



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

**Avaliação do padrão de restrição do crescimento fetal  
em gestantes infectadas pelo vírus Zika.**

**Helder Dotta da Gama**

**Rio de Janeiro  
Março de 2019**



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

**Avaliação do padrão de restrição do crescimento fetal  
em gestantes infectadas pelo vírus Zika.**

**Helder Dotta da Gama**

**Rio de Janeiro  
Março de 2019**



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

## **Avaliação do padrão de restrição do crescimento fetal em gestantes infectadas pelo vírus Zika.**

**Helder Dotta da Gama**

Dissertação de Mestrado Profissional apresentada à Pós-graduação em Saúde da Criança e da Mulher como pré-requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Nassar de Carvalho  
Co-orientador: Prof. José Paulo Pereira Júnior

**Rio de Janeiro  
Março de 2019**



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

CIP - Catalogação na Publicação

Gama, Helder Dotta da.

Avaliação do padrão de restrição do crescimento fetal em gestantes infectadas pelo vírus Zika. / Helder Dotta da Gama. - Rio de Janeiro, 2019.  
69 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, Rio de Janeiro - RJ, 2019.

Orientador: Paulo Roberto Nassar de Carvalho.

Co-orientador: José Paulo Pereira Júnior.

Bibliografia: f. 59-65

1. Zika. 2. Infecção congênita. 3. Restrição do crescimento fetal. 4. Insuficiência placentária. I. Título.

## DEDICATÓRIA

À minha família, meu porto seguro.

A todas as famílias atingidas pela Zika, que souberam ser fortes e resilientes  
em um período tão turbulento e cheio de incertezas.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Beth e Aureo, pela dedicação e esforço na minha educação e formação de caráter. Vocês tiveram papel fundamental nesta conquista.

Ao meu irmão, Hector, que muitas vezes foi o olhar crítico deste trabalho quando eu já estava cansado de releituras.

Ao Rafael, que vivenciou comigo quase todo este processo, sempre me incentivando e tolerando minhas reclamações e frustrações.

Ao Dr. Paulo Nassar, meu chefe e orientador, agradeço a paciência e todos os ensinamentos na Medicina Fetal e na produção deste trabalho.

Ao Dr. José Paulo Jr, meu co-orientador, que me deu a oportunidade de trabalhar no projeto Zika e grande incentivador do ingresso no Mestrado.

Aos professores da banca examinadora, Dr. Fernando Maia e Dra. Fernanda Campos, que também estiveram na qualificação e acrescentaram muito a este trabalho.

Aos colegas do Mestrado Profissional, que se tornaram grandes amigos e fizeram com que o curso fosse mais divertido e ameno.

Aos antigos amigos, que souberam entender minhas ausências e também sempre foram importante ponto de apoio.

À equipe da Medicina Fetal do IFF, especialmente os demais bolsistas do Projeto Zika, e às gestantes que aceitaram participar deste trabalho, sem as quais ele não existiria.

## RESUMO

O foco principal desta Dissertação é a caracterização da restrição de crescimento em fetos expostos à infecção pelo vírus Zika (ZIKV) durante a gestação. A população de estudo é formada por mulheres com gestações únicas e testes moleculares positivos para a infecção pelo ZIKV detectados durante a gestação e que foram acompanhadas no IFF entre janeiro de 2016 e março de 2017. Optamos por dividir em dois grupos: fetos de crescimento normal e fetos com crescimento restrito e em faixas de idade gestacional para facilitar a interpretação; o critério diagnóstico para a restrição de crescimento foi a medida da circunferência abdominal abaixo do percentil 10 para a idade gestacional. As variáveis biométricas fetais foram reclassificadas em Z-scores conforme a idade gestacional e, juntamente com as variáveis Dopplervelocimétricas, foram analisadas comparando-se os dois grupos, utilizando o teste t-Student. Observamos que em todas as faixas analisadas, houve diferença significativa entre os parâmetros biométricos, principalmente as circunferências cefálica e abdominal, o fêmur apresentou menor discrepância entre grupos. Na avaliação Dopplervelocimétrica, destacou-se a diferença no índice de pulsatilidade da artéria umbilical. Por fim, descrevemos as malformações congênitas mais frequentes no grupo de fetos restritos, como microcefalia, ventriculomegalia, calcificações intracranianas e artrogripose. Os achados deste estudo sugerem que o vírus Zika interfere no crescimento fetal de uma forma mais seletiva, prejudicando apenas parcialmente o crescimento de ossos longos, e que também promove algum grau de insuficiência placentária, o que explicaria o aumento na resistência ao fluxo sanguíneo umbilical neste grupo de fetos acometidos.

Palavras-chave: infecção pelo ZIKV, restrição do crescimento fetal, insuficiência placentária

## ABSTRACT

The main focus of this Dissertation is the characterization of growth restriction in fetuses exposed to Zika virus infection during pregnancy. The study population consists of women with singleton pregnancies and positive molecular tests for ZIKV infection detected during pregnancy and who were followed at Instituto Fernandes Figueira between January, 2016 and March, 2017. Then, they were divided into two groups: fetuses with adequate growth and fetuses with restricted growth and we stratified them in gestational age strata to facilitate interpretation; the diagnostic criterion for the growth restriction was the abdominal circumference below the 10th percentile for gestational age. Fetal biometric variables were reclassified into Z-scores according to gestational age and, along with Dopplervelocimetric variables, they were analyzed by comparing the two groups using Student's t-test. We observed that in all analyzed strata, there was significant difference between biometric parameters, especially head and abdominal circumferences, femur length displayed lower discrepancy between groups. On Dopplervelocimetric evaluation, we highlight the difference in the umbilical artery pulsatility index. Finally, we describe the most frequent congenital malformations in the group of restricted fetuses, such as microcephaly, ventriculomegaly, intracranial calcifications and arthrogyrosis. The findings of this study suggest that the Zika virus interferes in fetal growth in a more selective form, partially harming femoral growth, and that it also promotes some degree of placental insufficiency, which could explain the increase in umbilical blood flow resistance in the group of affected fetuses.



## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	i
AGRADECIMENTOS .....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT .....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. JUSTIFICATIVA.....	11
3. OBJETIVOS.....	12
3.1 OBJETIVO GERAL .....	12
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
4. REFERENCIAL TEÓRICO .....	13
4.1 A INFECÇÃO PELO ZIKA VÍRUS.....	13
4.2 QUADRO CLÍNICO .....	14
4.3 DIAGNÓSTICO .....	14
4.4 TRATAMENTO .....	17
4.5 REPERCUSSÕES FETAIS.....	17
4.6 A RESTRIÇÃO DE CRESCIMENTO FETAL .....	18
4.7 A RESTRIÇÃO DE CRESCIMENTO FETAL NAS INFECÇÕES CONGÊNITAS .....	20
4.8 A RESTRIÇÃO DE CRESCIMENTO E INSUFICIÊNCIA PLACENTÁRIA .....	21
5. MATERIAIS E MÉTODO .....	23
5.1 DESENHO DO ESTUDO .....	23
5.2 APRECIÇÃO ÉTICA .....	23
5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....	23
5.4 CRITÉRIO DE EXCLUSÃO .....	23
5.5 TAMANHO DA AMOSTRA .....	24
5.6 IDENTIFICAÇÃO DOS CASOS .....	24
5.7 COLETA DE DADOS.....	24
5.8 EXAME ULTRASSONOGRÁFICO.....	25

5.9 PROTOCOLO DE ESTUDO .....	27
5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
6. ARTIGO SUBMETIDO A PUBLICAÇÃO <sup>1</sup> .....	29
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52
8. ANEXOS.....	53
8.1 FICHAS DE COLETA DE DADOS .....	53
8.2 CARTA DE APROVAÇÃO DO CEP.....	56
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACOG – *American College of Obstetricians and Gynecologists*

AIG – adequado para a idade gestacional

CA – circunferência abdominal

CC – circunferência cefálica

CDC – *Centers for Disease Control*

CF – comprimento do fêmur

CHIKV – vírus chikungunya

CIUR – crescimento intrauterino restrito

CMV - citomegalovírus

DBP – diâmetro biparietal

DENV – vírus dengue

DUM – data da última menstruação

GIG – grande para a idade gestacional

IFF – Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira

MS – Ministério da Saúde

PCR – reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction*)

PIG – pequeno para a idade gestacional

PRNT – testes de neutralização pela redução em placa

RCOG – *Royal College of Obstetricians and Gynaecologists*

SCZ – Síndrome Congênita da Zika

STORCH – toxoplasmose, outros, rubéola, citomegalovírus, herpes e sífilis

ZIKV – zika vírus

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma adaptado de CDC, Diagnóstico da infecção pelo ZIKV – Orientação provisória sobre gravidez. Atualizada em fevereiro de 2018 .....	7
Figura 2 – Fluxograma adaptado do MS para diagnóstico e condução dos casos de zika na gestação. Última atualização em fevereiro de 2016 .....	8
Figura 3 – Plano ultrassonográfico para medição do DBP e da CC .....	16
Figura 4 – Plano ultrassonográfico para medição da CA .....	17
Figura 5 – Plano ultrassonográfico para medição do CF .....	17

## 1. INTRODUÇÃO

Em 2015, a zika, uma doença infecciosa já conhecida pela comunidade científica há quase 70 anos, porém restrita a algumas regiões da África e algumas ilhas do Pacífico, ganhou destaque mundial após se disseminar pelas Américas. O vírus zika (ZIKV) foi descrito na década de 1940, em Uganda, descoberto durante pesquisas sobre o vírus da febre amarela. Naquela ocasião, contudo, ainda não havia relatos da doença em humanos. Em 2007, na ilha de Yap (Micronésia), ocorreu a primeira epidemia da infecção, com aproximadamente 74% da população sendo infectada e, 6 anos depois, nova epidemia ocorreu na Polinésia Francesa. <sup>(1)</sup>

No Brasil, a infecção surge entre 2014 e 2015, com surtos na região Nordeste e, pouco tempo depois (agosto e setembro/2015), ocorre um significativo aumento no número de casos de microcefalia notificados no mesmo território; a relação temporal entre os eventos levanta a suspeita de uma possível associação causal entre os dois quadros.<sup>(2)</sup> Posteriormente, situação semelhante também foi observada na região Sudeste, principalmente no Estado do Rio de Janeiro. Nesse período, o Ministério da Saúde (MS) e as Secretarias Estaduais de Saúde começam a estabelecer políticas de vigilância e notificações. Em novembro de 2015, a zika foi classificada como Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional pelo MS e, em fevereiro de 2016, de Importância Internacional pela Organização Mundial de Saúde.<sup>(3)</sup>

Com o aumento do número de casos estudados e das publicações associadas, cada vez mais achados neonatais foram relacionados à infecção congênita pelo ZIKV, como malformações do sistema nervoso central dos recém-nascidos, artrogripose, alterações oculares, configurando o que se denominou posteriormente de Síndrome Congênita da Zika (SCZ).<sup>(4)</sup> Da mesma forma, autores na área da Medicina Fetal começaram a descrever os achados intrauterinos,<sup>(5,6)</sup> muitos dos sinais vistos nos recém-nascidos já eram passíveis de detecção no feto, inclusive a microcefalia.

O termo crescimento intrauterino restrito (CIUR) caracteriza fetos que falharam em atingir todo seu potencial genético de crescimento, o que pode

ocorrer devido a diversos insultos ao binômio materno-fetal, sendo o ZIKV um novo agente etiológico associado a este achado. Ainda há muita controvérsia sobre os critérios diagnósticos e etiologias, porém é bem consolidada sua associação com desfechos perinatais adversos.<sup>(7)</sup> Neste trabalho, utilizaremos como definição de crescimento restrito a medida da circunferência abdominal abaixo do percentil 10 para a idade gestacional.

Outras infecções congênitas mais comuns também podem cursar com CIUR, mas na zika esta frequência parece ser maior do que a estimada para outros agentes.<sup>(8)</sup> Esta associação frequentemente descrita, porém ainda pouco estudada, é o tema que este trabalho se propõe a estudar.

## 2. JUSTIFICATIVA

O Instituto Nacional de Saúde da Criança, da Mulher e do Adolescente Fernandes Figueira, referência em saúde pública para o diagnóstico e acompanhamento de alterações fetais, sejam elas infecciosas ou por malformações, é um dos principais pontos de acolhimento das gestantes infectadas pelo vírus zika no Estado do Rio de Janeiro. Essas gestantes são encaminhadas seja por malformações já diagnosticadas ou pela positividade dos testes virológicos. Na pandemia de 2016, eu iniciava a especialização em Medicina Fetal no IFF, vendo de perto as consequências clínicas e sociais da infecção da zika, o que despertou o meu interesse pelo estudo do tema.

A gravidade do quadro fetal encontrado nestas pacientes, até então com muito mais perguntas do que respostas, tornava difícil o aconselhamento das gestantes quanto ao prognóstico da gravidez e pós-parto. Hoje, muitos dos questionamentos do início da epidemia já foram respondidos, contudo, outros ainda não alcançaram explicação satisfatória.

