**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

Mayara Rovariz Agostinho

**INVESTIGAÇÃO DE PARÂMETROS VIROLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS
NO DESENVOLVIMENTO DE DOENÇA NEONATAL RESULTANTE DA
INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA NA GESTAÇÃO**

Ribeirão Preto

2020

MAYARA ROVARIZ AGOSTINHO

INVESTIGAÇÃO DE PARÂMETROS VIROLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS NO
DESENVOLVIMENTO DE DOENÇA NEONATAL RESULTANTE DA INFECÇÃO
PELO VÍRUS ZIKA NA GESTAÇÃO

Dissertação de Mestrado a ser
apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Imunologia Básica e Aplicada para a
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia
Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Benedito
Antonio Lopes da Fonseca

Ribeirão Preto

2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA
FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Agostinho, Mayara Rovariz

Investigação de parâmetros virológicos e imunológicos no
desenvolvimento de doença neonatal resultante da infecção pelo vírus
Zika na gestação. Ribeirão Preto, 2020.

90 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração:
Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Fonseca, Benedito Antonio Lopes.

1. Zika vírus. 2. Gestantes. 3. Microcefalia. 4. Síndrome
Congênita pelo vírus Zika. 5. Citocinas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mayara Rovariz Agostinho

INVESTIGAÇÃO DE PARÂMETROS VIROLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS NO
DESENVOLVIMENTO DE DOENÇA NEONATAL RESULTANTE DA INFECÇÃO
PELO VÍRUS ZIKA NA GESTAÇÃO

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia Básica e Aplicada para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Imunologia
Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Benedito Antonio
Lopes da Fonseca

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (Proc. 134238/ 2017- 6) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

DEDICATÓRIA

Aos pais e familiares que tiveram seus bebês acometidos pela Síndrome Congênita do Zika vírus ou que perderam seus filhos diante da infecção, dedico este trabalho na busca do conhecimento e conforto diante das adversidades e desafios vividos no dia a dia.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu orientador Prof. Benedito, que me deu a oportunidade de trabalhar neste projeto, que sempre acreditou em meus esforços, me motivou em momentos desafiadores e me apoiou em minhas ideias. Trago sua trajetória como um exemplo profissional e para mim foi uma honra ter trabalho ao teu lado.

Agradeço aos componentes da banca que dedicaram seu tempo na leitura, análise e considerações na melhoria deste trabalho.

Agradeço as mulheres que aceitaram doar uma amostra de sangue para análise e a todos os profissionais da área da saúde que realizaram a coleta, contribuindo para a construção deste estudo.

Agradeço aos funcionários do Centro de Pesquisa em Virologia (CPV), em especial dona Leila, que sempre com bom humor cuidou dos materiais para que fosse possível a realização de muitos experimentos aqui expostos.

À todos os colegas e amigos do CPV em especial Márcio, Vitor, Flávia, Beatriz, Taline, Jonathan, Marcos, Luiza, Fábio, Danillo e Leonardo. A presença de vocês foi essencial no meu aprendizado diário, na manutenção da minha resiliência e na felicidade dos meus dias.

Um agradecimento especial à Luiza que em tão pouco tempo me ensinou muito, como profissional e como ser humano, que muito dispôs de seu tempo para me ajudar e para contribuir com o seu conhecimento, serei eternamente grata à você.

Agradeço ao Daniel Marques e a todos do Departamento Regional de Saúde envolvidos por endossar a ideia de disseminação de conhecimento, contribuindo, apoiando e participando na organização do evento onde reuniu parte de gestantes deste estudo para o esclarecimento de dúvidas à respeito do vírus Zika.

Agradeço a todos os profissionais da Vigilância Epidemiológica de Ribeirão Preto, em especial a Luzia Márcia, que sempre foram receptivos, amigáveis e prestativos. Vocês foram essenciais no meu caminho até este projeto, meu especial agradecimento à todos.

À todos os funcionários do Programa de Imunologia Básica e Aplicada pela formação e conhecimento adquirido. Um especial agradecimento a secretária Ana, que por tantos momentos me ajudou no suporte necessário.

