo de 2 DP. A linguagem foi o domínio mais afetado, seguido do motor e em seguida o cognitivo. Figura- 18

O estudo de Najeh e colaboradores identificou achados semelhantes aos nossos. Observaram nos testes de desenvolvimento, uma pontuação da avaliação abaixo de -2SD (zona de “referência”) em pelo menos um domínio em 63,6% das crianças infectadas, apesar do domínio cognitivo ser o mais afetado, seguido do domínio da linguagem e depois o motor em crianças com testes para infecção por ZIKV positivos ao nascimento.<sup>90</sup>

Nas crianças com alterações estruturais do SNC, todos os domínios podem estar afetados em diferentes graus de gravidade, isso irá depender do local e da extensão do dano ao SNC. No entanto, em crianças com anomalias cerebrais



estruturais, os sintomas neurológicos eram muito graves ao nascimento e ao longo dos 2 e 3 anos de vida, e por isso em algumas não conseguimos fazer os testes de avaliação do neurodesenvolvimento.

Quando comparamos os exames de imagens com o desempenho do neurodesenvolvimento das nossas crianças de 12 aos 18 meses, observamos uma associação significativa entre os resultados de exames de imagens cerebrais ao nascimento normais e maiores escores da avaliação pelo BayleyIII. Apesar da maioria das crianças com exame de imagem cerebral normal ter menor risco de atraso do neurodesenvolvimento, 2% das nossas crianças sem alterações ao exame radiológico, apresentou algum atraso do neurodesenvolvimento. Figura-20

Em 16% das crianças que apresentaram alguma alteração no exame de imagem cerebral, evoluíram com desenvolvimento normal. Figura- 20 O exame de neuroimagem realizado ao nascimento, portanto, não se mostrou útil na predição dos resultados de avaliação de neurodesenvolvimento dos 12 aos 18 meses de vida, possivelmente devido à inespecificidade dos achados neuroradiológicos nesse momento. Em um país onde a acessibilidade aos exames de imagem é bem restrita, esse é um resultado alentador já que nos orienta na priorização no acompanhamento clínico em detrimento do tecnológico, de maior custo e menor disponibilidade.

No entanto, exames de imagem podem nos ajudar no diagnóstico das alterações do SNC. A USTNF parece ser o melhor e mais utilizado método de triagem inicial para avaliar recém-nascidos expostos ao ZIKV, visto que fornece imagens em tempo real, é portátil e pode ser realizada a beira do leito. Esse método também tem baixo custo e não envolve radiação ionizante. Após o nascimento, quando resultados satisfatórios não podem ser obtidos por US (Fontanela anterior pequena com suturas fechadas prematuramente), a RMC ea TCC podem ser realizadas para melhorar a acurácia diagnóstica.

Em um estudo anterior não encontramos associações entre os achados anormais do bebê após exposição ao ZIKV intraútero e gravidade da doença materna durante a gravidez, mas é digno de nota lembrar que todas as crianças de nossa coorte nasceram de mulheres com infecção sintomática por ZIKV.<sup>80</sup> Assim como não há evidências que filhos de mulheres com infecção assintomática por ZIKV tenham desfechos melhores do que os de mulheres sintomáticas. Isto está de acordo com outros estudos como o de Honein MA et al onde defeitos congênitos foram relatados em 16 de 271 (6%; IC de 95%, 4% -9%) gestantes assintomáticas e 10 de 167 (6%;

IC de 95%, 3% -11%) gestantes sintomáticas. Assim o acompanhamento rigoroso de todas as gestantes em todo o pré-natal e crianças expostas durante pelo ZIKV deve ser garantido.<sup>158,159</sup>

Vinte e oito bebês foram prematuros (13%). As infecções pré-natais são a principal causa de 2,6 milhões de mortes neonatais em todo o mundo a cada ano. Além disso, essas infecções aumentam o risco de parto prematuro e contribuem com 11% do risco de paralisia cerebral.<sup>78</sup>

Dez crianças nasceram pequenos para idade gestacional (PIG). Apesar do PIG ser comumente utilizado como um indicador do retardo do crescimento intra-uterino (RCIU), não é possível determinar a partir de uma avaliação do tamanho fetal e idade gestacional se uma criança sofreu ou não RCIU, resultado de placentite crônica e, portanto, um diagnóstico de imagem na gestação.<sup>127</sup> Na nossa Coorte o número de óbitos foi maior quando a infecção materna ocorreu no primeiro trimestre da gestação. Figura- 18. A idade gestacional no momento da infecção pelo ZIKV foi um significativo preditor do neurodesenvolvimento. Infecção por ZIKV no final da gestação está menos associado com desfechos graves. Alterações nos exames de fundo de olho e audição não estavam associados com a idade gestacional da infecção.

Déficits visuais como anormalidades na região macular dos olhos, perda do reflexo da fóvea, atrofia macular, atrofia coriorretiniana, hipoplasia do nervo óptico, sinal de duplo anel, ocorreram em 7% dos lactentes e déficits auditivos em 12%, inferior à de estudos prévios que não foram prospectivos, e analisaram sobretudo crianças sindrômicas.<sup>63,72</sup>

Vários estudos clínicos relataram anomalias oculares, especificamente na retina e na coroide, mostrando que a invasão do ZIKV <sup>152,153</sup> de tecidos oftálmicos resultou em doenças adversas que incluem neurite óptica, atrofia coriorretiniana, pigmento circunscrito, colobomas de íris e subluxação de lente e cegueira em neonatos.<sup>154</sup>

Essas crianças também apresentaram alterações na audição como exposto acima (12%). Tabela-1

Outros trabalhos também demonstraram alterações sensoriais. Viscaino e col viram em seu estudo que oito (11%) de 75 crianças e a visão de 29 (39%) crianças foram afetadas pela síndrome congênita do Zika, conforme avaliado por entrevista geral e exame clínico. Durante o exame, as crianças apresentavam um limiar sensorial muito baixo para sons e toques, o que provocava contração muscular global,

sobressaltos e irritabilidade. Em três crianças, os estímulos sonoros provocaram crises tônicas reflexas.<sup>162</sup>

Nosso estudo de coorte apresenta algumas limitações e estas, em parte, foram relacionadas à natureza aflitiva da epidemia de microcefalia e a emergência de iniciar o quanto antes a investigação. Começamos o recrutamento e a coleta de dados em fichas/formulários, antes mesmo que os sistemas formais de gerenciamento de dados pudessem ser implementados.

Embora tenha tido o viés de seleção, já que todas as gestantes recrutadas apresentavam sintomatologia desta infecção, nossa coorte prospectiva de gestantes com infecção pelo ZIKV confirmada laboratorialmente foi a primeira evidência epidemiológica da associação de bebês expostos ao ZIKV durante a gestação com a microcefalia.<sup>8</sup>

Outra limitação é que, estimativas das frequências basais de anormalidades do neurodesenvolvimento entre crianças muito pequenas estão disponíveis apenas para algumas das anormalidades específicas; a falta de um grupo de comparação apropriado, de base populacional, limita a avaliação da magnitude da prevalência de anormalidades do desenvolvimento neurológico relatadas entre crianças nascidas de mães com infecção confirmada durante a gravidez. Como o ZIKV era altamente epidêmico no Rio de Janeiro, e como muitos são os desafios nos diagnósticos para a detecção da exposição pré-natal ao ZIKV (assintomáticos / não identificados infecção materna), não conseguimos estabelecer um grupo controle em que pudessemos demonstrar ausência de exposição pré-natal ao ZIKV, especialmente neste período de epidemia. A exposição ao ZIKV é extraordinariamente difícil de determinar se os pacientes não forem testados por PCR durante a infecção aguda.