Especificamente sobre o tema desse projeto, a busca bibliográfica associando a infecção pelo ZIKV e o CIUR retorna apenas 11 artigos (PubMed) que citam o achado da restrição de crescimento, sendo que o único a se aprofundar na avaliação deste achado foi Walker et al.<sup>(27)</sup> avaliando gestantes estadunidenses infectadas e possivelmente expostas. Espera-se, com este trabalho, ajudar a preencher algumas lacunas do conhecimento sobre a história natural da infecção congênita a fim de melhorar o aconselhamento das mulheres acometidas com ZIKV e CIUR na gestação.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Analisar o padrão de restrição do crescimento em fetos expostos à infecção pelo vírus zika

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever os achados dos parâmetros biométricos e Dopplervelocimétricos fetais
- Comparar a evolução dessas medidas entre os grupos de fetos restritos e os não-restritos
- Descrever as malformações mais frequentemente associadas em cada grupo



## 4. REFERENCIAL TEÓRICO

### 4.1 A INFECÇÃO PELO ZIKA VÍRUS

A zika é uma infecção transmitida por mosquitos do gênero *Aedes* e causada por um flavivírus neurotrópico, o zika vírus (ZIKV), que ataca as células neurais progenitoras, prejudicando a multiplicação, migração e diferenciação neuronais. Os primeiros casos de zika em humanos foram descritos em Uganda e na Tanzânia em 1952, porém como casos esporádicos da doença; o primeiro surto ocorreu na Micronésia em 2007, onde quase 70% da população foi infectada. Na América do Sul, os primeiros relatos surgiram no Chile em 2014 e, posteriormente, foi detectada sua disseminação para o Brasil em maio de 2015.<sup>(1,9)</sup>

O gênero *Flavivirus* compreende diversos outros agentes infecciosos de importância para a saúde pública, como o vírus da febre amarela, o da dengue e o da encefalite japonesa; todos eles também apresentam como ponto comum a transmissão por vetores artrópodes. O vírus zika é composto de uma fita única de RNA, envelopado de forma icosaédrica. Duas linhagens do patógeno são descritas: a africana e a asiática, esta última responsável pelas epidemias nas ilhas do Pacífico e nas Américas. Testes de laboratório demonstram a ação neuropática do vírus, com degeneração neuronal, infiltração celular e intensa replicação nas células da astróglia e nos neurônios. Também é descrita importante reação inflamatória em células musculares esqueléticas e no miocárdio.<sup>(10)</sup>

A infecção é transmitida principalmente pela picada do mosquito infectado e pela via transplacentária, mas também existem descrições de transmissão por via sexual (sêmen, principalmente), hemotransfusões, transplantes de órgãos e acidentes biológicos. Ressalta-se que a infecção fetal pelo ZIKV se caracteriza por ser a única infecção congênita reconhecidamente transmitida por um vetor (mosquitos do gênero *Aedes*), o que põe em ênfase aspectos clínicos e epidemiológicos singulares.<sup>(11)</sup>

## 4.2 QUADRO CLÍNICO

A doença materna aguda surge após um período de incubação que pode variar de 2 a 14 dias, com um quadro de febre baixa e intermitente (até 38,5°C), exantema maculopapular pruriginoso, artralgia (principalmente em pequenas articulações) e conjuntivite. Outros sintomas inespecíficos também podem ocorrer, como astenia, mialgia, cefaleia e dor retro-orbitária. O *rash* cutâneo tende a se concentrar no tronco, membros, palmas e plantas.<sup>(1,10)</sup>

A infecção pode ser assintomática em até 75% dos pacientes infectados pelo vírus, no entanto, têm sido relatados casos de evolução para quadros maternos graves como a síndrome de Guillain-Barré, numa incidência estimada em 2,4 casos para cada 10.000 infecções.<sup>(12,13)</sup>

A gestação, por si só, não altera o curso clínico da doença, porém pode ser fator de risco para maior viremia e detecção prolongada de partículas virais no sangue.<sup>(14,15)</sup> Além disso, não há correlação significativa entre a gravidade da sintomatologia materna e o grau de acometimento fetal.<sup>(15)</sup>

## 4.3 DIAGNÓSTICO

O *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) recomenda que as pacientes gestantes sejam interrogadas quanto a sinais sugestivos de infecção pelo Zika e possível exposição epidemiológica a cada consulta de pré-natal e as testagens são feitas de acordo com a presença ou não de sintomas, preenchendo os seguintes critérios:<sup>(16,17)</sup>

- pacientes com exposição provável e sintomas sugestivos de infecção pelo ZIKV: testes em até 12 semanas após início do quadro – PCR em amostra de sangue e urina e IgM
- pacientes assintomáticas com exposição constante: testes 3 vezes ao longo do pré-natal – PCR em sangue e urina.

O mesmo órgão recomenda a seguinte interpretação dos resultados:

PCR positivo = infecção aguda pelo ZIKV

PCR negativo e IgM não-negativo = necessário teste de neutralização pela redução em placa (PRNT)

PCR negativo e IgM negativo = sem evidência de infecção

Nos testes de neutralização (PRNT), uma amostra do soro a ser testada é combinada a uma suspensão viral e incubada para que haja reação com o vírus. Esta solução é então titulada em uma placa de células hospedeiras que então serão infectadas pela solução viral. A leitura do exame pode ser feita por microscopia direta, anticorpos fluorescentes ou corantes que reagem especificamente com células infectadas.<sup>(18)</sup>

No PRNT, resultados para zika superiores a 10 e para dengue menores que 10 sugerem infecção por zika, sem ser possível determinar tempo de infecção. Resultados superiores a 10 para ambas sugerem infecção por flavivírus sem ser possível especificar qual deles. Por fim, resultados menores que 10 para zika afastam possibilidade de infecção.<sup>(16)</sup>

As recomendações do órgão americano são válidas dentro de um contexto não endêmico do vírus. Entre nós, o MS, por sua vez, mantém a recomendação de coleta de PCR a partir do início dos sintomas e sorologia (IgM e IgG) a partir do quinto dia. Nas pacientes assintomáticas, recomenda-se a coleta de sorologias juntamente com a rotina laboratorial de cada trimestre. O PRNT ainda não é um exame disponibilizado no Brasil.<sup>(19)</sup>

Até o presente momento, ainda é desconhecido o tempo pelo qual o PCR pode persistir positivo no sangue materno, havendo relatos de até 10 semanas de persistência.<sup>(14)</sup>

Nas gestantes com sorologia e/ou PCR positivos, o CDC recomenda avaliação ultrassonográfica a cada 3-4 semanas, em busca de alterações sugestivas de infecção fetal, cujo diagnóstico pode ser confirmado pela realização de PCR no líquido amniótico, de preferência 6-8 semanas após a infecção materna, porém ainda não está bem estabelecida sua sensibilidade.<sup>(16)</sup> O fluxograma 1, adaptado do CDC, expõe de forma didática a sequência de

etapas para a confirmação diagnóstica da infecção. A figura 2 resume, por sua vez, as recomendações atuais do MS para a condução dos casos:

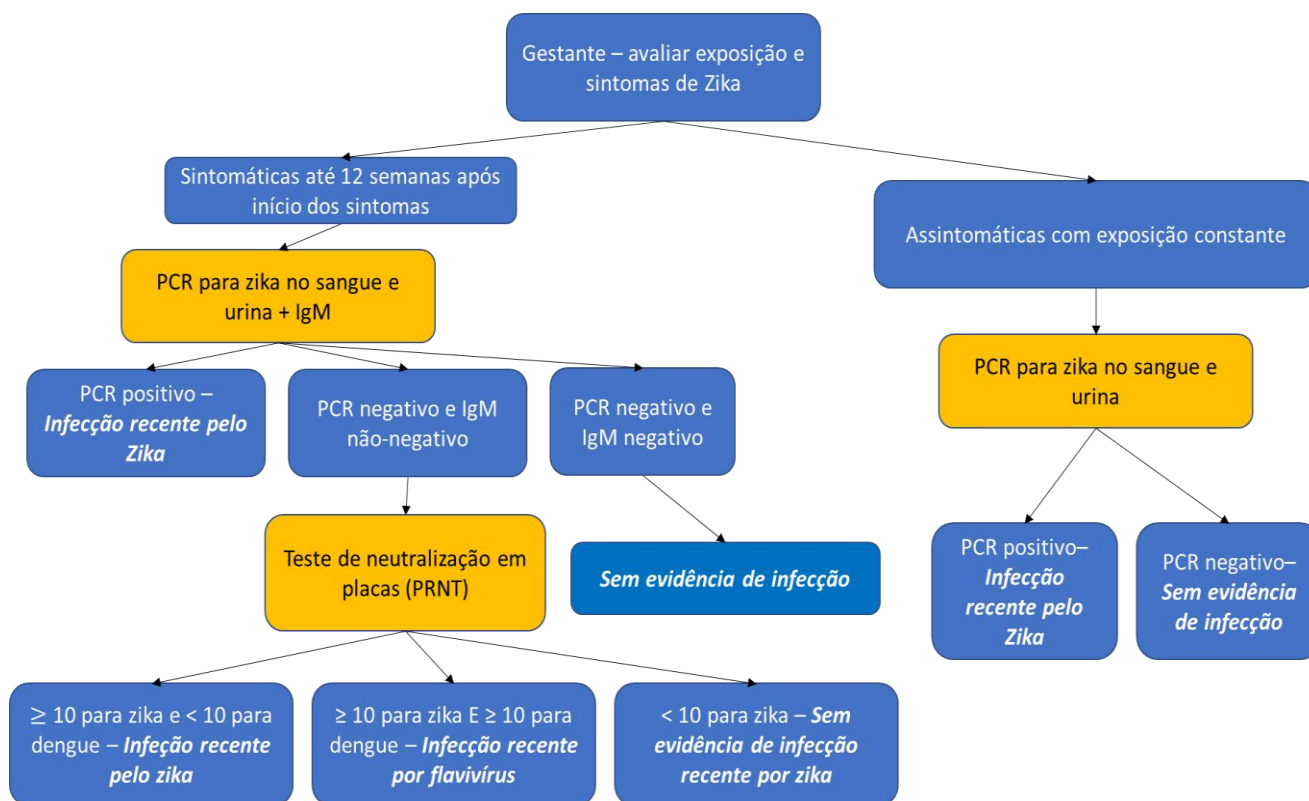


Figura 1 - Fluxograma adaptado de CDC US – Orientação provisória sobre gravidez. Atualizada em fevereiro de 2018. <sup>(16)</sup>

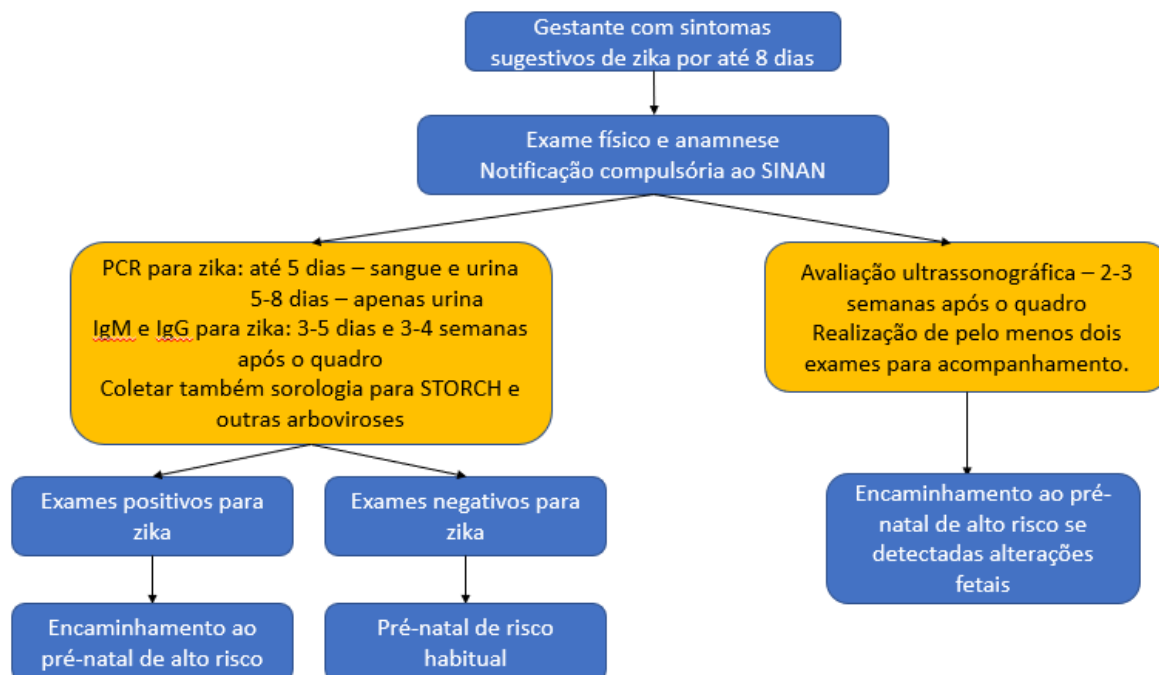


Figura 2 – Fluxograma adaptado do MS para diagnóstico e condução dos casos de zika na gestação. Última atualização em fevereiro de 2016. <sup>(19)</sup>

#### 4.4 TRATAMENTO

Não existe tratamento específico para o zika vírus, sendo recomendado tratamento de suporte com hidratação vigorosa, analgésicos e antitérmicos, como paracetamol e dipirona. Também não há, até o momento, nenhuma droga que altere o curso da infecção fetal, embora muitas medicações estejam em estudo, como inibidores da proteína NS3, inibidores de protease, anticorpos neutralizantes e drogas de uso já consagrado em outras enfermidades, como a niclosamida, a daptomicina e a pirimetamina. <sup>(20)</sup>

Deve-se orientar as pacientes suscetíveis sobre medidas de profilaxia da infecção como evitar viagens a áreas endêmicas, uso de repelentes e mínima exposição de área corporal e sobre o uso de preservativos durante as relações sexuais, de preferência durante toda a gestação.