Por último, mas não menos importante, agradeço à minha família que foram essenciais na manutenção da minha saúde mental e que me transbordam de alegria mesmo de longe. Em especial agradeço a minha mãe Marcela por ter feito tantos sacrifícios para garantir minha

educação, por sempre me incentivar a ser melhor, por acreditar no meu potencial, você me faz lembrar todos os dias o porquê faço o que faço e porque vale a pena viver e contribuir para a sociedade, muito obrigada. Agradeço ao Artur, pela compreensão de dias nebulosos, por sempre me incentivar e apoiar as minhas decisões, me dando o suporte necessário, me ouvindo e me alegrando, para que eu conseguisse concluir este trabalho. Agradeço aos meus avós Pedro e Edite, que se preocuparam toda semana com a minha alimentação, me enviando sempre uma marmita.

Obrigada a todos que tiveram envolvidos neste trabalho direta ou indiretamente.

Agostinho, M.R. **Investigação de parâmetros virológicos e imunológicos no desenvolvimento de doença neonatal resultante da infecção pelo vírus Zika na gestação.** 2020. 90 f. Dissertação. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

O surto causado pelo vírus Zika (ZIKV) no Brasil gerou um estado de alerta no período de 2015 e 2016 pela associação ao crescente número de casos de microcefalia em neonatos e Síndrome de Guillain-Barré em adultos. O objetivo deste estudo foi investigar parâmetros virológicos e imunológicos de gestantes infectadas pelo ZIKV para compreender a associação desta infecção com o desenvolvimento de doença neonatal. Foi estabelecido uma coorte de gestantes admitidas no pré-natal da rede básica de saúde de Ribeirão Preto. Amostras de sangue foram coletadas a cada consulta e analisadas quanto a positividade ao ZIKV e quanto à concentração de citocinas pró e anti-inflamatórias. A caracterização do desfecho gestacional foi feito pelo acesso aos sistemas de informação de saúde CeVeSP e Hygia WEB. Analisou-se amostras de 312 pacientes e 252 demonstram positividade ao ZIKV. 42 gestantes infectadas apresentaram desfecho negativo, exibindo em maior proporção a evolução para aborto (61,9%), seguido de malformação fetal (23,8%), óbito neonatal (9,5%) e em menor proporção natimorto (4,8%). Notou-se infecção pelo ZIKV em gestantes com desfecho negativo em todos os períodos gestacionais, no entanto, mulheres que foram infectadas no primeiro trimestre obtiveram piores prognósticos sendo observada a evolução para aborto, óbito neonatal e natimorto. Gestantes infectadas pelo ZIKV apresentaram menores níveis de IL-13, IL-5 e IL-17A em relação as gestantes sem infecção que apresentaram neonatos saudáveis. Não se observou diferença nos níveis de mediadores imunológicos entre pacientes com diferentes desfechos gestacionais infectadas pelo ZIKV na fase aguda da doença. Entretanto, pacientes com ZIKV com desfecho gestacional negativo apresentaram maiores concentrações de TNF- α em relação as que exibiram neonatos saudáveis na fase de convalescença. Esses resultados indicam que o TNF- α está envolvido na forma mais grave de infecção do ZIKV, prejudicando na evolução gestacional e no desenvolvimento fetal.

Palavras chave: Zika vírus; gestantes; microcefalia; Síndrome Congênita pelo vírus Zika; citocinas.

ABSTRACT

Agostinho, M.R. **Immunological and virological parameters investigation in the development of neonatal disease resulted from Zika virus infection during the pregnancy.** 2020. 90 f. Dissertation. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Zika virus (ZIKV) outbreak in Brazil was of great concern because it was related with a massive number of microcephaly cases in neonates and Guillain-Barré Syndrome in adults during the period of 2015 and 2016. The aim of this study was investigate immunological and virological parameters of ZIKV infected pregnant women to understand the association of this infection with the development of neonatal disease. A cohort of pregnant women admitted in the pre-natal appointments of Ribeirão Preto primary health care units was constructed. Blood samples were collected in every appointment and analyzed for ZIKV positivity and for pro and anti-inflammatory cytokines concentration. The access of health information system CeVeSP e Hygia WEB was necessary for the characterization of the gestational outcome. Samples of 312 patients were analyzed being 252 positive for ZIKV. Only 42 infected pregnant presented a negative gestational outcome, exhibiting a greater proportion of evolution to miscarriages (61,9%), followed by fetal malformation (23,8%), neonatal death (9,5%) and stillbirths (4,8%). ZIKV infection was observed in all gestational periods of patients that presented a negative gestational outcome, however, pregnant women infected in the first trimester had a worst gestational prognosis once it was observed the evolution to miscarriages, neonatal death and stillbirth. The quantification of cytokines identified lower concentrations of IL-13, IL-5 e IL-17A in ZIKV infected pregnant women than pregnant women without infection that exhibited healthy neonates. No differences were identified in the immunologic mediators levels between patients with different gestational outcomes during disease acute phase. However, ZIKV infected patients with negative gestational outcome expressed greater levels of TNF- α than infected patients that exhibited healthy newborns in the convalescence phase. These results indicate that TNF- α is involved in the severe forms of the ZIKV infection, impairing the gestation evolution and fetal growth.