Tivemos dificuldade no acompanhamento das crianças do nosso estudo. Foi baixa a adesão ao seguimento dos bebês aparentemente normais ao nascimento (a infecção pelo ZIKV pode ser um diagnóstico altamente estigmatizante), as crianças não compareceram a todas as consultas marcadas. Para muitas famílias, uma situação social complexa e precária muitas vezes os impedia de comparecer às consultas de acompanhamento, apesar de todos os esforços por eles realizados.

É possível que crianças com alterações estruturais diagnosticadas tenham recebido acompanhamento com maior frequência do que aquelas sem problemas de saúde identificados ao nascimento, o que pode levar a uma superestimação da porcentagem de crianças com problemas de saúde relacionados ao ZIKV.

Nem todas as crianças realizaram todas as modalidades de neuroimagem. Os neonatos com achados alterados no útero ou ao nascimento por US TNF, eram mais propensos a serem submetidos a avaliações adicionais com neuroimagem pós-natal para melhor acurácia das lesões.

Todos os nossos pacientes foram expostos ao ZIKV durante a gestação, porém nem todos eram infectados intraútero, mas não pudemos ter acesso a todos os resultados de RT-PCR e nem todos puderam ser realizados (suspensão pela pandemia do SARS- Cov 2). Sabemos de todas as dificuldades no diagnóstico em fetos e neonatos\_ foi demonstrado que a viremia é transitória no sangue, líquido amniótico e urina. Assim, a janela para detectar infecções congênitas usando a RT-PCR pode ser menor do que para outras infecções congênitas (ou seja, CMV). Em lactentes, as infecções congênitas pelo ZIKV são difíceis de confirmar retrospectivamente, devido à reação cruzada do teste sorológico e à possibilidade de infecção após o nascimento no contexto de exposição contínua, principalmente em área endêmica de arboviroses.<sup>90</sup>

Além disso, nossa proposta teria mais um objetivo que não pudemos realizar devido a pandemia. Devido ao isolamento social para enfrentamento da crise, os trabalhos foram impactados com a suspensão do seguimento das crianças, realizações dos exames e procedimentos.

E finalmente, o tamanho da nossa amostra não nos permitiu a investigação de sequelas raras e o tempo de acompanhamento foi pequeno para avaliações do cognitivo em idade mais avançada. Soma-se a isso, nossa coorte foi restrita ao estado do RJ e, portanto, não pode inferir a compreensão das fontes de heterogeneidade geográficas das populações em todo o território brasileiro.

Alguns autores afirmam que o perfil apresentado das famílias comprometidas evidencia as desigualdades socioeconômicas e geográficas.<sup>30</sup>

## **7 CONCLUSÃO / PERSPECTIVAS**

O risco absoluto de atraso do desenvolvimento psicomotor foi de 28,7%, prematuridade de 13%, microcefalia 3,7%, alteração de audição 12% e alteração ocular em 7%. Todas essas alterações fazem parte dos sinais e sintomas da Síndrome Congênita do Zika Virus.

As crianças com microcefalia apresentaram atraso do neurodesenvolvimento grave, quanto menor o perímetro cefálico maior os danos cerebrais. As outras alterações como hidrocefalia, calcificações intracranianas, alterações oculares ou auditivas, podem ser acompanhadas de atraso no neurodesenvolvimento grave, moderado ou leve. Somando-se ao atraso do DPM, outras repercussões clínicas como convulsões de difícil controle, alteração da deglutição, autismo, excitabilidade extrema, pneumonias de repetição devido as inúmeras microbroncoaspirações foram observadas nesses bebês.

Como pudemos observar os exames de imagem embora nos ajude na avaliação dos bebês expostos ao ZIKV durante a gestação não são essenciais para o diagnóstico de atraso do desenvolvimento neuromotor nesta população.

O adequado acompanhamento multidisciplinar prospectivo desses pacientes é necessário e visa compreender a história natural desse novo agente e proporcionar um melhor desenvolvimento e qualidade de vida para eles e seus familiares.

Nos resta saber se as repercussões futuras, como as dificuldades de aprendizagem, perda auditiva ou outros problemas não diagnosticados, podem afetar as crianças expostas na gestação durante a idade escolar. Para isso achamos que o seguimento dessas crianças deve ser estender até os 7 anos.

É essencial que os profissionais de saúde que cuidam de crianças tenham acesso a informações sobre a exposição materna à infecção pelo vírus Zika durante

a gravidez. Isso melhorará a identificação de crianças nascidas de mães com evidências laboratoriais de infecção confirmada ou possível pelo vírus Zika durante a gravidez, para que possam receber avaliações pós-natais recomendadas.

Um diagnóstico laboratorial com acurácia adequada para o diagnóstico de infecção dos bebês expostos na gestação é fundamental para a planejamento e otimização do seguimento dos lactentes e crianças de fato com risco de desenvolvimento da síndrome congênita.

Temos toda uma geração de crianças que nasceram durante e logo após o primeiro surto e que estão sem diagnóstico, podendo apresentar condições menos conhecidas e também mais tardias relacionadas à infecção. Não sabemos o quantitativo dessas crianças, nem a gravidade da sua doença e muito menos se estão tendo atendimento/tratamento pela saúde pública.

Diante de todo o exposto, percebeu-se uma importante associação do ZIKV com atrasos motores graves e prejuízos funcionais, sendo observada a necessidade de uma estimulação imediata buscando alcançar os marcos do DNPM além de um acompanhamento multidisciplinar visando aperfeiçoar as suas aquisições. Apesar da redução do número de casos notificados de ZIKV no Brasil os impactos sociais e econômicos são de caráter duradouro. Faz-se necessário que além do controle da transmissão deste vírus, os órgãos públicos realizem investimentos em serviços de saúde pública, com intuito de conscientizar a população sobre as medidas a serem tomadas para prevenção de possíveis novos surtos.

À medida em que o espectro fenotípico clínico da síndrome vai se delineando melhor com os resultados de trabalhos já publicados e em curso, o interesse de pesquisa tem se voltado a aspectos específicos da SZC. Isso inclui aplicações de resultados epidemiológicos (especialmente de estudos de coorte e caso-controle em andamento), aprimoramento de métodos diagnósticos clínicos e laboratoriais (especialmente métodos de diagnóstico rápido, imunológicos, sorológicos e para uso point-of-care), identificação de biomarcadores de gravidade, letalidade e sequelas, estratificação de riscos e gravidade clínica, parâmetros não invasivos de detecção e monitoração de alterações, medidas preventivas e de controle viral e vetorial, abordagens terapêuticas iniciais e das complicações e aspectos éticos envolvidos com pesquisa e assistência aos portadores e familiares. Redes de colaboração em pesquisa, geralmente capitaneadas por grupos brasileiros, têm desenvolvido diversos estudos multicêntricos e multidisciplinares com objetivos distintos, mas

complementares, úteis à compreensão e intervenção neste importante problema de saúde pública e infantil.

## **8 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Eu, Patricia Brasil, pesquisadora responsável pela pesquisa Estudo da história natural da infecção por ZIKV em uma Coorte Infantil no Rio de Janeiro, estou fazendo um convite para você participar como voluntário desta pesquisa.

Eu, \_\_\_\_\_ mãe de \_\_\_\_\_ fui convidado(a) a participar deste estudo que irá investigar e estudar a infecção do vírus da Zika em bebês expostos durante a gestação. Fui convidada, pois meu filho teve suspeita de exposição ao ZIKV na minha gestação. Esse estudo busca investigar se meu filho foi realmente infectado pelo vírus durante a gestação ou no período perinatal e seus possíveis desfechos clínicos.

Sei que o objetivo deste trabalho será investigar e conhecer melhor o quadro clínico desta infecção. Estou ciente que não há um tratamento específico e que apesar disso, preciso consentir a coleta de 2 a 5 ml de sangue e urina para exames.