Ainda estão em fase de testes clínicos possíveis antígenos candidatos a vacinas contra o vírus (vírus inativados, proteínas de membrana e proteínas do envelope viral), com resultados promissores em primatas não-humanos até o momento. <sup>(21-23)</sup>

#### 4.5 REPERCUSSÕES FETAIS

Ainda há poucas informações disponíveis quanto ao tempo de surgimento das primeiras alterações ultrassonográficas após o episódio de infecção materna; há relatos de alterações surgidas entre 18-20 semanas em pacientes com infecção no início da gestação. Sendo assim, tem-se recomendado a realização de avaliação ultrassonográfica 4 semanas após a infecção, com reavaliação a cada 4 semanas. <sup>(24)</sup>

A avaliação consiste em: biometria de rotina, com atenção para medidas do polo cefálico e detecção da microcefalia, que é definida como circunferência cefálica menor do que o percentil 3 ou 2 desvios-padrão para a idade gestacional (a microcefalia grave é definida como menor que 3 desvios-padrão); avaliação da anatomia fetal: forma do crânio, presença de calcificações intracranianas,

ventriculomegalia, disgenesia de corpo caloso, hipoplasia cerebelar, microftalmia e artrogripose. Na avaliação do crescimento dos fetos com microcefalia, deve-se atentar para exclusão das medidas do polo cefálico no cálculo do peso estimado fetal, o que poderia subestimar consideravelmente a estimativa de peso. <sup>(24)(6)</sup>

Um estudo realizado no Rio de Janeiro demonstrou certo grau de insuficiência placentária em decorrência da ação citopática do vírus na placenta, principalmente nos casos de infecções ocorridas no terceiro trimestre. Estes fetos apresentaram restrição de crescimento, alterações de parâmetros Dopplervelocimétricos à semelhança daquelas encontradas no modelo obstrutivo e oligodramnia.<sup>(8)</sup> Em contrapartida, um estudo do Ceará não evidenciou alteração Dopplervelocimétrica em nenhum dos casos estudados, incluindo fetos com restrição de crescimento.<sup>(5)</sup>

Waldorf et al. publicaram dois estudos nos quais descrevem, em populações de camundongos e primatas infectados pelo vírus zika, um padrão de crescimento fetal com significativo atraso na velocidade de crescimento das medidas da cabeça e do abdome, sem alterar o crescimento de ossos longos como o fêmur. <sup>(25,26)</sup> Walker et al. sugeriram que o mesmo processo pode ocorrer também em seres humanos, quando estudaram as relações biométricas em fetos expostos à infecção pelo ZIKV numa população de Nova Iorque, nos Estados Unidos. <sup>(27)</sup>

#### 4.6 A RESTRIÇÃO DE CRESCIMENTO FETAL

O crescimento e o desenvolvimento fetais dependem de uma eficiente transferência de nutrientes e oxigênio maternos. Nas primeiras semanas da gestação, a fixação dos vilos originados do citotrofoblasto dá início à formação de conexões vasculares entre a circulação materna e o espaço intervilosos. A superfície de contato dos vilos e o transporte ativo de substratos como glicose e aminoácidos aumentam a eficiência da troca materno-fetal, sendo seguidos pela invasão do citotrofoblasto extraviloso nas artérias espiraladas, o que reduz a

resistência ao fluxo sanguíneo uterino e aumenta o aporte de sangue para o feto em desenvolvimento.<sup>(28)(29)</sup>

Histologicamente, o crescimento no primeiro trimestre é marcado por intensa hiperplasia celular; no segundo trimestre, ocorrem simultaneamente hiperplasia e hipertrofia; e no terceiro, a hipertrofia celular é o fenômeno predominante, principalmente de tecido adiposo, com ganho ponderal fetal médio de 200-250 g por semana.<sup>(29)</sup>

Atualmente, a classificação mais aceita do peso ao nascimento se divide em: muito pequeno para a idade gestacional (menor que o percentil 3 para a idade gestacional), pequeno para a idade gestacional (PIG – menor que percentil 10), adequado para a idade gestacional (AIG – entre p10 e p90) e grande para a idade gestacional (GIG – maior que p90).<sup>(28)</sup>

O *Royal College of Obstetricians e Gynaecologists* adota como definições para feto pequeno para a idade gestacional: PFE abaixo do percentil 10 ou CA abaixo do percentil 10. Estas medidas classificam-se como graves se forem abaixo do percentil 3.<sup>(30)</sup>

Diversos tipos de insulto podem afetar o crescimento fetal em qualquer uma de suas etapas, reduzindo o número ou o tamanho das células ou ambos. Fetos pequenos podem ser acometidos de forma simétrica, com prejuízo de crescimento em todos os parâmetros biométricos, ou assimétrica, com redução principalmente da circunferência abdominal. O tipo de acometimento depende da etiologia da restrição, da época em que o insulto ocorrer e de sua duração.<sup>(31)(32)</sup>

A restrição de crescimento pode ter origem a partir de três compartimentos: materno, fetal e placentário. Muitas vezes, porém, esses fatores se confundem, não sendo possível definir uma etiologia precisa.<sup>(31)</sup>

Dentre os fatores maternos, pode-se destacar as doenças hipertensivas, doenças autoimunes, gestações múltiplas, uso de drogas e infecções. Diversos agentes infecciosos são associados à ocorrência de CIUR, como herpes, citomegalovírus (CMV) e toxoplasmose.

Como fatores fetais, as aneuploidias destacam-se como mais prevalentes, seguidas pelas demais síndromes genéticas euploides.

Por fim, como fatores placentários, sobressaem as malformações placentárias, placenta prévia, infartos placentários, anastomoses vasculares nas gestações múltiplas e defeitos de implantação devido a anomalias uterinas.

#### 4.7 A RESTRIÇÃO DE CRESCIMENTO FETAL NAS INFECÇÕES CONGÊNITAS

Estima-se que as infecções congênitas – STORCH (toxoplasmose, rubéola, CMV, herpes, sífilis e outras) sejam responsáveis por 5-15% dos casos de restrição de crescimento durante a gestação; no entanto, poucas são as vezes em que este é um achado isolado. <sup>(33,34)</sup>

Uma metanálise sobre os desfechos perinatais na infecção congênita pelo *Toxoplasma gondii* evidenciou que o risco total de transmissão durante a gravidez foi de 20%, sendo maior no terceiro trimestre. O grupo de pacientes infectadas apresentou *odds ratio* de 4,49 para o desfecho de CIUR e 4,92 para anomalias fetais, como ventriculomegalia, calcificações intracranianas e hepáticas e ascite. <sup>(35,36)</sup>

Na sífilis, a transmissão é maior durante a fase primária, afetando quase 80% dos conceptos nesta fase. Estudos mostram que a taxa de CIUR chega a 12,8% dos fetos infectados, sendo comumente acompanhado de hepatoesplenomegalia, hidropisia fetal, anemia e periostite. <sup>(37)</sup>

O CMV, por sua vez, apresenta maior taxa de transmissão durante a primoinfecção na gestação, com risco de até 40% em casos de infecção no primeiro trimestre. Os achados mais comuns associados a este agente são surdez congênita, atraso no desenvolvimento, restrição de crescimento, oligodramnia e calcificações intracranianas. Estudos recentes demonstram que, dentre os STORCH, o CMV foi o agente mais frequentemente associado ao CIUR idiopático, por vezes com sinais de insuficiência placentária. Estima-se uma incidência geral de restrição de crescimento de 11,7%. <sup>(38-40)</sup>



Na rubéola, o risco de ocorrência de CIUR é maior no primeiro trimestre, com uma taxa acumulada ao longo da gestação de 25%. Outros achados comuns na doença são defeitos cardíacos, catarata, retinite, microftalmia, hepatoesplenomegalia e surdez congênita. <sup>(41,42)</sup>

No contexto das infecções, a malária chama bastante a atenção em sua associação com CIUR, podendo afetar até 70% dos fetos em áreas endêmicas. A justificativa para esta alta incidência são as infecções recorrentes e a maior exposição ao efeito do patógeno, visto que essas gestantes já possuem certa imunidade para os quadros febris da doença e não evoluem para parto prematuro.<sup>(43)</sup>

Na zika, estudos preliminares estimaram a ocorrência em torno de 8-9% nos fetos expostos, apresentando grande associação com microcefalia e as outras alterações do sistema nervoso central, características da infecção. <sup>(8,44)</sup>

Outros agentes como herpes (durante primo-infecção) e HIV (principalmente se a contagem de linfócitos T CD4+ for menor que 200 no primeiro trimestre) também estão associadas à ocorrência de CIUR, porém em menor frequência.<sup>(36)</sup>

#### 4.8 A RESTRIÇÃO DE CRESCIMENTO E INSUFICIÊNCIA PLACENTÁRIA

A Dopplervelocimetria obstétrica é um método diagnóstico não-invasivo utilizado como rastreio de alterações hemodinâmicas causadas por estados hipoxêmicos e de sinais de insuficiência placentária, especialmente comuns nos fetos com restrição de crescimento. A avaliação pode ser feita a partir do compartimento materno pelo Doppler das artérias uterinas, forma utilizada como predição de risco para pré-eclâmpsia, insuficiência placentária e CIUR precoce; no compartimento fetoplacentário, a avaliação é feita através da artéria umbilical; e, no compartimento fetal, a artéria cerebral média e o ducto venoso são os vasos de maior utilização clínica.<sup>(45)</sup>

As artérias umbilicais são os indicadores utilizados para avaliação da insuficiência placentária e, em gestações normais, a resistência no fluxo das

umbilicais é inversamente proporcional à idade gestacional. Nos fetos com crescimento restrito ocorre o mecanismo inverso: o aumento nos índices de resistência e pulsatilidade destas artérias é o primeiro sinal de alteração da hemodinâmica fetal, podendo não ocorrer mesmo com até 50% de obstrução da árvore placentária.<sup>(46,47)</sup>

Persistindo a lesão placentária e a insuficiência, o feto inicia o processo de adaptação ao insulto hipoxêmico, como tentativa de preservar o fluxo sanguíneo para órgãos nobres como cérebro, coração e adrenais, fenômeno conhecido com centralização fetal. Neste processo, ocorre a diminuição na resistência ao fluxo de sangue na artéria cerebral média, com inversão da relação cerebroplacentária (RCP), importante fator preditivo de desfechos perinatais adversos.<sup>(48,49)</sup>

Diante deste cenário, a Dopplervelocimetria do ducto venoso presta-se a avaliar a resposta cardiovascular fetal; conforme ocorre a vasoconstrição periférica no processo de centralização, há um aumento da pressão nas câmaras cardíacas e, conseqüentemente, no compartimento venoso fetal. A alteração no índice de pulsatilidade do ducto venoso marca o início do processo de acidose fetal, aumentando a incidência de complicações neonatais.<sup>(50)</sup>

A conduta clínica adotada dependerá do grau de acometimento da função placentária, observado principalmente através do Doppler, e da idade gestacional encontrada. Esses protocolos estão cada vez mais bem estabelecidos na literatura obstétrica, mas norteiam principalmente as condutas em gestações acometidas exclusivamente pelo CIUR causado por insuficiência placentária.<sup>(51,52)</sup>

## 5. MATERIAIS E MÉTODO

### 5.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo longitudinal prospectivo, realizado no setor de Medicina Fetal do Departamento de Obstetrícia do Instituto Fernandes Figueira com gestantes expostas à infecção pelo vírus Zika no período de janeiro de 2016 a março de 2017.

### 5.2 APRECIÇÃO ÉTICA

O presente estudo faz parte de uma linha de pesquisa maior denominada *Exposição vertical ao zikavírus e suas consequências para o neurodesenvolvimento infantil*, já em andamento no IFF, CAAE 52675616000005269, sendo contemplado em seus objetivos específicos (item “e” – Descrever as alterações ultrassonográficas fetais e dos bebês expostos aos ZIKV, CHIKV e DENV e item “i” - Analisar a associação entre a exposição ao ZIKV e anomalias congênitas) e dispensando aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

### 5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Gestantes com confirmação laboratorial de infecção pelo vírus Zika durante a gravidez (PCR em sangue ou urina), independente de sintomas.

### 5.4 CRITÉRIO DE EXCLUSÃO

- Gestações gemelares.

## 5.5 TAMANHO DA AMOSTRA

Dado o caráter emergente da infecção pelo ZIKV, optou-se por usar uma amostra de conveniência com todas as pacientes encaminhadas ao setor de Medicina Fetal e que preenchiam os critérios de inclusão do estudo, totalizando 106 casos.

## 5.6 IDENTIFICAÇÃO DOS CASOS

As pacientes foram recebidas no Setor de Medicina Fetal, cadastradas no *software* utilizado para laudos ultrassonográficos (Astraia®), e tiveram sua gestação datada pelo início da última menstruação (DUM) ou pelo primeiro exame ultrassonográfico, realizado antes de 20 semanas. A datação pela ultrassonografia foi preferida nos casos em que a DUM era incerta ou se os ciclos menstruais eram irregulares; utilizou-se preferencialmente o exame do primeiro trimestre, que apresenta margem de erro sabidamente menor.<sup>(53)</sup>

## 5.7 COLETA DE DADOS

As pacientes passaram por entrevistas onde foram coletadas informações maternas como data de nascimento, paridade, comorbidades, história obstétrica, sintomas da infecção, resultados de exames laboratoriais e meios de contato. As fichas utilizadas encontram-se no Anexo 1. Quando não foi possível a coleta no momento da inclusão, as pacientes foram contatadas por telefone ou e-mail para complementação dos dados.

Os dados dos exames foram coletados a partir do banco de dados do Astraia® e organizados em bancos de dados do Excel®.

## 5.8 EXAME ULTRASSONOGRÁFICO

Os exames obstétricos foram realizados por médicos assistentes do Setor de Medicina Fetal do IFF com aparelhos Voluson Expert e E6 (General Electrics), por via abdominal e com transdutores convexos de 3,5 MHz, sendo realizadas: biometria fetal, Dopplervelocimetria obstétrica, avaliação do líquido amniótico e da morfologia fetal. Todos os médicos participantes apresentavam pelo menos dois anos de experiência em ultrassonografia obstétrica e certificado de especialista na área de atuação em ultrassonografia em ginecologia e obstetrícia (Colégio Brasileiro de Radiologia / Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia). Todos os exames foram revistos por um examinador sênior (Dr. José Paulo Pereira Júnior).

Os parâmetros biométricos obtidos no presente trabalho respeitam técnicas de mensuração já consagradas na literatura.

- Polo cefálico: na imagem axial da cabeça fetal, com os tálamos e o cavum do septo pelúcido, foram obtidos o diâmetro biparietal (DBP), medido da superfície externa do osso parietal proximal ao transdutor até a superfície interna do osso contralateral; e a circunferência cefálica (CC), medida em traçado elipsoide por toda a superfície externa do crânio.<sup>(54)</sup>

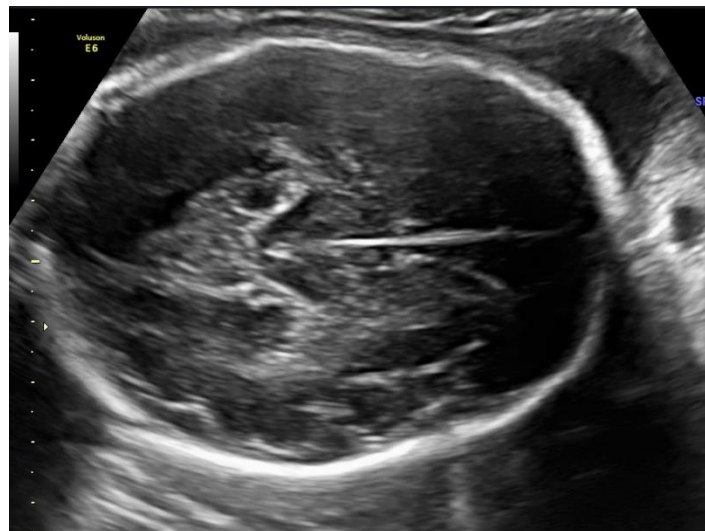


Figura 3 – Plano ultrassonográfico para medição do DBP e da CC.