Keywords: Zika virus; pregnant women; microcephaly; Congenital Zika Syndrome; cytokines.

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. Gráfico do número de casos prováveis de febre pelo vírus Zika por semana epidemiológica de início de sintomas. Fonte: Brasil, 2016.	19
Figure 2. Distribuição dos casos confirmados de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionados à infecção do vírus Zika, segundo município de residência, no período de 2015 -2019. Fonte: Brasil, 2019.	20
Figure 3. Representação do genoma do ZIKV que codifica uma poliproteína que é posteriormente clivada em proteínas não-estruturais e proteínas estruturais, apresentadas na figura abaixo na estrutura da partícula viral. Imagem modificada de Pierson; Diamond, 2018 e Viral Zone, 2016.	21
Figure 4. Esquematização do período de detecção do vírus Zika pelos testes laboratoriais de acordo com o início das manifestações clínicas. O período de incubação do vírus Zika corresponde de 3 a 10 dias e a partir do início dos sintomas até o décimo quarto dia é possível realizar a reação em cadeia da polimerase precedida da transcrição reversa (RT- PCR). A partir do sétimo dia, anticorpos podem ser detectados por testes sorológicos. Imagem adaptada de Sullivan Nicolaides Pathology, 2014.	23
Figure 5. Representação dos eventos até a apresentação da Síndrome Congênita do Zika Vírus em neonato, com volume cerebral reduzido. Imagem modificada de Saiz <i>et al.</i> , 2017 e Rombi <i>et al.</i> , 2020.	25
Figura 6. O ZIKV atravessa a placenta infectando as células de Hofbauer, que tem acesso aos vasos fetais, chegando até o feto. Imagem adaptada de Rombi <i>et al.</i> , 2020.	28
Figura 7. Fluxograma da construção de um coorte de gestantes com acompanhamento de pré-natal na rede básica de saúde de Ribeirão Preto no período de fevereiro de 2016 à março de 2017.	33
Figura 8. Fluxograma dos resultados dos testes diagnósticos (RT-qPCR e PRNT) de gestantes com acompanhamento de pré-natal na rede básica de saúde de Ribeirão Preto no período de fevereiro de 2016 à março de 2017 de acordo com o desfecho gestacional.	46
Figura 9. Caracterização das gestações com desfecho negativo que foram confirmadas infectadas por ZIKV por qRT-PCR ou PRNT durante a gestação.	47

Figura 10. Proporção dos desfechos gestacionais de pacientes notificadas com suspeita de infecção pelo ZIKV pelo sistema de saúde de Ribeirão Preto e confirmadas pelos testes diagnósticos (RT-qPCR ou PRNT) de acordo com o período gestacional de infecção. A. Pacientes infectadas no primeiro trimestre de gestação de acordo com o desfecho gestacional. B. Pacientes infectadas no segundo trimestre de gestação de acordo com o desfecho gestacional. C. Pacientes infectadas no terceiro trimestre de gestação de acordo com o desfecho gestacional.51

Figura 11. Gráfico da concentração das citocinas IL-13 (A), IL-5 (B) e IL-17A (C) de gestantes infectadas ou não pelo ZIKV que exibiram desfecho positivo (RN saudável) ou desfecho negativo (RN com malformação congênita, aborto, natimorto ou óbito neonatal). Foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal- Wallis, tendo o nível de significância indicado pelo número de asteriscos, ****<0,0001, **<0,01 e *<0,05.54

Figura 12. Gráfico da concentração da citocina TNF- α de gestantes na fase de convalescença de infecção pelo ZIKV que exibiram desfecho positivo (RN saudável) ou desfecho negativo (RN com malformação congênita, aborto, natimorto ou óbito neonatal). Foi utilizado o teste t, tendo o nível de significância indicado pelo asterisco *<0,05.55