Meu filho (a) será acompanhado até 2 anos por consultas de pediatras e outros profissionais de saúde no 15º dia de vida, 1, 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses de vida e poderei, se assim achar necessário, solicitar consulta extra a qualquer momento. Nas consultas irão submeter a perguntas relacionadas à saúde física e desenvolvimento psicomotor, avaliação clínica e sempre que necessário será encaminhado especialidades médicas que se fizerem necessárias.

Permito a coleta sanguínea de meu (a) filho (a). O sangue será coletado por punção (agulha descartável) venosa por profissional de saúde especializado. Amostras de lágrimas, saliva, urina também poderá ser coletada enquanto ele(a) estiver em

acompanhamento pela equipe de pesquisa. A minha participação e a do meu filho (a) não é obrigatória e poderei em qualquer momento retirar meu consentimento. Minha recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou atendimento nas unidades de Saúde.

Permito que investiguem a presença de marcadores sorológicos de dengue, outras arboviroses como ZIKA e Chicungunhya e se necessário, outras doenças virais.

Reconheço que os riscos relacionados com a participação do meu filho (a) são mínimos, sendo relacionados a coleta de sangue (desconforto, mancha roxa).

Autorizo, portanto, os profissionais do INI/FIOCRUZ a utilizar amostras do sangue do meu filho (a), lágrima, saliva, urina, fezes para realização de pesquisa, garantindo a privacidade dos resultados os quais serão fornecidos a mim individualmente, notificados somente às Instituições de Saúde Pública. Os dados não serão divulgados de forma a não possibilitar sua identificação e estarão protegidos por códigos e senhas de acesso ao banco.

As informações obtidas através desta pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo quanto à sua participação.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço institucional da pesquisadora principal, podendo tirar suas dúvidas sobre a pesquisa e sua participação, agora ou em qualquer momento.

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo participar.



## 9 Bibliografia

- 1- Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde – Brasil. Boletim Epidemiológico. Brasília: ministry of Health, Brazil, 2016. Oliveira WK de, Coelho GE, França GVA de. Boletim Epidemiológico - Situação epidemiológica de ocorrência de microcefalias no Brasil, 2015. Bol Epidemiológico da SVS/MS [Internet]. 2015;46(34):1–3. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/19/Microcefalia-bol-final.pdf>
- 2- Musso D, Gluber J D. Zika Virus. Clin Microbiol Ver 2016 Jul;29(3):487-524. doi: 10.1128/CMR.00072-15.
- 3- Schuler-Faccini L, Ribeiro EM, Feitosa IM, Horovitz DD, Cavalcanti DP, Pessoa A, et al. Possible association between Zika Virus Infection and Microcephaly - Brazil, 2015. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2016 Jan 29;65(3):59-62 5.
- 4- Orioli IM, Dolk H, Lopez-Camelo JS, Mattos D, Poletta FA, Dutra MG, et al. Pical profile of microcephaly in South America pre-Zika, 2005-14: prevalence and case-control study. BMJ. 2017 Nov 21;359: j5018.
- 5-Gulland, Anne. “Zika Virus Is a Global Public Health Emergency, Declares WHO”. BMJ, 2 de fevereiro de 2016, i657. <https://doi.org/10.1136/bmj.i657>.
- 6- França V A G, Schuler-Faccini L, Oliveira W K, et al. Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. The Lancet. June 29, 2016. VOL: 388, ISSUE 10047, P891-897. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30902-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30902-3).
- 7-Pan American Health Organization 2017 Jun 09, congenital Zika Virus Infection Beyond Neonatal Microcephaly. JAMA Neurol. [internet] 2016, 73, 1407-393 16, doi: 0.1001/jamaneurol.2016.3720.
- 8-Wang, J.-N., & Ling, F. (2016). Zika Virus Infection and Microcephaly: Evidence for a Causal Link. International Journal of Environmental Research and Public Health, 13(10), 1031. Doi:10.3390/ijerph13101031
- 9- Russell K, Oliver SE, Lewis L, Barfield WD, Cragan J, Meaney-Delman D, et al. Update: Interim Guidance for the Evaluation and Management of Infants with Possible Congenital Zika Virus Infection - United States, August 2016. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2016 Aug 26;65(33):870-878.).

- 10-Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Protocolo de vigilância e resposta à ocorrência de microcefalia e/ou alterações do sistema nervoso central (SNC), Brasília: Ministério da Saúde, 2015; pp. 55.
- 11- Garcia L P. Epidemia do Virus Zika e microcefalia no Brasil: Emergencia, Evolução e Enfrentamento. Brasília, fevereiro de 2018.
- 12-Brasil P, Pereira JP Jr, Moreira ME, Ribeiro Nogueira RM, Damasceno L, et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med*. 2016 Dec 15;375(24):2321-2334.
- 13- Tirado V, Lopes KD, Balogun OO, Takemoto Y, Swa T, Dagvadorj A, Nagata C, Morisaki N, Menendez C, Ota E, Mori R, Oladapo OT. Zika virus infection in pregnancy: a systematic review of disease course and complications. *Reprod Health*. 2017 Feb 28;14(1):28.
- 14-Wakimoto M, et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med*. 2016 Dec 15;375(24):2321-2334.
- 15- Gharbaran R, Somenarain L. Putative Cellular and Molecular Roles of Zika Virus in Fetal and Pediatric Neuropathologies. *Pediatr Dev Pathol*. Jan-Feb 2019;22(1):5-21. doi: 10.1177/1093526618790742
- 16-Judkins AR, Martinez D, Ferreira P, Dobyns WB, Golden JA. Polymicrogyria includes fusion of the molecular layer and decreased neuronal populations but normal cortical laminar organization. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2011 Jun;70(6):438-43.
- 17-Araujo AQ, Silva MT, Araujo AP. Zika virus-associated neurological disorders: a review. *Brain*. 2016 Aug;139(Pt 8):2122-30.
- 18-Duca LM, Beckham JD, Tyler KL, Pastula DM. Zika Virus Disease and Associated Neurologic Complications. *Curr Infect Dis Rep*. 2017 Jan;19(1):4.
- 19-Van den Pol AN, Mao G, Yang Y, Ornaghi S, Davis JN. Zika Virus Targeting in the Developing Brain. *J Neurosci*. 2017 Feb 22;37(8):2161-2175.
- 20-Da Silva Pone MV, Moura Pone S, Araujo Zin A, Barros Mendes PH, Senra Aibe M, Barroso de Aguiar E, de Oliveira Gomes da Silva T. Zika virus infection in children: epidemiology and clinical manifestations. *Childs Nerv Syst*. 2018 Jan;34(1):63-71.
- 21-França G V A, Schuler-Faccini L, Oliveira W K, Henriques C M P, Carmo E H, Pede V D, Nunes M L. Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. *Lancet* 2016; 388: 891–97

Published Online June 29, 2016 [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30902-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30902-3)

22- Castro M C, Serruya S, Silveira M F, Barros F C, Victora C G. Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation *Lancet* .27 de agosto de 2016;388(10047):891-7. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30902-3. Epub 2016 29 de junho.

23-Garcez PP, Nascimento JM, de Vasconcelos JM, Madeiro da Costa R, Delvecchio R, Trindade P, et al. Zika virus disrupts molecular fingerprinting of human neurospheres. *Sci Rep*. 2017 Jan 23; 7:40780.

24- Barrows and Xu et al. Zika and Other Emerging Viruses: Aiming at the Right Target Cell Host & *Microbe* 20, October 12, 2016.

25-Plourde, A R., e Evan M. B. “A Literature Review of Zika Virus”. *Emerging Infectious Diseases* 22, no 7 (julho de 2016): 1185–92. <https://doi.org/10.3201/eid2207.151990>.

26- Pan American Health Organization: Regional Zika epidemiological update (Americas): October 6, 2016. [http://www.paho.org/hq/index.php?Option=com\\_content&id=11599&Itemid=41691](http://www.paho.org/hq/index.php?Option=com_content&id=11599&Itemid=41691).