- Abdome: a imagem foi obtida no eixo transverso do abdome fetal, perpendicular à coluna e tomando por pontos de referência o estômago e a junção das veias porta. A medida da circunferência abdominal (CA) foi feita de forma que contornasse toda a superfície externa do abdome, incluindo pele e tecido subcutâneo.<sup>(54)</sup>

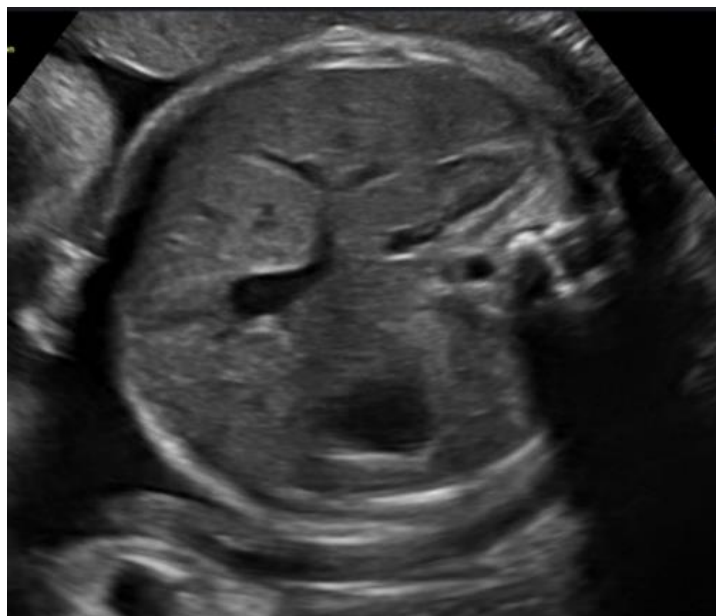


Figura 4 – Plano ultrassonográfico para medição da CA.

- Fêmur: o osso longo foi medido em seu eixo longitudinal, na imagem mais paralela possível ao transdutor, sendo medida apenas a diáfise ossificada.<sup>(54)</sup>

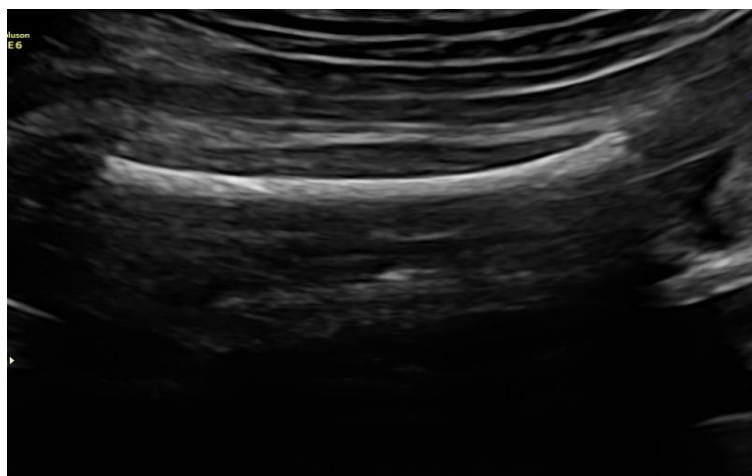


Figura 5 – Plano ultrassonográfico para medição do CF.

## 5.9 PROTOCOLO DE ESTUDO

As gestantes foram submetidas a exames ultrassonográficos mensais para acompanhamento do crescimento fetal ou em intervalos mais curtos, nos casos em que se fazia necessária maior vigilância obstétrica. Os casos foram, então, divididos em dois grupos: aqueles diagnosticados com restrição de crescimento (CIUR) e aqueles de crescimento normal (não-CIUR). O critério diagnóstico para CIUR neste trabalho foi a medida da CA menor que o 10º percentil para a idade gestacional, definição proposta pelo RCOG.<sup>(30)</sup> Para cada exame, as medidas de CC, CA e CF foram classificadas em percentis e Z-score, com base nos padrões do *International Fetal and Newborn Growth Consortium for the 21st Century (Intergrowth-21st)*.<sup>(55)</sup> O DPB não foi utilizado neste trabalho pois a técnica de obtenção utilizada no momento dos exames foi diferente daquela aplicada pelo *Intergrowth-21st*. Dados de Dopplervelocimetria das artérias umbilical e cerebral média também foram incluídos nesta análise.

Optamos pela estratificação por faixas de idade gestacional para melhor organização da análise. A classificação neonatal de peso foi feita também usando os padrões da *Intergrowth-21st*. Os exames foram estratificados em quatro grupos: de 18 semanas a 23 semanas e 6 dias, de 24 semanas a 27 semanas e 6 dias, de 28 semanas a 33 semanas e 6 dias e acima de 34 semanas; e os grupos foram analisados comparando valores de Z-score referentes às medidas de CC, CA e CF, considerando apenas o último exame de cada paciente em cada faixa de idade gestacional. Por fim, foi feita a comparação das curvas de evolução dessas medidas entre os dois grupos: CIUR e não-CIUR

## 5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise descritiva dos dados foi feita a partir das frequências de ocorrência (para variáveis categóricas), média e desvio-padrão (para variáveis numéricas). Uma análise bivariada foi realizada para identificação de características relacionadas às anomalias congênitas, via de parto, comorbidades maternas prévias e intercorrências na gestação, como diagnóstico de diabetes, pré-eclâmpsia ou rotura prematura de membranas. Para variáveis

numéricas foi utilizado o teste t-student e para variáveis categóricas o teste de qui-quadrado.

O estudo estatístico foi realizado utilizando-se o programa SPSS *statistical software*, versão 20 (IBM SPSS, Chicago, IL, USA). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos se  $p < 0,05$ .



## 6. ARTIGO SUBMETIDO A PUBLICAÇÃO<sup>1</sup>

American Journal of Obstetrics and Gynecology

Analysis of the pattern of fetal growth restriction in pregnancies exposed to zika virus infection in Rio de Janeiro.

Helder D. Gama, MD

Paulo R. N. Carvalho, PhD

José P. Pereira Jr, MSc

Saint Clair S. Gomes Jr, PhD

Instituto Nacional de Saúde da Criança, do Adolescente e da Mulher Fernandes Figueira – IFF/Fiocruz

Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – Brazil

<sup>1</sup> Em virtude da submissão do artigo em periódico que adota a língua inglesa, este encontra-se escrito em inglês e, devido à transferência de direitos autorais, optamos por apresentá-lo na forma do manuscrito pertencente aos autores.

## Abstract

Analysis of the pattern of fetal growth restriction in pregnancies exposed to zika virus infection in Rio de Janeiro.

Gama HD, Nassar Carvalho PR, Pereira Jr JP, and Gomes Jr SC

**Introduction** Zika fever is a neurotropic viral infection transmitted by mosquito bites, transplacentally or by infected human fluids and tissues. Congenital Zika infection may present as central nervous system abnormalities, ocular anomalies and growth restriction. A new pattern of growth restriction has been described for zika, suggesting the preservation of femoral growth. **Objective** To test this new hypothesis in a cohort of infected pregnant women who were monitored in a public tertiary health facility in Rio de Janeiro, Brazil. **Study design** A prospective longitudinal study comparing the evolution of biometric and Dopplervelocimetric parameters in fetuses displaying normal growth and growth-restricted fetuses. **Results** Twenty-seven patients were diagnosed with intrauterine growth restriction. All biometric measures were significantly different between groups, and the head and abdomen circumferences showed a difference of at least 2 standard deviations (SD) ( $p < 0.05$ ) in every gestational age stratum. The difference in femur length was more evident up to 28 weeks but did not exceed 1.5 SD. The Doppler analysis showed an increase in umbilical artery resistance starting at 24 weeks, with normal middle cerebral artery indices. **Conclusions** In zika-induced fetal growth restriction, head and abdominal circumferences were the measures showing the greatest changes, while the femur was less affected, suggesting a femur-sparing pattern of growth restriction. Evidence of placental

insufficiency was also obtained, but larger studies are necessary to confirm this finding.

## Abbreviations

AC – abdominal circumference

ACOG – American Congress of Obstetricians and Gynecologists

BPD – biparietal diameter

C-sec – cesarean section

FGR – fetal growth restriction

FL – femur length

GA – gestational age

HC – head circumference

IFF – Instituto Fernandes Figueira (Fiocruz)

ISUOG – International Society for Ultrasound in Obstetrics and Gynecology

IUGR – intrauterine growth restriction

MCA – middle cerebral artery

PI – pulsatility index

PROM – premature rupture of ovular membranes

PSV – peak systolic velocity

RCOG – Royal College of Obstetricians and Gynaecologists

SD – standard deviation

UA – umbilical artery

WHO – World Health Organization

ZIKV – zika virus

## INTRODUCTION

Zika fever is an emergent viral infection that was identified in South America in 2014. In Brazil, the first autochthonous transmission was reported in March 2015, with an epidemic spread occurring by the end of the year. In February, 2016, the World Health Organization (WHO) confirmed the causal relation between zika virus infection and microcephaly and declared zika a Public Health Emergency of International Concern, due to its pandemic spread. <sup>(1-4)</sup>

Zika virus (ZIKV) is a neurotropic flavivirus that attacks neural progenitor cells, impairing neuronal migration, multiplication and differentiation, as well as causing placental and muscular inflammation. The infection is transmitted by mosquito bites, transplacentally and by seminal fluid, blood transfusions and organ or tissue transplants. The maternal infection is often mild or asymptomatic and pregnancy does not alter the gravity or duration of the disease. <sup>(5-7)</sup>

The more frequently described fetal anomalies consist of ventriculomegaly, calcifications, reduced head circumference, lissencephaly, cerebellar dysgenesis and arthrogyrosis. Fetal growth restriction (FGR) has also been described as a systematic finding during ultrasound examinations. <sup>(8,9)</sup>

The aims of this article are to evaluate whether a pattern of intrauterine growth restriction (IUGR) exists in pregnancies exposed to zika virus infection followed in a tertiary health care facility in Rio de Janeiro and to describe the most common zika-associated abnormalities in this group of fetuses.

## MATERIALS AND METHODS

In this prospective longitudinal study, we recruited pregnant women who were referred to Instituto Fernandes Figueira (IFF/Fiocruz) and had a confirmed infection during the outbreak of zika in Brazil from January 2016 to March 2017. We considered that every woman who had a serum or urine reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) positive for zika was infected, regardless of the clinical manifestations. The study was approved by the Institutional Review Board at IFF/Fiocruz and written informed consent was obtained from all patients who agreed to participate in the study.

At the time of enrollment, a medical and obstetric history of the patients was collected, adequate dating of pregnancy was obtained according to recommendations of the American Congress of Obstetricians and Gynecologists (ACOG), and information on the signs and symptoms of zika and the timing of exposure during pregnancy was recorded.

The patients were followed with monthly ultrasound scans until delivery, whenever possible. The exams were performed by trained staff on a General Electric Voluson Expert and a Voluson E6, obtaining fetal biometric data (as recommended by the International Society for Ultrasound in Obstetrics and Gynecology - ISUOG)<sup>(10)</sup>, Doppler assessments of umbilical and middle cerebral arteries (also ductus venosus when necessary), amniotic fluid assessments and an anatomical survey were also conducted. All examiners were certified by the Brazilian College of Radiology and Diagnostic Imaging and the Brazilian Federation of Gynecology and Obstetrics Associations (FEBRASGO) and had at least two years of experience in fetal medicine; all exams were revised by a senior

examiner. Birth and neonatal data were obtained from a chart review. Twin gestations were excluded from the study.

Cases were divided into two groups: patients who had been or had not been diagnosed with FGR at any moment during pregnancy. For the definition of FGR, we used the measure of abdominal circumference (AC) less than the 10<sup>th</sup> percentile for gestational age (<10% for GA), as endorsed by the Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (RCOG).<sup>(11)</sup> We stratified the femur length (FL), head circumference (HC) and AC data and classified them according to the standards of the Intergrowth-21. The biometric and Doppler parameters were analyzed in different gestational age strata: from 18 to 23<sup>+6</sup> weeks, 24 to 27<sup>+6</sup> weeks, 28 to 33<sup>+6</sup> weeks and  $\geq 34$  weeks. The biparietal diameter (BPD) was not used in this analysis because the technique used by our group was different from Intergrowth-21<sup>st</sup>. Doppler velocimetry studies of the umbilical and middle cerebral arteries were also included in the analysis. For each gestational age stratum, only the data from the last exam for each patient were considered.

A descriptive analysis of the data was obtained from the mean and standard deviation of the Z-score for numerical variables and frequencies for categorical variables. A bivariate analysis of the aforementioned variables was obtained using Student's t-test and a chi-square test. Statistical analyses were performed using IBM SPSS statistical software, version 22 (Chicago, IL, USA). All results were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

One hundred eleven patients were initially enrolled in the study, with 5 twin gestations excluded. One hundred six pregnant women were eligible for this study. Forty-seven patients (44.3%) were primigravidas, 25 (23.5%) were in the second pregnancy, 19 (17.9%) in the third, and 10 (9.4%) had 4 or more pregnancies; this information was unavailable for five patients (4.7%). Six patients (5.7%) had been diagnosed with chronic hypertension, 1 (0.9%) had a history of recurrent miscarriage, 7 (6.6%) had other morbid conditions and 92 (86.8%) had no prior pathology. Twelve women (11.3%) developed preeclampsia, 3 (2.8%) developed gestational diabetes and 10 (9.4%) were diagnosed with premature rupture of membranes. No statistically significant difference in maternal morbid conditions was observed between groups.

Fetal growth restriction was detected in 27 pregnancies (25.4%), with 12 infections occurring in the first trimester (44.4%), 6 in the second trimester (22.2%) and 9 (33.3%) in which the timing of infection was unknown. For the non-FGR group, 21 infections occurred in the first trimester (26.6%), 53 in the second (67.1%) and 4 in the third (5.2%) and the data were unavailable only in 1 case (1.3%); the difference in these results between groups was statistically significant. Average gestational age at delivery was 37.6 weeks for the FGR group and 38.2 weeks for the non-FGR group. Cesarean section was the most common mode of delivery in both groups, accounting for 55.5% in the FGR group and 74.6% in the non-FGR group.

(INSERT TABLE 1)



In the normal growth group, we observed a mean Z-score for the HC of 0.106; 0.290 for AC and 0.023 for FL at 18 to 23<sup>+6</sup> weeks. From 24 to 27<sup>+6</sup> weeks, the mean Z-scores were: HC -0.140, AC 0.065 and FL 0.159. From 28 to 33<sup>+6</sup> weeks, the mean Z-score for HC was 0.451, for AC was 0.536 and for FL was 0.539. From 34 weeks onward, the mean Z-scores were: HC 0.132, AC 0.312 and FL 0.537.

In the FGR group, all biometric mean Z-scores were below the normal range for gestational age in every GA stratum. The following results were obtained: HC -2.250; AC -2.426 and FL -1.23 in the 18 to 23<sup>+6</sup> weeks stratum; from 24 to 27<sup>+6</sup> weeks, HC -4.920, AC -2.930 and FL -1.650; from 28 to 33<sup>+6</sup> weeks, HC -5.3862, AC -2.577 and FL -0.941, and from 34 weeks onward, HC -4.486, AC -2.091 and FL -0.760. Table 2 presents didactic biometric Z-scores, means and standard deviations of the two groups.

(INSERT TABLE 2)

Doppler pulsatility indices (PI) for the umbilical (UA) and middle cerebral arteries (MCA) and MCA peak systolic velocity (PSV) were also analyzed according to gestational age strata. A detailed description of the results is presented in Table 3.

For the fetuses displaying normal growth, the following results were obtained: mean UA PI 1.26, MCA PI 1.85, and MCA PSV 26.6 mm/s in the 18 to 23<sup>+6</sup> week stratum; from 24 to 27<sup>+6</sup> weeks, mean UA PI 1.10, MCA PI 1.85, and MCA PSV 31.7 mm/s; from 28 to 33<sup>+6</sup> weeks, UA PI 0.99, MCA PI 2.01, and MCA PSV 46.2 mm/s, and from 34 weeks onward, UA PI 0.84, MCA PI 1.75, and MCA PSV 56.2 mm/s.

For the growth-restricted fetuses, the mean cerebral PI did not differ substantially from the previous group, but the umbilical artery showed high resistance flow in every analyzed stratum. We observed a mean UA PI of 1.05, MCA PI 1.50, and MCA PSV 25.0 mm/s in the first stratum. In the second stratum, the UA PI was 1.54, MCA PI was 1.92, and MCA PSV was 31 mm/s. In the third stratum, the mean UA PI was 1.25, MCA PI was 1.94, and MCA PSV was 32.7 mm/s, and in the last stratum, the mean UA PI was 1.11, MCA PI was 1.58, and MCA PSV was 40.7 mm/s. A statistically significant difference in cerebral blood flow velocity was only observed later than 28 weeks of GA.

(INSERT TABLE 3)

➤ Associated fetal abnormalities

In our sample, growth-restricted fetuses exhibited a higher frequency of morphological defects, particularly in the central nervous system. Microcephaly was detected in 77.8% (21) of the cases, ventriculomegaly in 66.7% (18), intracranial calcifications in 70.4% (19), posterior fossa anomalies in 29.6% (8), and arthrogyrosis in 33.3% (9). Other less frequent anomalies were also observed in these fetuses, such as Blake's pouch cyst, micrognathia, redundant occipital skin and soft tissue edema; one case (3,7%) had hydranencephaly, which ended as a stillbirth. Perinatal death occurred in 25.9% of the growth-restricted fetuses. Table 4 describes frequencies and statistical significance of these variables.

(INSERT TABLE 4)

## COMMENTS

### Principal findings

Our study describes a cohort of 106 pregnant women with a confirmed zika virus infection during pregnancy and an analysis of the growth of these exposed fetuses. A femur-sparing pattern of growth restriction has been hypothesized recently in a North American study, suggesting a new pattern of FGR.<sup>(12)</sup> We reclassified the FGR population using the measure of an abdominal circumference less than the 10<sup>th</sup> percentile for gestational age to test this hypothesis.<sup>(11)</sup> The AC-based classification avoids the possible overdiagnosis of FGR in patients with ZIKV-induced microcephaly. This finding was obtained through the inclusion of lower cephalic measurements observed in this group of fetuses.

### Results

In this cohort, fetal biometric parameters differed considerably between FGR and non-FGR groups, from the first gestational age stratum to the end of gestation. The graphs presented above show a marked difference (more than 2 SD) in HC and AC Z-scores, and a less pronounced, but still statistically significant discrepancy, in the FL Z-scores. We understand that femoral growth may be partially impaired by zika infection but less affected than head and abdomen biometry. Head circumference was the most affected parameter, as expected, due to the neurotropic destructive effect of ZIKV<sup>(13–16)</sup>; nevertheless, abdominal and femoral growth were also affected, which may indicate a cytopathic effect on different progenitor cells other than neural progenitors, as suggested by an experimental study.<sup>(17)</sup> This cytopathic pattern of FGR is traditionally associated with other *in utero* infections, such as cytomegalovirus and rubella.<sup>(18)</sup>

A second finding of the present study is the observed decrease in Doppler cerebroplacental ratio between the first and second strata, which might represent a placental dysfunction during the second and third trimesters, when fetal metabolism is higher and requires a low-resistance flow in placental vessels. This finding was confirmed by the increase in the mean pulsatility index of the umbilical artery greater than the 90<sup>th</sup> percentile for gestational age in the same period for the growth-restricted fetuses. Some authors have already shown in human and non-human models that the inflammatory response to placental infection leads to the apoptosis of trophoblast cells and impairs vascular remodeling, thus increasing resistance in these vessels.<sup>(19-22)</sup> This finding differs from the traditional increase in umbilical resistance observed in the hypertensive obstructive model.<sup>(23)</sup>

A remarkable finding was the incidence of growth restriction in the study population. Previous papers have estimated a rate of 8-9%<sup>(24,25)</sup>, but we found an incidence of 25,4% (27 cases), which was supported by the finding of 21 liveborn infants (25,7%) who were postnatally classified as small for gestational age. This prevalence may be attributed to the definition of FGR adopted by our group. Theoretically, the isolated AC < 10% for the GA-based definition adopted in the present study represents a more specific diagnostic of growth restriction, avoiding the inclusion of fetuses with microcephaly, but the best diagnostic criteria for IUGR in fetuses with ZIKV infection remain to be confirmed.

#### Clinical and research implications

Our evidence shows the asymmetric growth impairment of ZIKV infection during pregnancy, alerting clinicians on the femur-sparing pattern of FGR. This

study also brings to light abnormalities in human placental blood flow previously described in non-human models. <sup>(20,22,26)</sup> Zika seems to alter oxygen transport within the placenta by causing vasculitis and villous damage, reducing permeability of the placental villi and raising blood flow resistance in uteroplacental circulation.

#### Strengths and limitations

Limitations of the study include its limited sample and the absence of uterine arteries Doppler assessment, which would improve fetal growth restriction evaluation. To the best of our knowledge, the present study employs a larger population than other studies in the medical literature specifically exploring IUGR and ZIKV. We obtained statistically significant results, but we propose that larger prospective studies are necessary to confirm these findings, particularly the Doppler velocimetry parameters.

#### CONCLUSIONS

In fetuses with growth restriction induced by ZIKV infection, head and abdominal circumferences are the most affected measures, while the femur is less affected, suggesting a femur-sparing pattern of growth restriction, as described by Walker et al.<sup>(12)</sup> Furthermore, evidence of specific placental insufficiency has increased, which may determine a different type of growth impairment that is both induced by direct viral effect on progenitor cells and damage to the placental structure and vascular flow, leading to high resistance flow in umbilical vessels. Large-scale prospective studies are needed to confirm these findings, but ZIKV truly appears to affect fetal growth in a different way than other congenital infections.

## TABLES AND GRAPHS

Table 1 – Characteristics of the study population

	FGR (N = 27)	Non-FGR (N = 79)	p-value
Maternal age (years)	30.4	26.5	0.007
1st trimester infection	12 (44.4)	21 (26.6)	< 0.001
2nd trimester infection	6 (22,2)	53 (67.1)	< 0.001
3rd trimester infection	0	4 (5,1)	< 0.001
Unknown trimester infection	9 (33.3)	1 (1.3)	< 0.001
GA at delivery (weeks)	37.6	38.2	0.123
Vaginal delivery	12 (44.4)	20 (25.3)	0.088
Cesarean sections	15 (55.5)	59 (74.6)	0.088
Emergency C-sec	4 (14.8)	12 (15.2)	0.617
Preeclampsia	4 (14.8)	8 (10.1)	0.322
Gestational diabetes	0	3 (3.7)	0.322
Chronic hypertension	1 (3.7)	5 (6.3)	0.468
PROM	2 (7.4)	8 (10.1)	0.322
Recurrent miscarriages	0	1 (1.2)	0.468

Values expressed in number (%)

Table 2 – Means and SD of fetal biometric parameters (Z-scores)

GA (weeks)	FGR		Non-FGR		p-value
	Mean	SD	Mean	SD	
HC					
18 to 23 <sup>+6</sup>	-2.250	0.959	0.106	1.148	0.002
24 to 27 <sup>+6</sup>	-4.920	4.068	-0.140	1.776	0.002
28 to 33 <sup>+6</sup>	-5.386	3.000	0.451	1.619	0.000
≥34	-4.486	3.592	0.132	2.224	0.000
AC					
18 to 23 <sup>+6</sup>	-2.426	-0.551	0.290	0.758	0.000
24 to 27 <sup>+6</sup>	-2.930	2.582	0.065	1.002	0.001
28 to 33 <sup>+6</sup>	-2.577	1.573	0.536	0.719	0.000
≥34	-2.091	1.344	0.312	0.870	0.000
FL					
18 to 23 <sup>+6</sup>	-1.230	1.300	0.023	0.864	0.028
24 to 27 <sup>+6</sup>	-1.650	1.525	0.159	1.228	0.035
28 to 33 <sup>+6</sup>	-0.941	1.761	0.539	0.912	0.000
≥34	-0.760	1.569	0.537	0.950	0.000

Table 3 – Means and SDs of fetal Doppler velocimetric parameters

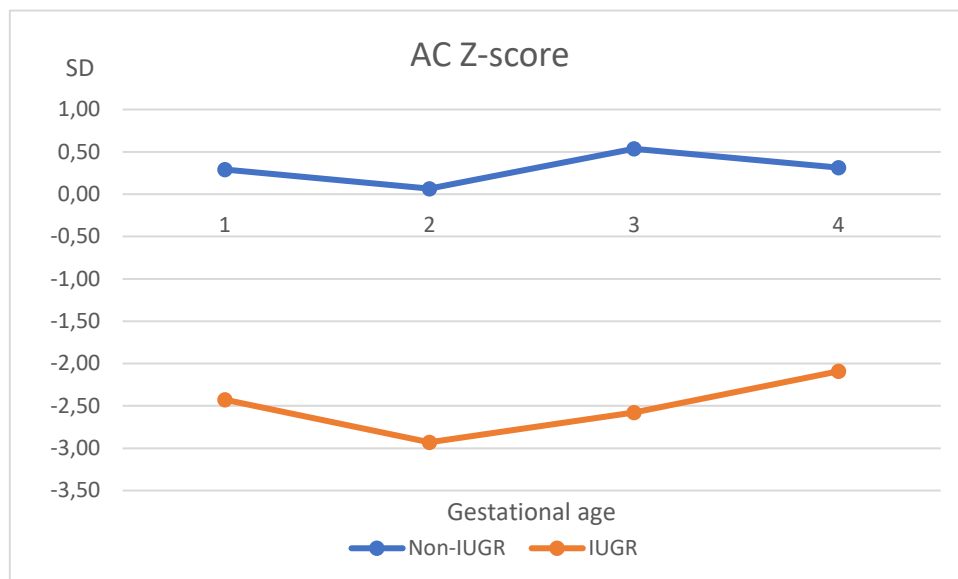
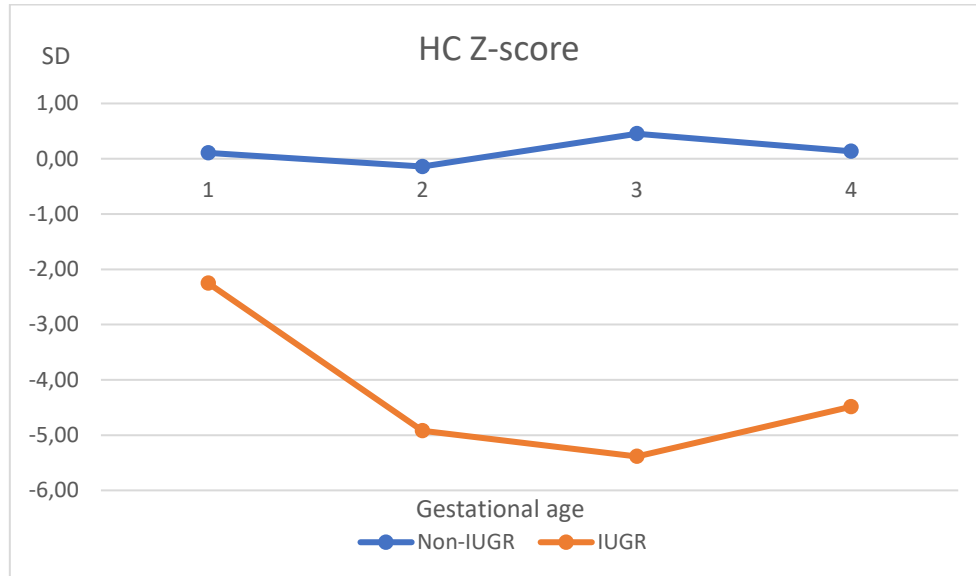
GA (weeks)	FGR		Non-FGR		
UA PI	Mean	SD	Mean	SD	p-value
18 to 23 <sup>+6</sup>	1.05	--	1.26	0.21	0.350
24 to 27 <sup>+6</sup>	1.54	0.23	1.10	0.20	0.005
28 to 33 <sup>+6</sup>	1.25	0.34	0.99	0.15	0.000
≥34	1.11	0.35	0.84	0.15	0.000
MCA PI					
18 to 23 <sup>+6</sup>	1.50	--	1.85	0.56	0.542
24 to 27 <sup>+6</sup>	1.92	0.04	1.85	0.36	0.790
28 to 33 <sup>+6</sup>	1.94	0.37	2.01	0.40	0.595
≥34	1.58	0.42	1.75	0.42	0.231
MCA PSV (mm/s)					
18 to 23 <sup>+6</sup>	25.0	--	26.6	4.4	0.718
24 to 27 <sup>+6</sup>	31.0	--	31.7	9.0	0.936
28 to 33 <sup>+6</sup>	32.7	19.8	46.2	9.2	0.002
≥34	40.7	16.2	56.2	12.9	0.003