27- Pan American Health Organization: Zika cases and congenital syndrome associated with Zika virus reported by countries and territories in the Americas, 2015–2016, cumulative cases. [http://www.paho.org/hq/index.php?Option=com\\_docman&task=doc\\_view&Itemid=270&gid=36555&lang=em](http://www.paho.org/hq/index.php?Option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=36555&lang=em)

28- Samarasekera U, Triunfol M. Concern over Zika virus grips the world. *Lancet* 2016 Feb 6;387(10018):521-524. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00257-9.

29- Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos e resposta a ocorrência de microcefalia relacionada a infecção pelo ZIKV (Dez 2015). Protocolo de vigilância e resposta – versão 09 -dez 2015

30- Brasil P, Calvet GA, Siqueira AM, et al. Zika vírus outbreak in rio de janeiro, brazil: clinical characterization, epidemiological and virological aspects. *Plos Negl Trop Dis*. 2016 Apr 12;10(4): e0004636. Doi: 10. 1371/journal. Pntd.0004636.

31- **Marinho, F; Araujo, VEM; et al. Microcefalia no Brasil: prevalência e caracterização dos casos a partir do Sistema de Informações sobre Nascidos vivos (SINASC), 2000-2015. *Epidemiol. Serv. Saude* 2016, 1-12. DOI: 10.5123/S1679-49742016000400004.**

- 32- **Ministerio da Saude. Informe epidemiológico n 8- semana epidemiológica 01/2016. Monitoramento de casos de microcefalias no Brasil.**
- 33- **WHO: Situation Report, Zika virus microcephaly Guillain-Barre syndrome. October 13/2016.**
- 34- **Baez, C F; Barel. Analysis of worldwide sequence mutations in Zika virus proteins E, NS1, NS3 and NS5 from a structural point of view. Mol Biosyst. 2016 Dec 20;13(1):122-131. doi: 10.1039/c6mb00645k.**
- 35- **Faye et al; Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. Published: January 9, 2014  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002636>**
- 36- **Muller, DA; Young, PR. The flavivirus NS1: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. Review Antiviral Res. 2013 May;98(2):192-208. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.03.008.**
- 37- **Ming et al.; 2016. Zika virus: an emerging flavivirus. Journal of microbiology, 55 (3), 204-219**
- 38- **Barzon, L, Trevisan M, et al. Zika virus: From pathogenesis to Disease control. Review FEMS Microbiol Lett. 2016 Sep;363(18): fnw202. doi: 10.1093/femsle/fnw202. Epub 2016 Aug 21.**
- 39- **Blitvich BJ, Firth AE. A Review of Flaviviruses that Have No Known Arthropod Vector. Viruses. 2017; 9(6): 154.**
- 40- **Hercik, K., Brynda, J., et al. Structural basis of Zika virus methyltransferase inhibition by sinefungin. Arch Virol. 2017 Jul;162(7):2091-2096. doi: 10.1007/s00705-017-3345-x. Epub 2017 Mar 29.**
- 41- **Aguilera-Pesantes, D., Mendez, MA. Structure and sequence based functional annotation of Zika virus NS2b protein: computational insights. Biochemical and Biophysical Research Communications Volume 492, Issue 4, 28 October 2017, Pages 659-667**
- 42- **Yuang, Ling. A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. Science. 2017 Nov 17;358(6365):933-936. doi: 10.1126/science. aam7120. Epub 2017 Sep 28.**
- 43- **Hamel, R., et al. Zika virus: epidemiology, clinical features and host-virus interactions. Review Microbes Infect. Jul-Aug 2016;18(7-8):441-9. doi: 10.1016/j.micinf.2016.03.009.**

- 44- Munjal, A., et al. Advances in developing therapies to combat Zika virus: current knowledge and future perspectives. *Front Microbiol.* 2017; 8: 1469. Published online 2017 Aug 3. doi: 10.3389/fmicb.2017.01469
- 45- Kauffman EB, Kramer LD. Zika Virus Mosquito Vectors: Competence, Biology and Vector Control. *The Journal of infectious diseases* 2017; 216(suppl 16 10): S976-90.)
- 46- Saiz, et al. Zika Virus: Transmission, Detection, Control, and Prevention. *Front. Microbiol.*, 03 February 2017 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00110>
- 47- Fauci, AS., et al. Zika virus in the Américas - Yet Another Arbovirus Threat. February 18, 2016 *N Engl J Med* 2016; 374:601-604 DOI: 10.1056/NEJMp1600297
- 48- Petersen E, Wilson ME, Touch S, McCloskey B, Mwaba P, Bates M, et al. Unexpected and Rapid Spread of Zika Virus in The Américas - Implications for Public Health Preparedness for Mass Gatherings at the 2016 Brazil Olympic Games. *Int J Infect Dis* 2016; 44:11-15.
- 49- Musso D., Zika virus transmission from French Polynesia to Brazil.2015, *Emerging Infectious Disease*, 21(10), 1887-1889.
- 50- Zhang, Q., Sun Kaiyuan, et al. Spread of Zika virus in the Americas, *Proceedings of the National Academy of sciences* 114, no 22.
- 51- Perera, R., Khalig, M., et al. Closing the door on flaviviruses: Entry as a target for antiviral drug design. *Antiviral Research*, 80 (1), 11-22.
- 52- Sharma, A., & Lal, SK.2017. Zika virus: Transmission, detection, control and prevention. *Frontiers in microbiology*, 8 fev, 1-14.
- 53- Foy BD, Kobylinski KC, et al. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 880-882.
- 54- Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K, et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro Surveill* 2014; 19:14-16
- 55- Calvet G, Aguiar RS, et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluido f fetus with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis* 2016; 16: 653-660.
- 56- Yun, SI, &Young-Min L. Zika Virus: na emerging Falvivirus. *Jornal of microbiology* 55, n 3. 2017.: 204-19.

- 57- Brogueira, P., & Miranda, AC. Zika Virus: Emergence of an Old Known. *Revista da sociedade Portuguesa de med interna*, 146-153.
- 58- Hamer, DH, Wilson, ME, et al. Epidemiology, prevetion and potential future treatments of sexually transmitted zika vírus infection. *Current infects dis rep*, 19 (4).
- 59- Grischott, F., Puhan, M., et al. non-vector-borne transmission of zika virus: a systematic review. *Trav med and infec dis*,2016, 14 (4), 313-330.
- 60- Musso, D., Roche, C., et al. Detection of zika virus in saliva. 2015. *Jornal of clinical virology*, 68: 53-55.
- 61- Cavalcanti MG, Cabral- Castro MJ, Gonçalves JLS, Santana LS, Pimenta ES, Peralta JM. Zika Virus Shedding in human milk during lactation: na unlikely source of infection? *International Journal of infectious diseases IJID: official publication of the international Society for infection disease* 2017;57: 70-2.
- 62- Reusken C, Pas S, Geurtsvankessel C, et al. Longitudinal follow-up of a traveller returning from Barbados to the Netherlands with Zika virus disease, March 2016. *une 2016European Communicable Disease Bulletin* 21(23)  
DOI:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.23.30251
- 63- Besnard, M., Lastere, S., et al. Evidence of Perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and february 2014. *Euro Surveill* 2014; 19: 20751
- 64- Hoen B., Schaub, B., et al. Pregnancy outcomes after ZIKV Infection in French Territories in the Americas. *N Eng Journ of Med* 378, n 11, 2018: 985- 94.
- 65- Pomar, L., Vouga, M., et al. Maternal-fetal transmission na adverse perinatal outcomes in pregnant women infected with zika virus: prospective cohort study in french guiana. *BMJ*, 2018.
- 66- Albuquerque et al. Epidemia de microcefalia e virus Zika: construção do conhecimento em epidemiologia. *Cad de Saude Publica* 2018; 34 (P): e 00069018.
- 67- Cvorov A, Tatomer D, Tee MK, Zogovic T, et al. Selective estrogen receptor-beta agonists repress transcription of proinflammatory genes. *Journal of Immunology (Baltimore, MD: 1950)* 2008; 180(1): 630-6).
- 68- Athena P. Kourtis, M.D., Ph.D., Jennifer S. Read, M.D., M.P.H., and Denise J. Jamieson, M.D., M.P.H. Pregnancy and Infection. *N Engl J Med* 2014; 370:2211-2218. DOI: 10.1056/NEJMra1213566