Table 4 – Associated abnormalities

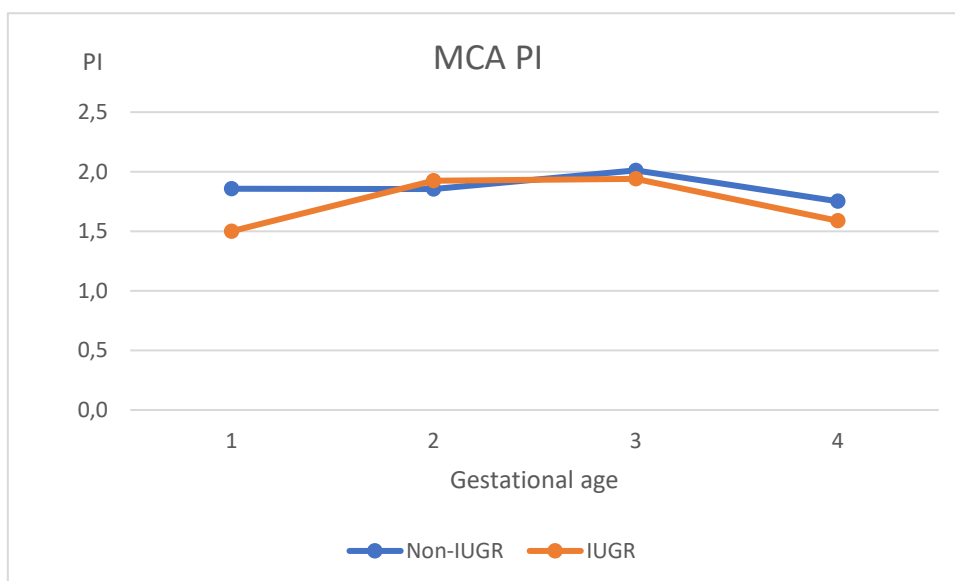
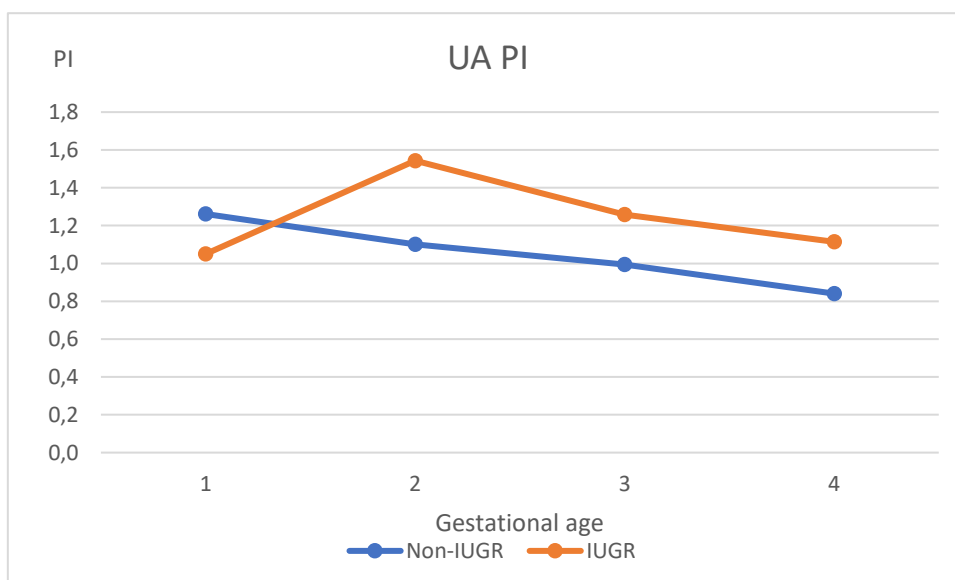
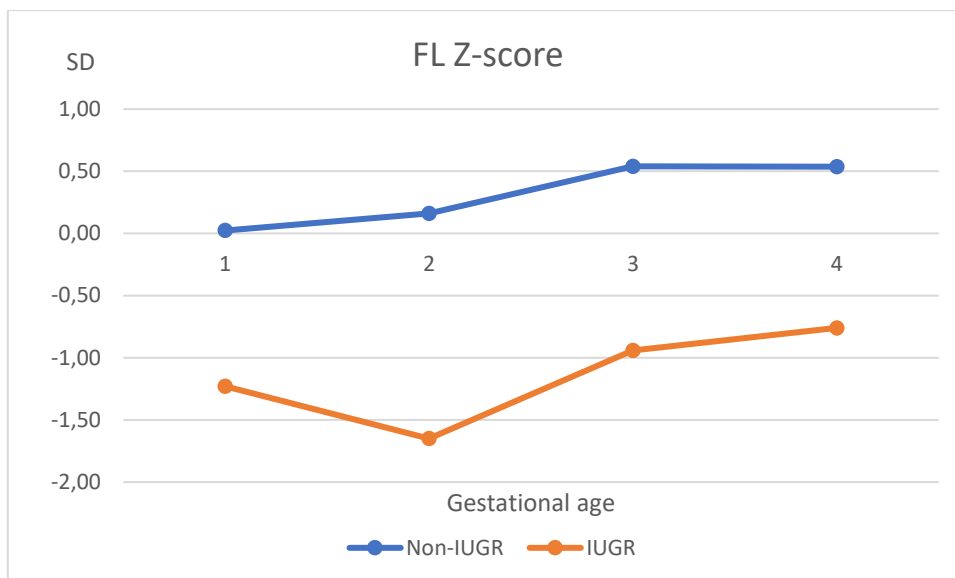
	FGR (N = 27)	Non-FGR (N= 79)	p-value
Microcephaly	21 (77.8)	4 (5.1)	< 0.01
Intracranial calcifications	19 (70.4)	6 (7.6)	< 0.01
Ventriculomegaly	18 (66.7)	7 (8.9)	< 0.01
Cerebellar anomalies	8 (29.6)	2 (2.5)	< 0.01
Vermian anomalies	8 (29.6)	2 (2.5)	< 0.01
Hydrocephaly	0	3 (3.8)	0.410
Arthrogyposis	9 (33.3)	0	< 0.01
Cardiopathy	2 (2.5)	1 (3.7)	0.590
Non-immune hydrops	2 (7.4)	0	0.063
Other malformations	18 (66.7)	13 (16.5)	< 0.01
Oligohydramnios	6 (22.2)	1 (1.3)	< 0.01
Polyhydramnios	3 (11.1)	3 (3.8)	0.171
Perinatal death	7 (25.9)	1 (1.3)	< 0.01

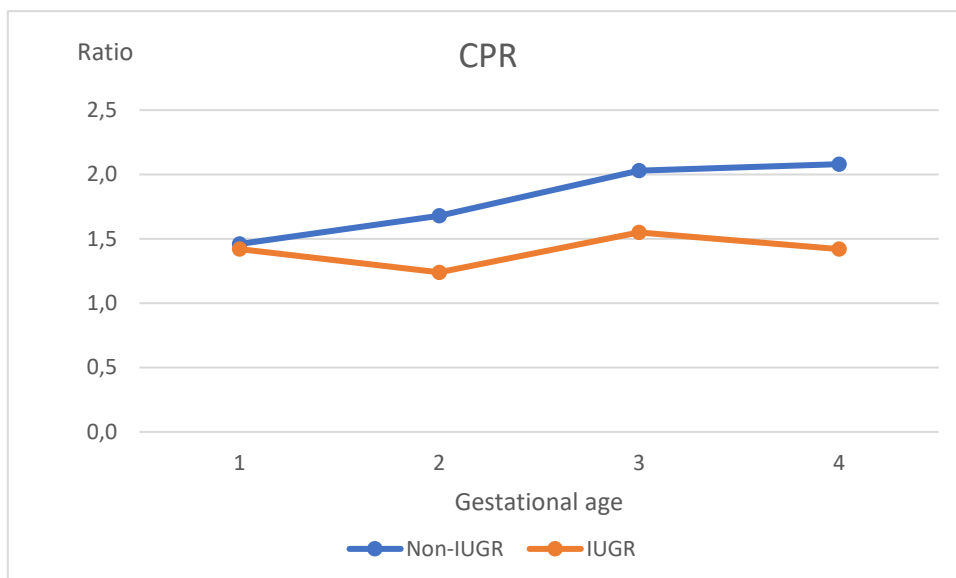
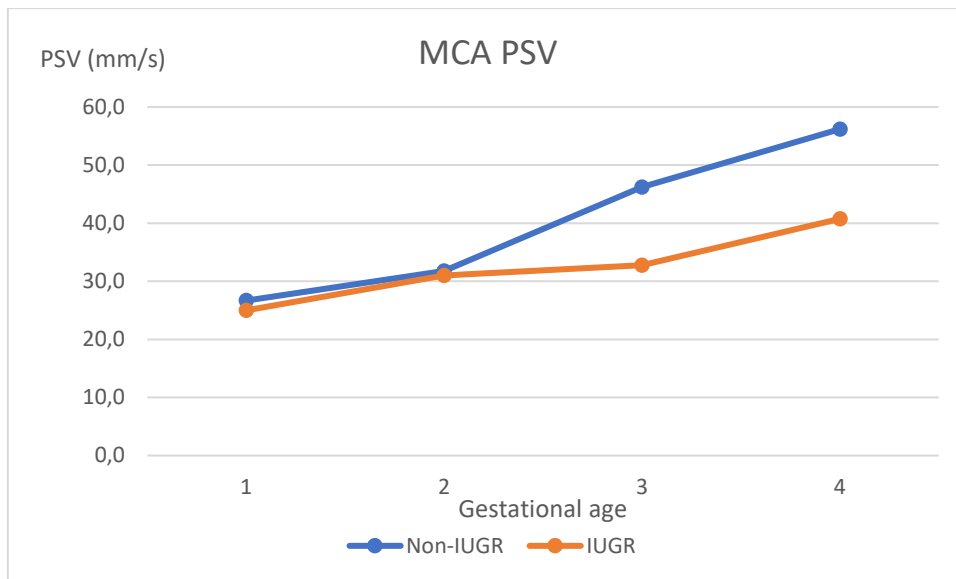
Values are presented as numbers (%).

Graphs – These graphs illustrate mean Z-scores for biometric and Doppler indices throughout pregnancy. The numbers 1, 2, 3 and 4 on the x-axis represent the GA in trimester strata, as follows: 1 - 18 to 23<sup>+6</sup> weeks, 2 - 24 to 27<sup>+6</sup> weeks, 3 - 28 to 33<sup>+6</sup> weeks and 4 -  $\geq$  34 weeks.









## REFERENCES

1. Chang C, Ortiz K, Ansari A, Gershwin ME. The Zika outbreak of the 21st century. *J Autoimmun* [Internet]. 2016;68:1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2016.02.006>
2. França GVA, Schuler-Faccini L, Oliveira WK, Henriques CMP, Carmo EH, Pedi VD, et al. Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. *Lancet* (London, England). 2016;388(10047):891–7.
3. BRASIL. Vírus Zika no Brasil a resposta do SUS [Internet]. 2017. 136 p. Available from: [https://sistemas.mre.gov.br/kitweb/datafiles/SaoFrancisco/pt-br/file/Fact\\_Sheet\\_Zika\\_Virus\\_Marco16.pdf](https://sistemas.mre.gov.br/kitweb/datafiles/SaoFrancisco/pt-br/file/Fact_Sheet_Zika_Virus_Marco16.pdf)
4. World Health Organization. WHO statement on the first meeting of the International Health Regulations (2005) (IHR 2005) Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations [Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 13]. Available from: <https://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/1st-emergency-committee-zika/en/>
5. Zanluca C, De Melo VCA, Mosimann ALP, Dos Santos GIV, dos Santos CND, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(4):569–72.
6. Chan JFW, Choi GKY, Yip CCY, Cheng VCC, Yuen KY. Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease. *J Infect* [Internet]. 2016;72(5):507–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2016.02.011>

7. Desai SK, Hartman SD, Jayarajan S, Liu S, Gallicano GI. Zika Virus (ZIKV): a review of proposed mechanisms of transmission and associated congenital abnormalities. *Am J Stem Cells*. 2017;6(December 2016):13–22.
8. Vouga M, Baud D. Imaging of congenital Zika virus infection: the route to identification of prognostic factors. *Prenat Diagn*. 2016;36(9):799–811.
9. de Souza AS, de Oliveira-Szjenfeld PS, de Oliveira Melo AS, de Souza LAM, Batista AGM, Tovar-Moll F. Imaging findings in congenital Zika virus infection syndrome: an update. *Childs Nerv Syst [Internet]*. 2017;85–93. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00381-017-3637-1>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29181810>
10. Papageorghiou, AT Thilaganathan B, Bilardo C. ISUOG Interim Guidance on ultrasound for Zika virus infection in pregnancy: information for healthcare professionals. *Ultrasound Obs Gynecol* 2016; 2016;(March):530–2.
11. RCOG. The Investigation and Management of the Small – for – Gestational – Age Fetus. *R Coll Obstet Gynaecol*. 2014;Green-top(31).
12. Walker CL, Merriam AA, Ohuma EO, Dighe MK, Gale M, Rajagopal L, et al. Femur-sparing pattern of abnormal fetal growth in pregnant women from New York City after maternal Zika virus infection. *Am J Obstet Gynecol*. 2018;219(2):187.e1-187.e20.
13. Shao Q, Herrlinger S, Yang S-L, Lai F, Moore JM, Brindley MA, et al. Zika virus infection disrupts neurovascular development and results in postnatal microcephaly with brain damage. *Development [Internet]*. 2016;143(22):4127–36. Available from: <http://dev.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dev.143768>