- 69- A influência da gravidez na imunidade sistêmica. Pazos M, Sperling RS, Moran TM, Kraus TA *Immunol Res.* Dezembro de 2012; 54 (1-3): 254-61.
- 70- O sistema imunológico na gravidez: uma complexidade única. Mor G, Cardenas I *Am J Reprod Immunol.* Junho de 2010; 63 (6): 425-33.54
- 71- Koga K, Cardenas I, Aldo P, et al. Activation of TLR3 in the trophoblast is associated with preterm delivery. *Am J Reprod Immunol.* 2009; 61: 196–212.
- 72- Cardenas I, Aldo P, Koga K, Means R, Lang SH, Mor G. Viral infection of the placenta leads to fetal inflammation and sensitization to bacterial products predisposing to preterm labor. *Am J Reprod Immunol.* 2009; 61: 397.
- 73- Nogueira et al. Adverse birth outcomes associated with Zika virus exposure during pregnancy in são jose do rio preto, brazil. *Clin microbiol. Infect.* 2018. 24(6): 646-652 10. 1016/j.cmi.2017.11.004.
- 74- Halai UA., Nielsen-saines K., et al. Maternal Zika virus disease severity, vrus load, prior dengue antibodies, and their relationship to birth outcomes. *Clin infect dis* 2017; 65: 877-833.
- 75- Abhay P. S. Rathore<sup>1, \*</sup> and Ashley L. St. John, // Robbiani DF, Olsen PC, Costa F., Wang Q., Oliveira TY, Nery N., Jr., et al. (Cross-Reactive Immunity Among Flaviviruses Risk of Zika microcephaly correlates with features of maternal antibodies. *J Exp Med.* (2019) 216:2302–15. 10.1084/jem.20191061 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google
- 76- Brown A J, Gursewak S; Dengue Virus Immunity. 2019 Mar 19;50(3):751-762.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2019.01.005. Epub 2019 Feb 5. Immunity increases Zika Virus-induced damage during pregnancy, 2019).
- 77- Brasil P., Pereira J., Moreira ME., et al. Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro. *The N Engl Jour of Med* 375, 2016, 24: 2321-34.
- 78- Cherry JD. Feign and Cherry's textbook of pediatric Infectious Disease 23, n 7, 2016: 1185-92.
- 79- Carolyn B Coyne 1, Helen M Lazear. Zika virus - reigniting the TORCH. *Nat Rev Microbiol.* 2016 Nov;14(11):707-715. doi: 10.1038/nrmicro.2016.
- 80- França GVA., Schuler-Faucini L., et al. Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. *Lancet* 2016; 388:891-97.
- 81- Eickmann, SH., Carvalho MDC., et al; Zika virus congenital syndrome . *Cad Saude Publica* 2016, 32, e00047716.

- 82- Woods CG. Human microcephaly. *Current Opinion Neurobiology* 2004; 14: 112-117.
- 83- Lazear HM, Diamond MS. Zika Virus: New Clinical Syndromes and Its Emergence in the Western Hemisphere. *J Virol* 2016; 90: 4864–4875. [PubMed] [Google Scholar]
- 84- Vogel G. Evidências crescem para o vírus Zika como perigo de gravidez. *Science* 2016; 351: 1123–1124. [PubMed] [Google Scholar]
- 85- Hengli Tang, Christy Hammack et al; Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. 2016 May 5;18(5):587-90. doi: 10.1016/j.stem.2016.02.016. Epub 2016 Mar 4.
- 86- Hongda Li, Laura Saucedo-Cuevas, Jose A. Regla-Nava, Alexey V. Terskikh, Sujan Shresta, Joseph G. Gleeson. Zika Virus Infects Neural Progenitors in the Adult Mouse Brain and Alters Proliferation. *Cell Stem Cell* 19, 593–598 November 3, 2016<sup>a</sup> 2016 Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2016.08.005>
- 87- Patricia P., Correia G., et al, Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. ZIKA VIRUS IMPAIRS GROWTH IN HUMAN NEUROSPHERES AND BRAIN ORGANIDS. *Science* 13 May 2016 Vol 352, Issue 6287 pp. 816-818 DOI: 10.1126/science. aaf6116
- 88- Bayless et al., 2016, *Cell Host & Microbe* 20, 423–428 October 12, 2016<sup>a</sup> 2016 Elsevier Inc. Zika Virus Infection Induces Cranial Neural Crest Cells to Produce Cytokines at Levels Detrimental for Neurogenesis <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.09.006>
- 89- Ki-Jun Yoon 1, Guang Song., et al. Zika-Virus-Encoded NS2A Disrupts Mammalian Cortical Neurogenesis by Degrading Adherens Junction Proteins. *Cell Stem Cell*. 2017 Sep 7;21(3):349-358.e6. doi: 10.1016/j.stem.2017.07.014. Epub 2017 Aug 17.
- 90- Najeh Hcini, Yaovi Kugbe, Zo Hasina Linah Rafalimanana, Véronique Lambert, Meredith Mathieu, Gabriel Carlos, David Baud, Alice Panchaud e Léo Pomar. Association between births and births confirmed by Zika and births up to 3 years old. *Comunicações da Natureza* volume 12, Número do artigo: 3270 (2021).
- 91- Jonathan J. Miner and Michael S. Diamond. Zika virus pathogenesis and tissue tropism. *Cell Host Microbe*. 2017 Feb 8; 21(2): 134–142.



doi: 10.1016/j.chom.2017.01.004

92- Faizan, MD., Mohd A., et al. Zika virus induced microcephaly and its possible molecular mechanism. *Intervirology* 59, 3 2016: 152-158

93- Anna B. Kawiecki, Rebecca C. Christofferson. Zika Virus–Induced. Antibody Response Enhances Dengue Virus Serotype Replication In Vitro. *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 214, Issue 9, 2016, 1357–1360, <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw377>

94- Lalita Priyamvada, Kendra M Quicke, et al. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016 Jul 12;113(28):7852-7. doi: 10.1073/pnas.1607931113. Epub 2016 Jun 27.

95- Bianca Guedes Ribeiro, Heron Werner, et al. Central Nervous System Effects of Intrauterine Zika Virus Infection: A Pictorial Review. *RadioGraphics* Vol. 37, No. 6. <https://doi.org/10.1148/rg.2017170023>

96- Aragão MFV., Van der Liden V., et al. Clinical features and neuroimaging findings in presumed Zika virus related congenital infection and microcephaly: retrospective case series study. *BMJ* 2016; 353:1901.

97- Ventura CV., Maia M., et al. Ophthalmological findings in infants with microcephaly and presumed intra-uterus Zika virus infection. *Arq Bras Oftalmol* 2016; 79: 1-3

98- Chimelli, Leila, Melo ASO., et al. The spectrum of Neuropathological Changes Association with Congenital Zika Virus infection. *Acta Neuropathol* . 2017 Jun;133(6):983-999. doi: 10.1007/s00401-017-1699-5. Epub 2017 Mar 22.

99- Rémi N Charrel, Isabelle Leparç-Goffart, et al. Background review for diagnostic test development for Zika virus infection. *World Health Organ.* 2016 Aug 1;94(8):574-584D. doi: 10.2471/BLT.16.171207

100- Victor M Corman, Andrea Rasche, et al. Assay optimization for molecular detection of Zika virus. *World Health Organ.* 2016 Dec 1; 94(12): 880–892. Prepublished online 2016 Apr 19. doi: 10.2471/BLT.16.175950

101- Tappe D., Perez-Giron JV., et al. Cytokine Kinetics of Zika virus infected patients from acute to reconvalescent phase. *Med Microbiol Immunol.* 2016 Jun;205(3):269-73. doi: 10.1007/s00430-015-0445-7.