14. Honein MA, Dawson AL, Petersen EE, Jones AM, Lee EH, Yazdy MM, et al. Birth Defects Among Fetuses and Infants of US Women With Evidence of Possible Zika Virus Infection During Pregnancy. *Jama* [Internet]. 2016;303(1):59–68. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2016.19006>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27960197>
15. Cuevas EL, Tong VT, Rozo N, Valencia D, Pacheco O, Gilboa S, et al. Preliminary Report of Microcephaly Potentially Associated with Zika Virus Infection During Pregnancy- Colombia, January-November 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016;65(49):1409–13.
16. Parra-Saavedra M, Reefhuis J, Piraquive JP, Gilboa SM, Badell ML, Moore CA, et al. Serial Head and Brain Imaging of 17 Fetuses With Confirmed Zika Virus Infection in Colombia, South America. *Obstet Gynecol* [Internet]. 2017;0(0):1. Available from: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00006250-900000000-98385>
17. Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, Freitas BC, Dias JLM, Guimarães KP, et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature* [Internet]. 2016;534(7606):267–71. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature18296>
18. Adams Waldorf KM, McAdams RM. Influence of infection during pregnancy on fetal development. *Reproduction* [Internet]. 2013;146(5):R151-62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23884862>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4060827>

19. Adibi JJ, Marques ETA, Cartus A, Beigi RH. Teratogenic effects of the Zika virus and the role of the placenta. *Lancet* [Internet]. 2016;387(10027):1587–90. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00650-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00650-4)
20. Morgan TK, Legasse AW, Wang X, Frias AE, Axthelm MK, Kelleher M, et al. Zika virus infection in pregnant rhesus macaques causes placental dysfunction and immunopathology. *Nat Commun* [Internet]. 2018;9(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-02499-9>
21. Ribeiro MR, Moreli JB, Marques RE, Papa MP, Meuren LM, Rahal P, et al. Zika-virus-infected human full-term placental explants display pro-inflammatory responses and undergo apoptosis. *Arch Virol* [Internet]. 2018;163(10):2687–99. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3911-x>
22. Miner JJ, Cao B, Govero J, Smith AM, Cabrera OH, Garber C, et al. Zika virus infection during pregnancy in mice causes placental damage and fetal demise. *Cell*. 2016;165(5):1081–91.
23. Figueras F, Gratacos E. An integrated approach to fetal growth restriction. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* [Internet]. 2017;38:48–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2016.10.006>
24. Brasil P, Moreira ME, Nogueira RMR, Damasceno L, Wakimoto M, Rabello RS, et al. Zika Virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med*. 2017;375(24):2321–34.
25. Pereira Jr JP, Nielsen-Saines K, Sperling J, Dutra BRT, Maykin MM, Gama HD, et al. Association of Prenatal Ultrasonographic Findings With

Adverse Neonatal Outcomes Among Pregnant Women With Zika Virus Infection in Brazil. *JAMA Netw Open*. 2018;1(8):e186529.

26. Robinson N, Mayorquin Galvan EE, Zavala Trujillo IG, Zavala-Cerna MG. Congenital Zika syndrome: Pitfalls in the placental barrier. *Rev Med Virol*. 2018;28(5):1–7.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Retomando o que foi exposto nas seções iniciais, esta Dissertação apresenta um recorte do espectro de alterações encontradas na zika congênita, focando na caracterização da restrição de crescimento fetal. Trata-se de um achado relativamente frequente e que está presente em grande associação com outras malformações atribuíveis ao ZIKV. No entanto, ainda é um tópico muito pouco explorado na literatura médica.

Nosso trabalho foi capaz de demonstrar o grau de comprometimento causado pelo vírus no crescimento de diferentes sistemas fetais, em conformidade com achados que já haviam sido descritos em outro estudo em humanos.<sup>(27)</sup> A avaliação por meio do Doppler, ainda que limitada por ter sido feita apenas pelas artérias umbilical e cerebral média, evidenciou sinais de insuficiência placentária de provável etiologia viral, já caracterizada em modelos experimentais não-humanos.<sup>(56,57)</sup>

Acreditamos que este seja o primeiro trabalho a explorar de maneira mais detalhada o crescimento e a função placentária neste grupo de fetos. Entretanto, do ponto de vista científico, reforçamos a necessidade de estudos maiores e prospectivos para que seja possível a confirmação destes achados.



## 8. ANEXOS

### 8.1 FICHAS DE COLETA DE DADOS

- Ficha 1 – Identificação da paciente

#### PACIENTES COM DIAGNÓSTICO CONFIRMADO DE ZIKA (PCR POSITIVO)

DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/201\_\_

( ) Primeiro exame ( ) número do exame subsequente \_\_\_\_o

**IDENTIFICAÇÃO:** REGistro IFF: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

CPF: \_\_\_\_\_

Data de Nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_anos

Celular: ( ) \_\_\_\_\_ Tel Fixo: ( ) \_\_\_\_\_

Tel Marido/Parente ( ) \_\_\_\_\_ ( parentesco \_\_\_\_\_ )

Tel trabalho: ( ) \_\_\_\_\_

Email: \_\_\_\_\_

Facebook: \_\_\_\_\_ Twiter: \_\_\_\_\_

Usa Whatsapp? ( ) Sim ( ) Não Podemos usar? ( ) (Sim ( ) Não

#### DADOS DA GESTAÇÃO:

DUM: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ IG DUM: \_\_\_\_sem \_\_\_\_dias

Data 1º US: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Biometria \_\_\_\_sem \_\_\_\_dias iG hoje US \_\_\_\_s \_\_\_\_dias

IG hoje pela melhor avaliação: : \_\_\_\_sem \_\_\_\_dias (( ) DUM ( ) US)

#### INFORMAÇÕES ZIKA:

Data início rash ou outros : \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ IG início rash: \_\_\_\_sem \_\_\_\_dias

Data coleta PCR: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Resultado PCR: ( ) Pos ( ) Neg

Material positivo: Sangue Urina Sangue+urina Liq amnio Sangue\_fetal

Local colheu PCR? ( ) INI/Fiocruz ( ) Posto Saúde ( ) IFF ( ) outros \_\_\_\_\_

- Ficha 2 – História obstétrica

Patient Name \_\_\_\_\_ Reg IFF: \_\_\_\_\_

1. Gravity = \_\_\_\_\_
2. Parity = \_\_\_\_\_
3. Abortions Total: \_\_\_\_\_
4. Abort Natural= \_\_\_\_\_
5. Abort artificial= \_\_\_\_\_
6. Multiple gestational= \_\_\_\_\_

**Prior Medical History:**

Chronical Hypertension	1. Yes	2. Not	3. Ignored
Diabetes with/Without Insulin	1. Yes	2. Not	3. Ignored
Gestational Diabetes	1. Yes	2. Not	3. Ignored
Thrombophilia	1. Yes	2. Not	3. Ignored
Repeat Miscarriages (+than 2)	1. Yes	2. Not	3. Ignored
HIV	1. Yes	2. Not	3. Ignored
Others	1. Yes	2. Not	3. Ignored

Wich others Prio history \_\_\_\_\_

**Pregnancy complications:**

Preeclampsia/Eclampsia	1. Yes	2. Not	3. Ignored
Hellp Syndrome	1. Yes	2. Not	3. Ignored
Gestaional Diabetes	1. Yes	2. Not	3. Ignored
PROM	1. Yes	2. Not	3. Ignored
PREMATURE LABOR	1. Yes	2. Not	3. Ignored

- Ficha 3 – Ficha de parto

FICHA DE PARTO ZIKA **ANEXO 1**

1. Nome Mãe: \_\_\_\_\_ (RegIFF \_\_\_\_\_) 2. NumeroPac: \_\_\_\_\_

3. Nome RN: \_\_\_\_\_ RegRN: \_\_\_\_\_

4. Data parto: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ 4.1. Idade RN em Dias: \_\_\_\_\_ dias

5. IG parto: \_\_\_\_\_ sem and \_\_\_\_\_ dias 6. Hospital: IFF other \_\_\_\_\_

7. Tipo parto: 1. Normal 2. C-Sec 3. Forceps 4. Outros

8. C-Sec emergencia? 1. Sim 2. Não 9. C-Sec indicação: \_\_\_\_\_

10. CTG basal? 1. Normal 2. Anormal 3. NãoReal 4. Ignorado

11. Morte perinatal? 1. Sim 2. Não 12. Momento óbito: 0. Não 1. Nati 2. <8 dias 3. < 28 dias

13. Apagar 1 o min \_\_\_\_\_ 5o min \_\_\_\_\_ 10o min \_\_\_\_\_

14. Capurro \_\_\_\_ sem \_\_\_\_ dias 15. Ballard \_\_\_\_ sem \_\_\_\_ dias

16. Sexo RN ( 1 ) Masculino ( 2 ) Feminino ( 3 ) Ambiguo ( 4 ) Ignorado

17. Peso Fetal \_\_\_\_\_ grams 18. F Height \_\_\_\_\_ cm 19. Cephalic perimeter \_\_\_\_\_ cm

20. Placenta peso: \_\_\_\_\_ grams 21. Tipo placenta: ( 1 ) Normal ( 2 ) Anormal ( 3 ) NR ( 4 ) IGN

22. Anatomia Patológica: ( 1 ) Sim ( 2 ) Não 23. Classificação of RN: 1. AIG 2. PIG 3. GIG

24. UTI\_Neo? ( 1 ) Sim ( 2 ) Não 25. sE SIM, Quantos dias? \_\_\_\_\_ dias

26. Exame físico RN antes da alta: ( 1 ) Normal ( 2 ) Anormal 27. Amamentou no parto? ( 1 ) Sim ( 2 ) Não

28. Anomalias Congênitas ( 1 ) Sim ( 2 ) Não 29. Cariotipe: ( 1 ) Normal ( 2 ) Anormal ( 3 ) NR

30. Qual An Congênita? \_\_\_\_\_

31. US transfontanela (TF): ( 1 ) Normal ( 2 ) Anormal ( 3 ) NR \_\_\_\_\_

32. CT: ( 1 ) Normal ( 2 ) Anormal ( 3 ) NR \_\_\_\_\_

33. RNM: ( 1 ) Normal ( 2 ) Anormal ( 3 ) NR \_\_\_\_\_

34. Oftalmo/ Retcam: ( 1 ) Normal ( 2 ) Anormal ( 3 ) NR \_\_\_\_\_

35. Oto exam: ( 1 ) Normal ( 2 ) Anormal ( 3 ) NR \_\_\_\_\_

36. Data da alta hospitalar: \_\_\_\_/\_\_\_\_/201\_\_\_\_

## 8.2 CARTA DE APROVAÇÃO DO CEP

### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Exposição Vertical ao Zika Virus e suas conseqüências no neurodesenvolvimento da criança

**Pesquisador:** maria elisabeth

lopes moreira **Área Temática:**

**Versão:** 7

**CAAE:** 52675616.0.0000.5269

**Instituição Proponente:** Instituto Fernandes Figueira - IFF/ FIOCRUZ - RJ/ MS

**Patrocinador Principal:** Instituto Fernandes Figueira - IFF/ FIOCRUZ - RJ/ MS  
MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E  
INOVACAO The Wellcome Trust

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.634.276

#### Apresentação do Projeto:

Emenda.

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo da emenda:

Incluir instrumento para entrevistas com mães e inserir nos objetivos o teste de acuidade visual.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos relacionados a participação na pesquisa são os inerentes a coleta de sangue tais como hematomas e dor. Os exames oftalmológicos necessitam de colírios para dilatar a pupila o que pode ocasionar ardência transitória. Ultrassonografias não doem e outros exames que envolvam radiação só serão realizados se houver alteração na ultrassonografia. Os exames para testar o desenvolvimento adequado do bebê são indolores e apenas necessitam de um certo tempo para realização. O exame do líquido amniótico só será realizado se houver indicação obstétrica para um melhor cuidado do bebê.

Benefícios:

Os benefícios estão ligados ao acompanhamento da gestante e do desenvolvimento do seu recém-nascido no IFF, com exames que em geral não seriam realizados.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisadora apresenta emenda para inclusão de questionário sobre depressão que será aplicado às mães e incluir nos objetivos o teste de acuidade visual.