- 102- Hinohara K., Kutsuna S., et al. Zika fever imported from Thailand to Japan, and diagnosed by PCR, in the urines. *Review J Travel Med.* 2016 Jan 18;23(1): tav011. doi: 10.1093/jtm/tav011. Print 2016 Jan.
- 103- Nogueira RM, Miagostovich MP., et al. Levels of IgM antibodies Against dengue virus in Rio de Janeiro, Brazil. *Res Virol* 143(6): 423
- 104- Busch MP., Kleinman SH., et al. Virus and antibody in acute west Nile virus infection. *J Infect Dis*; 198(7): 984-93.
- 105- Adebajo T., Cato S., et al. Update: interim guidance for diagnosis, evaluation and management of infants with possible Congenital Zika virus infection- EUA, 2017. *MMWR*, 41: 1089-1098
- 106- Calisher CH., Karabatsos N., et al. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol* 1989; 70: 37-43
- 107- Lanciotti RS., Kosoy OL., 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.
- 108- Yeong Hoon Kim, Jihoo Lee. Development of a Rapid Diagnostic Test Kit to Detect IgG/IgM Antibody against Zika Virus Using Monoclonal Antibodies to the Envelope and Non-structural Protein 1 of the Virus. *Korean J Parasitol.* 2018 Feb;56(1):61-70. doi: 10.3347/kjp.2018.56.1.61.
- 109- Shan C, Xie X, Ren P, et al. A rapid ZIKA diagnostic assay to measure neutralizing Antibodies in Patients. *EBio Medicine* 2017; 17: 157-82.
- 110- Oehler E., Watrin L., et al. Zika virus infection complicated by Guillain Barre syndrome report, French Polynesia. 2013. *Euro surveill* 2014; 19
- 111- Faye O., Diallo D., et al. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquito. *Virol J.* 2013 Oct 22; 10:311. doi: 10.1186/1743-422X-10-311.
- 112- Faye O., Dupressoir A., et al. One-step RT-PCR for detection of Zika virus. *J Clin Virol* 2008; 43(1):96-101.
- 113- Balm Mn, Lee CK., et al. A diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika virus. *Med Virol* 2012; 84(9): 1501-1505.
- 114- Maher- Sturges SL., Forrester NL., et al. Universal primers that amplify RNA from all three flavivirus subgroups. *J Virol* 2008; 5:16.

- 115- Jimenez, A., Shaz BH., et al. Zika virus and the blood supply: what do we know? *Transfusion Medicine reviews*, 31(1): 1-10.
- 116- Gourinat AC., O'Connor O., et al. Detection of Zika virus in urine. *Emerg Infect Dis* 2015; 21:84-86.
- 117- Atkison B., Hearn P., et al. Detection of Zika Virus in sêmen Case Reports *Emerg Infect Dis*. 2016 May;22(5):940. doi: 10.3201/eid2205.160107..
- 118- Priyamvada L., Hudson W., et al. Humoral cross-reactivity between Zika and Dengue viroses: implications for protection and pathology. *Emerg Microbes Infect.* 2017 May 10;6(5): e33. doi: 10.1038/emi.2017.42.
- 119- Lianpan Dai, Jian Song, et al. Structure of Zika virus envelope protein and its complex with a flavivírus broadly protective antibody. *Cell Host Microbe*. 2016 May 11;19(5):696-704. doi: 10.1016/j.chom.2016.04.013.
- 120- Ingrid B. Rabe, MBChB; J. Erin Staples. Interim Guidance for Interpretation of Zika Virus Antibody Test Results *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016 Jun 3;65(21):543-6. doi: 10.15585/mmwr.mm6521e1.
- 121- Mlakar J., Korva M., et al. Rapid risk assessment: Zika virus epidemic in the Americas. *Potencial association with microcephaly and Guillain Barre syndrome- 4th*, december 2015.
- 122- Swanstrom JÁ., Plante, AKS., et al. Dengue virus envelope dimer epitope monoclonal antibodies isolated from dengue patients are protective Against Zika virus. *The Journal of Infectious Diseases®* 2017; 215:781–5
- 123- World Health Organization. Target product profiles for better diagnostic tests for Zika vírus infection. April 2016.
- 124- Villar J, Cheikh Ismail L, Victora CG, et al. Padrões internacionais para peso, comprimento e perímetro cefálico de recém-nascidos por idade gestacional e sexo: o Newborn Cross-Sectional Study of the INTERGROWTH-21st Project. *Lancet* 2014; 384: 857–68. 10.1016 / S0140-6736 (14) 60932-6 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
- 125- Villar J, Altman DG, Purwar M, et al.; Consórcio Internacional de Crescimento Fetal e Neonatal para o Século 21. Os objetivos, desenho e implementação do Projeto INTERGROWTH-21st. *BJOG*. 2013; 120 (supl. 2): 9-26. doi: 10.1111 / 1471-0528.12047 [PubMed] [CrossRef] [Google ScholaR))
- 126- Stephen Ashwal 1, David Michelson, et al. Practice parameter: Evaluation of the child with microcephaly (an evidence-based review): report of the Quality

Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology*. 2009 Sep 15;73(11):887-97.

127- Zambonato Ana Maria Krusser, Ricardo Tavares Pinheiro, et al. Risk factors for small-for-gestational age births among infants in Brazil *Rev Saúde Pública* 2004;38(1):24-29.

128- Heineman K R, Hadders-Algra M. Evaluation of Neuromotor Function in Infancy—A Systematic Review of Available Methods. *J Dev Behav Pediatr* 2008; 29:315–323.

129- Bayley, N. *Bayley scales of infant and toddler development*. 3ed. San Antonio: Pearson; 2006.

130- Jackson, BJ, Needelman H, Roberts H, Willet S, McMorris C. Bayley Scales of Infant Development Screening Test-Gross Motor Subtest: efficacy in determining need for services. *Pediatric physical therapy / 2012; 24(1): 58-62.*

131- Bayley, N. comparisons of mental and motor test scores for ages 1-15 months by sex, birth order, race, geographical location, and education of parents. *child dev.* 36, 379–411 (1965)

132- Souza, C. T. et al. Assessment of global motor performance and gross and fine motor skills of infants attending day care centers. *Rev. Bras. Fisioter.* 14, 309–315 (2010)

133- Jary, S., Kmita, G. & Whitelaw, A. Differentiating developmental outcome between infants with severe disability in research studies: the role of Bayley Developmental Quotients. *J. Pediatr.* 159, 211–4. E1 (2011)

134- Van der Linden V., Pessoa A., et al. Description of 13 infants born during october 2015- january 2016 with congenital Zika Virus infection without microcefaly at birth. *MMWR* 2016; 65: 1343- 1348.

135- Romeo DMM, et al. Neuromotor development in infants with cerebral palsy investigated by the Hammersmith Infant Neurological Examination during the first year of age. *Eur. J Paediatr. Neurol.* 12; 24-31, 2008.