A pesquisadora incluiu no projeto as alterações apresentadas.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Anexados ao projeto.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_111194_4_E6.pdf	17/04/2018 15:32:41		Aceito
Outros	QuestionarioDepressao.pdf	17/04/2018 15:31:37	maria elisabeth lopes moreira	Aceito
Brochura Pesquisa	EmendaProjetoZika.doc	17/04/2018 15:30:55	maria elisabeth lopes moreira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle nao exposto.doc	16/01/2018 15:12:39	maria elisabeth lopes moreira	Aceito
Outros	instrumento pesquisas social.docx	09/05/2017 11:01:07	maria elisabeth lopes moreira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	emenda4zika.doc	09/05/2017 10:59:42	maria elisabeth lopes moreira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	RevisaoZika3.doc	25/02/2017 16:06:15	maria elisabeth lopes moreira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcleRNversao3.doc	25/02/2017 16:05:17	maria elisabeth lopes moreira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	tcleversao3gestante.doc	25/02/2017 16:04:18	maria elisabeth lopes moreira	Aceito
Justificativa de Ausência	tcleversao3gestante.doc	25/02/2017 16:04:18	maria elisabeth lopes moreira	Aceito

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	assentimentoparaexternos1RN.doc	24/05/2016 16:01:27	Ana Maria Aranha Magalhães Costa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	assentimentogestante.doc	24/05/2016 16:00:50	Ana Maria Aranha Magalhães Costa	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biorepositorio.pdf	23/05/2016 11:33:58	maria elisabeth lopes moreira	Aceito
Declaração do Patrocinador	cartaSCTIE.pdf	23/05/2016 11:13:13	maria elisabeth lopes moreira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	RevisaoZika.doc	23/05/2016 10:17:23	maria elisabeth lopes moreira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	neonatologia.pdf	22/01/2016 16:44:50	maria elisabeth lopes moreira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	pediatria.pdf	22/01/2016 16:44:28	maria elisabeth lopes moreira	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	22/01/2016 16:43:15	maria elisabeth lopes moreira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	obstetricia.pdf	22/01/2016 16:35:54	maria elisabeth lopes moreira	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIO DE JANEIRO, 03 de Maio de 2018

---

**Assinado por:**  
**Ana Maria Aranha Magalhães Costa**  
**(Coordenador)**

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chang C, Ortiz K, Ansari A, Gershwin ME. The Zika outbreak of the 21st century. *J Autoimmun* [Internet]. 2016;68:1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2016.02.006>
2. França GVA, Schuler-Faccini L, Oliveira WK, Henriques CMP, Carmo EH, Pedi VD, et al. Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. *Lancet* (London, England). 2016;388(10047):891–7.
3. BRASIL. Vírus Zika no Brasil a resposta do SUS [Internet]. 2017. 136 p. Available from: [https://sistemas.mre.gov.br/kitweb/datafiles/SaoFrancisco/pt-br/file/Fact\\_Sheet\\_Zika\\_Virus\\_Marco16.pdf](https://sistemas.mre.gov.br/kitweb/datafiles/SaoFrancisco/pt-br/file/Fact_Sheet_Zika_Virus_Marco16.pdf)
4. Coyne CB, Lazear HM. Zika virus-reigniting the TORCH. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2016;14(11):707–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2016.125>
5. Carvalho FHC, Cordeiro KM, Peixoto AB, Tonni G, Moron AF, Feitosa FEL, et al. Associated ultrasonographic findings in fetuses with microcephaly because of suspected Zika virus (ZIKV) infection during pregnancy. *Prenat Diagn*. 2016;36(9):882–7.
6. Vouga M, Baud D. Imaging of congenital Zika virus infection: the route to identification of prognostic factors. *Prenat Diagn*. 2016;36(9):799–811.
7. American College of Obstetricians and Gynecologists. Fetal Growth Restriction. *ACOG Pract Bull*. 2019;133(134):97–109.
8. Brasil P, Moreira ME, Nogueira RMR, Damasceno L, Wakimoto M, Rabello RS, et al. Zika Virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med*. 2017;375(24):2321–34.
9. Zanluca C, De Melo VCA, Mosimann ALP, Dos Santos GIV, dos Santos CND, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in

- Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(4):569–72.
10. Chan JFW, Choi GKY, Yip CCY, Cheng VCC, Yuen KY. Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease. *J Infect* [Internet]. 2016;72(5):507–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2016.02.011>
  11. Desai SK, Hartman SD, Jayarajan S, Liu S, Gallicano GI. Zika Virus (ZIKV): a review of proposed mechanisms of transmission and associated congenital abnormalities. *Am J Stem Cells*. 2017;6(December 2016):13–22.
  12. Cao-Lormeau V-M, Blake A, Mons S, Lastere S, Roche C, Vanhomwegen J, et al. Guillain-Barré syndrome outbreak caused by ZIKA virus infection in French Polynesia. *Lancet*. 2016;387(10027):1531–9.
  13. Krauer F, Riesen M, Reveiz L, Oladapo OT, Martínez-Vega R, Porgo T V., et al. Zika Virus Infection as a Cause of Congenital Brain Abnormalities and Guillain–Barré Syndrome: Systematic Review. *PLoS Med*. 2017;14(1):1–27.
  14. Meaney-Delman D, Oduyebo T, Polen KND, White JL, Bingham AM, Slavinski SA, et al. Prolonged Detection of Zika Virus RNA in Pregnant Women. *Obstet Gynecol*. 2016;128(4):724–30.
  15. Soriano-Arandes A, Rivero-Calle I, Nastouli E, Espiau M, Frick MA, Alarcon A, et al. What we know and what we don't know about perinatal Zika virus infection: a systematic review. *Expert Rev Anti Infect Ther* [Internet]. 2018;16(3):243–54. Available from: <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1438265>
  16. Oduyebo T, Polen KD, Walke HT, Reagan-Steiner S, Lathrop E, Rabe IB, et al. Update: Interim Guidance for Health Care Providers Caring for Pregnant Women with Possible Zika Virus Exposure — United States (Including U.S. Territories), July 2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2017;66(29):781–93. Available from: <http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/66/wr/mm6629e1.htm>



17. ACOG. Practice Advisory Interim Guidance for Care of Obstetric Patients During a Zika Virus Outbreak [Internet]. Practice Advisory Interim Guidance for Care of Obstetric Patients During a Zika Virus Outbreak. 2017 [cited 2018 Feb 15]. Available from: <http://www.acog.org/About-ACOG/News-Room/Practice-Advisories/Practice-Advisory-Interim-Guidance-for-Care-of-Obstetric-Patients-During-a-Zika-Virus-Outbreak#counseling>
18. Schmidt NJ, Dennis J, Lennette EH. Plaque reduction neutralization test for human cytomegalovirus based upon enhanced uptake of neutral red by virus infected cells. *J Clin Microbiol.* 1976;4(1):61–6.
19. Brasil M da SS de S do E do ES. Protocolo de Assistência a Gestantes com suspeita de Zika Vírus e Bebês com Microcefalia. 2016;
20. Munjal A, Khandia R, Dhama K, Sachan S, Karthik K, Tiwari R, et al. Advances in developing therapies to combat zika virus: Current knowledge and future perspectives. *Front Microbiol.* 2017;8(AUG):1–19.
21. Rather IA, Lone JB, Bajpai VK, Paek WK, Lim J. ZIKA virus: An emerging worldwide threat. *Front Microbiol.* 2017;8(JUL):1–7.
22. NIH, Routh J. Phase 2 Zika vaccine trial begins in U.S., Central and South America [Internet]. 2017 [cited 2018 Mar 22]. Available from: <https://www.nih.gov/news-events/news-releases/phase-2-zika-vaccine-trial-begins-us-central-south-america>
23. Fernandez E, Diamond MS. Vaccination strategies against Zika virus. *Curr Opin Virol* [Internet]. 2017;23:59–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2017.03.006>
24. Papageorghiou, AT Thilaganathan B, Bilardo C. ISUOG Interim Guidance on ultrasound for Zika virus infection in pregnancy: information for healthcare professionals. *Ultrasound Obs Gynecol* 2016; 2016;(March):530–2.
25. Waldorf KMA, Stencel-Baerenwald JE, Kapur RP, Studholme C, Boldenow E, Vornhagen J, et al. Fetal brain lesions after subcutaneous

- inoculation of zika virus in a pregnant nonhuman primate. *Nat Med*. 2016;22(11):1256–9.
26. Waldorf KMA, Nelson BR, Stencel-Baerenwald JE, Studholme C, Kapur RP, Armistead B. Congenital Zika Virus Infection as a silent pathology with loss of neurogenic output in the fetal brain. *Nat Med*. 2018;24(3):368–74.
  27. Walker CL, Merriam AA, Ohuma EO, Dighe MK, Gale M, Rajagopal L, et al. Femur-sparing pattern of abnormal fetal growth in pregnant women from New York City after maternal Zika virus infection. *Am J Obstet Gynecol*. 2018;219(2):187.e1-187.e20.
  28. Mayer C, Joseph KS. Fetal growth: A review of terms, concepts and issues relevant to obstetrics. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2013;41(2):136–45.
  29. Gabbe, SG; Niebyl, JR; Simpson, JL; Landon, MB; Galan, HL; Jauniaux E. Chapter 2 - Fetal Development and Physiology. In: *Obstetrics - Normal and Problem Pregnancies*. 2017. p. 26–37.
  30. RCOG. The Investigation and Management of the Small – for – Gestational – Age Fetus. *R Coll Obstet Gynaecol*. 2014;Green-top(31).
  31. Gabbe, SG; Niebyl, JR; Simpson, JL; Landon, MB; Galan, HL; Jauniaux E. Chapter 33 - Intrauterine Growth Restriction. In: *Obstetrics - Normal and Problem Pregnancies*. 7<sup>a</sup>. 2017. p. 737–69.
  32. Bianchi, DW; Crombleholme, TM; D’Alton, ME; Malone F. Chapter 123 - Intrauterine Growth Restriction. In: *Fetology - Diagnosis and Management of the Fetal Patient*. 2010. p. 857–64.
  33. Cordier AG, Nedellec S, Benachi A, Frydman R, Picone O. Quels arguments pour déterminer l’origine infectieuse d’un retard de croissance intra-utérin ? *J Gynecol Obstet Biol la Reprod*. 2011;40(2):109–15.
  34. Longo S, Borghesi A, Tziialla C, Stronati M. IUGR and infections. *Early Hum Dev [Internet]*. 2014;90(SUPPL.1):S42–4. Available from:

- [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-3782\(14\)70014-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-3782(14)70014-3)
35. Li X-L, Wei H-X, Zhang H, Peng H-J, Lindsay DS. A Meta Analysis on Risks of Adverse Pregnancy Outcomes in *Toxoplasma gondii* Infection. PLoS One [Internet]. 2014;9(5):e97775. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0097775>
  36. Oliveira J, Martins W. Achados ultrassonográficos em infecções fetais. Expert Ultrasound Rev Perspect [Internet]. 2009;1(4):226–34. Available from: <http://eurp.books.officelive.com/20090409.aspx>
  37. De La Calle M, Cruceyra M, De Haro M, Magdaleno F, Montero MD, Aracil J, et al. Sífilis y embarazo: estudio de 94 casos. Med Clin (Barc). 2013;141(4):141–4.
  38. Yamamoto R, Ishii K, Shimada M, Hayashi S, Hidaka N, Nakayama M, et al. Significance of maternal screening for toxoplasmosis, rubella, cytomegalovirus and herpes simplex virus infection in cases of fetal growth restriction. J Obstet Gynaecol Res. 2013;39(3):653–7.
  39. Pereira L, Pettitt M, Fong A, Tsuge M, Tabata T, Fang-Hoover J, et al. Intrauterine Growth Restriction Caused by Underlying Congenital Cytomegalovirus Infection. J Infect Dis [Internet]. 2014;209(10):1573–84. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jiu019>
  40. Lipitz S, Yinon Y, Malinger G, Yagel S, Levit L, Hoffman C, et al. Risk of cytomegalovirus-associated sequelae in relation to time of infection and findings on prenatal imaging. Ultrasound Obstet Gynecol. 2013;41(November 2012):508–14.
  41. Miller E, Cradock-Watson J, Pollock T. Consequences of Confirmed Maternal Rubella At Successive Stages of Pregnancy. Lancet. 1982;320(8302):781–4.
  42. Gabbe, SG; Niebyl, JR; Simpson, JL; Landon, MB; Galan, HL; Jauniaux E. Chapter 53 - Maternal and Perinatal Infection in Pregnancy - Viral. In: Obstetrics - Normal and Problem Pregnancies. 2017. p. 1099–129.

43. Desai M, Kuile FO, Nosten F, Mcgready R, Asamoia K, Brabin B, et al. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis*. 2007;7(February):93–104.
44. Pereira Jr JP, Nielsen-Saines K, Sperling J, Dutra BRT, Maykin MM, Gama HD, et al. Association of Prenatal Ultrasonographic Findings With Adverse Neonatal Outcomes Among Pregnant Women With Zika Virus Infection in Brazil. *JAMA Netw Open*. 2018;1(8):e186529.
45. Nardoza LMM, Caetano ACR, Zamarian ACP, Mazzola JB, Silva CP, Marçal VMG, et al. Fetal growth restriction: current knowledge. *Arch Gynecol Obstet*. 2017;295(5):1061–77.
46. Unterscheider J, O'Donoghue K, Malone FD. Guidelines on fetal growth restriction-a comparison of recent national publications. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* [Internet]. 2014;99(212):A86. Available from: [http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L71561417%5Cnhttp://fn.bmj.com/content/99/Suppl\\_1/A86.2.abstract?sid=bee47b17-33e1-4a27-a07a-868b15afcd62%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1136/archdischild-2014-306576.245%5Cnhttp://sfx.lib](http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L71561417%5Cnhttp://fn.bmj.com/content/99/Suppl_1/A86.2.abstract?sid=bee47b17-33e1-4a27-a07a-868b15afcd62%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1136/archdischild-2014-306576.245%5Cnhttp://sfx.lib)
47. Pilalis A, Souka AP, Antsaklis P, Daskalakis G, Papantoniou N, Mesogitis S, et al. Screening for pre-eclampsia and fetal growth restriction by uterine artery Doppler and PAPP-A at 11-14 weeks' gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2007;29(2):135–40.
48. DeVore GR. The importance of the cerebroplacental ratio in the evaluation of fetal well-being in SGA and AGA fetuses. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2015;213(1):5–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2015.05.024>
49. Botsis D, Vrachnis N, Christodoulakos G. Doppler assessment of the intrauterine growth-restricted fetus. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1092:297–303.
50. Baschat AA. Doppler application in the delivery timing of the preterm

- growth-restricted fetus: Another step in the right direction. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2004;23(2):111–8.
51. Seravalli V, Baschat AA. A Uniform Management Approach to Optimize Outcome in Fetal Growth Restriction. *Obstet Gynecol Clin North Am* [Internet]. 2015;42(2):275–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ogc.2015.01.005>
  52. Figueras F, Gratacos E. Stage-based approach to the management of fetal growth restriction. *Prenat Diagn.* 2014;34(7):655–9.
  53. ACOG. Practice Bulletin Number 175 - Ultrasound in Pregnancy. *Am Coll Obstet Gynecol.* 2016;128(6):e241–56.
  54. Salomon LJ, Alfirevic Z, Berghella V, Bilardo C, Hernandez-Andrade E, Johnsen SL, et al. Practice guidelines for performance of the routine mid-trimester fetal ultrasound scan. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2011;37(1):116–26.
  55. Papageorghiou AT, Ohuma EO, Altman DG, Todros T, Ismail LC, Lambert A, et al. International standards for fetal growth based on serial ultrasound measurements : the Fetal Growth Longitudinal Study of the INTERGROWTH-21 st Project. 2014;
  56. Morgan TK, Legasse AW, Wang X, Frias AE, Axthelm MK, Kelleher M, et al. Zika virus infection in pregnant rhesus macaques causes placental dysfunction and immunopathology. *Nat Commun* [Internet]. 2018;9(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-02499-9>
  57. Miner JJ, Cao B, Govero J, Smith AM, Cabrera OH, Garber C, et al. Zika virus infection during pregnancy in mice causes placental damage and fetal demise. *Cell.* 2016;165(5):1081–91.