136- Faria CDCM, Leite HR, organizadores. *PROFISIO Programa de Atualização em Fisioterapia Neurofuncional: Ciclo 7*. Porto Alegre: Artmed Panamericana; 2020.p.137-68. (Sistema de Educação Continuada a Distância, v.3)

137- Maitre NL, Chorna O, Romeo DM, Guzzetta A. Implementation of the Hammersmith Infant Neurological Examination in a High-Risk Infant Follow-Up

- Program. *Pediatr Neurol.* 2016 Dec; 65:31-38. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2016.09.010.
- 138- TLB França, WR Medeiros, NL Souza, Growth and development of children with microcephaly associated with congenital Zika virus syndrome in Brazil. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2018, 15(9), 1990; <https://doi.org/10.3390/ijerph15091990>
- 139- World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA.* 2013 Nov 27;310(20):2191-4. doi: 10.1001/jama.2013.281053
- 140- Gerarlene Ponte Guimarães SantosMárcia Teles de Oliveira Gouveia. Efeitos no desenvolvimento de crianças expostas ao vírus zika no período fetal: revisão integrativa. *Rev. Bras. Enferm.* 73 (suppl 4) • 2020 • <https://doi.org/10.1590/0034-7167-2019-0883>
- 141- Khan, AM; Morris, SK; Bhutta, ZA Neonatal and Perinatal Infections. *Pediatr. Clin. N. Am.* 2017, 64, 785–798. [Google Scholar] [CrossRef]
- 142- Wu, YW; Escobar, GJ; Grether, JK; Croen, LA; Greene, JD; Newman, TB Chorioamnionitis and Cerebral Paraly in A Termo e Bebês Perto. *JAMA* 2003, 290, 2677–2684. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
- 143- Lynch, L.; Ghidini, A. Infecções perinatais. *Curr. Opiniões Obstet. Gynecol.* 1993, 5, 24-32. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
- 144- Edwards, AD; Tan, S. Infecções perinatais, prematuridade e lesão cerebral. *Curr. Opiniões Pediatr.* 2006, 18, 119–124. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
- 145- Jason Dang 1, Shashi Kant Tiwari. Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. *Cell Stem Cell.* 2016 Aug 4;19(2):258-265. doi: 10.1016/j.stem.2016.04.014. Epub 2016May 6.
- 146- Cynthia A. Moore, MD, PhD<sup>1</sup>; J. Erin Staples, MD, PhD<sup>2</sup>; William B. Dobyns, MD<sup>3</sup>; et al. Characterizing the Pattern of Anomalies in Congenital Zika Syndrome for Pediatric Clinicians. *JAMA Pediatrics* March 2017 Volume 171, Number 3
- 147- Cragan JD, Mai CT, Petersen EE, et al. Baseline prevalence of birth defects associated with congenital zika virus infection\_ Massachusetts, North Carolina,

- and Atlanta, Georgia, 2013-2014. *WWR Morb Mortal Wkly Rep* 2017; 66: 219-22. 10.155/mmwr.mm6608a4
- 148- Oliveira Consuelo Silva, \* e Pedro Fernando da Costa Vasconcelos. Microcephaly and Zika virus. *Jornal de Pediatria* Volume 92, Issue 2, March–April 2016, Pages 103-105
- 149- Brazil. Ministry of Health of Brazil. Health Surveillance Department. Zika Virus in Brazil: the SUS response [electronic resource] / Ministry of Health of Brazil, Health Surveillance Department. – Brasilia: Ministry of Health of Brazil, 2017
- 150- Krow-Lucal ER, de Andrade MR, Cananea JNA, et al. Association and birth prevalence of microcephaly attributable to Zika virus infection among infants in Paraiba, Brazil, in 2015-16: a case control study. *Lancet Child Adolesc Health* 2018. 10.1016/S2352-4642(18)30020-8.
- 151- Vianna P., et al. Zika virus as a possible risk factor for autism spectrum disorder: neuroimmunological aspects. *Neuroimmunomodulation* 25, 320-327 (2018)
- 152- Miranda HA II, Costa MC, Frazao MA, Simao N, Franchischini S, Moshfeghi DM. Expanded spectrum of congenital ocular findings in microcephaly with presumed Zika infection. *Ophthalmology*. 2016;123(8):1788–1794.
- 153- Rajendra Gharbaran 1, Latchman Somenarain. Putative Cellular and Molecular Roles of Zika Virus in Fetal and Pediatric Neuropathologies *Pediatr Dev Pathol*. Jan-Feb 2019;22(1):5-21. doi: 10.1177/1093526618790742
- 154- (Sun J, Wu D, Zhong H. Presence of Zika virus in conjunctival fluid. *JAMA Ophthalmol*. 2016;134(11):1330–1332
- 155- Jaenish T., et al. Risk of microcephaly after Zika virus infection in Brazil, 2015 to 2016. *World Health Organ*, 2017; 95(3): 191-198.
- 156- Miner JJ, Diamond MS Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. *Cell Host Microbe*. 2017; 21: 134–142. doi: 10.1016 / j. chom.2017.01.004. [Artigo gratuito PMC] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
- 157- Coutinho CM, Neg S., Araujo D., Teixeira SR, Amaral FR, Moro M., Fernandes J., da Motta M., Negrini B., Caldas C., et al. A infecção materna precoce pelo Zika prediz dano neurológico neonatal grave: resultados do estudo de coorte prospectivo da história natural da infecção pelo vírus da Zika na

gestação. BJOG. 2020 doi: 10.1111 / 1471-0528.16490. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

158- Honein Margaret A., PhD<sup>1</sup>; April L. Dawson, MPH<sup>1</sup>; Emily E. Petersen, MD<sup>1</sup>; et al. Birth Defects Among Fetuses and Infants of US Women with Evidence of Possible Zika Virus Infection During Pregnancy. JAMA. 2017;317(1):59-68. doi:10.1001/jama.2016.19006

159- Halai UA., Nielsen-Saines K., Moreira ML., et al. Maternal Zika virus disease severity, vírus load, prior dengue antibodies, and their relationship to birth outcomes. Clin Infect Dis 2017: 65:877-883.

160- Infecção congênita pelo zika vírus: uma revisão com ênfase no espectro de anormalidades cerebrais. Leão VHP, Curr Neurol Neurosci Rep. 2020; 20 (11): 49. Publicado online em 3 de setembro de 2020 doi: 10.1007 / s11910-020-01072-0.

161- Gaburro J, Bhatti A, Harper J, Jeanne I, Dearnley M, Green D, Nahavandi S, Paradkar PN, Duchemin JB. Neurotropismo e alterações comportamentais associadas à infecção por Zika no vetor Aedes aegypti. Emerg Microbes Infect. 2018; 7 (1): 68.

162- Neurological outcomes of congenital Zika syndrome in toddlers and preschoolers: a case series Heloisa Viscaino Fernandes Souza Pereira, MD; e col Published: March 18, 2020DOI: [https://doi.org/10.1016/S2352-4642\(20\)30041-9](https://doi.org/10.1016/S2352-4642(20)30041-9)

163- De Araujo TV, de Alencar Ximenes RA, de Barros Miranda-Filho D, et al. Association between microcephaly, Zika virus infection, and Other risk factors in Brazil: final report of a case-control study. The Lancet Infectious diseases 2018; 18: 328-36.

## ANEXOS

### A.1.1 Artigos publicados em periódicos

P. Brasil, J.P. Pereira, Jr., M.E. Moreira, R.M. Ribeiro Nogueira, L. Damasceno, M. Wakimoto, R.S. Rabello, S.G. Valderramos, U.-A. Halai, T.S. Salles, A.A. Zin, D. Horovitz, P. Daltro, M. Boechat, C. Raja Gabaglia, P. Carvalho de Sequeira, J.H. Pilotto, R. Medialdea-Carrera, D. Cotrim da Cunha, **L.M. Abreu de Carvalho**, M. Pone, A. Machado Siqueira, G.A. Calvet, A.E. Rodrigues Baiao, E.S. Neves, P.R. Nassar de Carvalho, R.H. Hasue, P.B. Marschik, C. Einspieler, C. Janzen, J.D. Cherry, A.M. Bispo de Filippis, and K. Nielsen-Saines. “Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro”. The New England Journal of medicine 375, no 24 (15 de 2016): 2321–34. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1602412>.

Lopes Moreira ME, Nielsen-Saines K, Brasil P, Kerin T, Damasceno L, Pone M, **Carvalho LMA**, Pone SM, Vasconcelos Z, Ribeiro IP, Zin AA, Tsui I, Adachi K, Gaw SL, Halai UA, Salles TS, da Cunha DC, Bonaldo MC, Raja Gabaglia C, Guida L, Malacarne J, Costa RP, Gomes SC Jr, Reis AB, Soares FVM, Hasue RH, Aizawa CYP, Genovesi FF, Aibe M, Einspieler C, Marschik PB, Pereira JP Jr, Portari EA, Janzen C, Cherry JD. Neurodevelopment in Infants Exposed to Zika Virus in Utero. The New England Journal of medicine. May 16. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6478167/pdf/nihms-1018434.pdf>

Karin Nielsen-Saines, Patrícia Brasil, Tara Kerin, Zilton Vasconcelos, Claudia Raja Gabaglia, Luana Damasceno, Marcos Pone, **Liege M. Abreu de Carvalho**, Sheila M. Pone, Andrea A. Zin, Irena Tsui, Tania Regina S. Salles, Denise Cotrim da Cunha, Roozemerie Pereira Costa, Jocielle Malacarne, Ana Beatriz Reis, Renata Hydee Hasue, Carolina Y.P. Aizawa, Fernanda F. Genovesi, Christa Einspieler, Peter B Marschik, José Paulo Pereira, Jr., Stephanie L. Gaw, Kristina Adachi, James D. Cherry, Zhiheng Xu, Genhong Cheng, and Maria Elisabeth Moreira. Delayed childhood neurodevelopment and neurosensory alterations in the second year of life in a prospective cohort of ZIKV-exposed children. Nat Med. 2019 Aug;25(8):1213-1217. doi: 10.1038/s41591-019-0496-1. [https://www.nature.com/articles/s41591-019-0496-](https://www.nature.com/articles/s41591-019-0496-1)

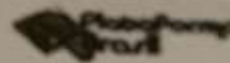
[1](#)



Freitas DA, Souza-Santos R, **Carvalho LMA**, Barros WB, Neves LM, et al. (2020) Congenital Zika syndrome: A systematic review. PLOS ONE 15(12): e0242367. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242367>

Patrícia Brasil<sup>1,7</sup>✉, Zilton Vasconcelos <sup>1,7</sup>, Tara Kerin<sup>2</sup>, Claudia Raja Gabaglia<sup>3</sup>, Ieda P. Ribeiro<sup>1</sup>, Myrna C. Bonaldo <sup>1</sup>, Luana Damasceno<sup>1</sup>, Marcos V. Pone <sup>1</sup>, Sheila Pone <sup>1</sup>, Andrea Zin<sup>1</sup>, Irena Tsui<sup>2</sup>, Kristina Adachi<sup>2</sup>, Jose Paulo Pereira Jr.<sup>1</sup>, Stephanie L. Gaw <sup>4</sup>, **Liege Carvalho<sup>1</sup>**, Denise C. Cunha<sup>1</sup>, Leticia Guida<sup>1</sup>, Mirza Rocha<sup>1</sup>, James D. Cherry<sup>2</sup>, Lulan Wang<sup>2</sup>, Saba Aliyari<sup>2</sup>, Genhong Cheng<sup>2</sup>, Suan-Sin Foo<sup>5</sup>, Weiqiang Chen<sup>5</sup>, Jae Jung <sup>5</sup>, Elizabeth Brickley<sup>6</sup>, Maria Elisabeth L. Moreira <sup>1</sup> & Karin Nielsen-Saines <sup>2</sup>Brasil, P., Vasconcelos, Z., Kerin, T. et al. Zika virus vertical transmission in children with confirmed antenatal exposure. Nat Commun 11, 3510 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17331-0>

#### **A.1.2. Parecer Consubstanciado do CEP**



**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** História Natural de infecção por ZIKV em lactentes expostos na gestação.

**Pesquisador:** Patrícia Brasil

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 63573716.8.0000.5262

**Instituição Proponente:** INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS - INI/FIOCRUZ

**Patrocinador Principal:** Ministério da Saúde

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.348.182

**Apresentação do Projeto:**

A reapresentação deste projeto de pesquisa visa responder as pendências que constam no Parecer Consubstanciado n. 1.898.831, emitido por este CEP em 25/01/2017.

Conforme descrito na inicial, apesar do grande número de microcefalias relacionado ao vírus pouco se conhece da evolução dos bebês expostos in útero e seus outros possíveis desfechos. O estudo pretende realizar o acompanhamento de todas as crianças expostas ao ZIKV durante a gestação para pesquisar outros sinais e sintomas relacionados a essa exposição.

**Objetivo da Pesquisa:**

Os mesmos descritos no Parecer Consubstanciado n. 1.898.831, já citado.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os mesmos descritos no Parecer Consubstanciado n. 1.898.831, já citado.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Vide tópico "Conclusões ou Pendências e Lista de inadequações".

**Endereço:** Avenida Brasil 4365

**Bairro:** Manguinhos

**CEP:** 21.040-360

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone:** (21)3895-6585

**E-mail:** cep@ini.fiocruz.br

Definição de Parecer: 2.208.102

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:  
Vide tópico "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Retornamos a seguir as pendências apontadas no Parecer Consubstanciado n. 1.808.831 e as respectivas respostas da pesquisadora principal:

1 - Biorepositório:

PENDÊNCIA: O projeto deixa claro que haverá retenção de amostras para armazenamento em biorepositório, justificando que "outros exames serão feitos em sangue e urina e armazenados a - 70° C para outras infecções congênitas (dengue, chik, toxo, CMV, parvovirus B19, HIV, sífilis) e pesquisa de anticorpos neutralizantes anti ZIKV". Há necessidade, portanto, de que seja anexado o competente Termo de Compromisso para Armazenamento de Amostras Biológicas Humanas em Biorepositório, cujo modelo encontra-se disponível no CEP.

RESPOSTA: A pesquisadora anexou à Plataforma Brasil o Termo de Compromisso para Armazenamento de Amostras Biológicas Humanas em Biorepositório.

COMENTÁRIO: Pendência atendida.

2 - TCLE:

PENDÊNCIA: Recomendo a revisão global do texto para correções da língua pátria. Evitar utilizar abreviaturas tipo "ZIKV" para melhor compreensão da(o) participante.

RESPOSTA: A pesquisadora anexou à Plataforma Brasil uma nova versão do TCLE devidamente corrigido.

COMENTÁRIO: Pendência atendida.

CONCLUSÃO: Após o atendimento das exigências, não há óbice ético para a aprovação do projeto.

Endereço: Avenida Brasil 4365  
Bairro: Maracanã CEP: 21.040-360  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)3865-6285 E-mail: cep@fiocruz.br

INSTITUTO NACIONAL DE  
INFECTOLOGIA EVANDRO  
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 2.348.162

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipos Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_P ROJETO_827845.pdf	13/09/2017 08:40:41		Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biorepositorio_liege.pdf	13/09/2017 08:40:21	Patricia Brasil	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ZIKVactantesfinal.docx	05/09/2017 11:48:48	Patricia Brasil	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_rev22ago17.docx	05/09/2017 11:25:56	Patricia Brasil	Aceito
Folha de Rosto	FR_Zika.pdf	02/12/2016 11:24:40	Patricia Brasil	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIO DE JANEIRO, 25 de Outubro de 2017

*Léa Ferreira Camillo Coura*

Assinado por:  
Léa Ferreira Camillo Coura  
(Coordenador)

Dr. Léa Ferreira Camillo Coura  
Coordenadora do Comitê de Ética em  
Pesquisa  
Mat. 3045 0210400  
INI/FIOCRUZ

Endereço: Avenida Brasil 4365 CEP: 21.040-380  
Bairro: Manguinhos  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO E-mail: cep@ini.fiocruz.br  
Telefone: (21)3865-0585