Figura 13. Cinética das citocinas IL-5, IL-6, IL-17A, TNF- α , e IFN- γ na fase aguda e de convalescença de infecção do ZIKV de gestantes com desfecho gestacional positivo (A,B,C,D e E) e com desfecho gestacional negativo (F,G,H,I e J).56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de <i>primers</i> e sondas utilizados na detecção de RNA do ZIKV por RT-qPCR em tempo real.....	37
Tabela 2. Número de coletas de soro das gestantes que foram notificadas com suspeita de infecção por ZIKV pelo sistema de saúde de Ribeirão Preto no período de fevereiro de 2016 à março de 2017 de acordo com o desfecho gestacional.....	42
Tabela 3. Número de coletas de soro das gestantes que não foram notificadas com suspeita de infecção por ZIKV com acompanhamento de pré-natal na rede pública de saúde de Ribeirão Preto no período de fevereiro de 2016 à março de 2017 de acordo com o desfecho gestacional.	44
Tabela 4. Resultado dos testes diagnósticos de gestantes notificadas ou não com suspeita de infecção pelo ZIKV de acordo com o desfecho gestacional.	46
Tabela 5. Descrição da caracterização das gestantes positivas para o ZIKV, notificadas ou não com suspeita de ZIKV às autoridades de saúde, que evoluíram para aborto de acordo com período gestacional de perda fetal.	49
Tabela 6. Caracterização dos neonatos de gestantes positivas para o ZIKV, notificadas ou não com suspeita de ZIKV às autoridades de saúde, que apresentaram malformação do RN, óbito neonatal e natimorto.	50
Tabela 7. Concentrações das citocinas detectadas no soro de pacientes que foram positivos ou negativos para infecção por ZIKV por RT-qPCR em tempo real e que tiveram recém-nascidos saudáveis (desfecho positivo) ou apresentaram aborto, natimorto, óbito neonatal e recém-nascidos com malformações congênitas (desfecho negativo) em Ribeirão Preto- SP, Brasil, fevereiro de 2016 à março de 2017. É apresentado também o valor de p para o teste não-paramétrico de Kruskal- Wallis.....	53
Tabela 8. Concentrações das citocinas detectadas no soro de pacientes que foram positivos para infecção por ZIKV por RT-qPCR em tempo real na fase aguda da doença e que tiveram recém-nascidos saudáveis (desfecho positivo) ou apresentaram aborto, natimorto, óbito neonatal e recém-nascidos com malformações congênitas (desfecho negativo) em Ribeirão Preto- SP, Brasil, fevereiro de 2016 à março de 2017. É apresentado também o valor de p para o teste t.....	54

Tabela 9. Concentrações das citocinas detectadas no soro de pacientes que foram positivos para infecção por ZIKV por RT-qPCR em tempo real na fase de convalescença da doença e que tiveram recém-nascidos saudáveis (desfecho positivo) ou apresentaram aborto, natimorto, óbito neonatal e recém-nascidos com malformações congênitas (desfecho negativo) em Ribeirão Preto- SP, Brasil, fevereiro de 2016 à março de 2017. É apresentado também o valor de p para o teste t.55

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Histórico.....	17
1.2. Epidemiologia no Brasil	19
1.3. Vírus Zika: estrutura e transmissão	20
1.4. Manifestações clínicas e diagnóstico laboratorial	22
1.5. Síndrome Congênita pelo ZIKV (CZS).....	23
1.6. Imunopatogênese do ZIKV	25
2. OBJETIVO	30
2.1. Objetivo geral	30
2.2. Objetivos específicos	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1. Construção de uma coorte de gestantes	32
3.2. Coleta de dados clínico-epidemiológicos das gestantes	33
3.3. Testes diagnósticos	34
3.3.1. Produção do estoque viral e titulação por ensaio de placa.....	35
3.3.2. Reação em cadeia da polimerase precedida da transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR).....	36
3.3.3. Detecção de anticorpos neutralizantes anti-ZIKV por PRNT (<i>Plaque Reduction Neutralization Test</i>).....	37
3.4. Dosagem e análise do perfil de citocinas em amostra de soro.....	38
3.5. Análise Estatística.....	40
4. RESULTADOS	42
4.1. Caracterização das amostras	42
4.2. Testes Diagnósticos	44
4.3. Caracterização Clínico-epidemiológico das Gestantes ZIKV Positivas.....	47
4.4. Caracterização Clínico-epidemiológico das Gestantes ZIKV Negativas	51
4.5. Análise de Citocinas das Amostras Seleccionadas.....	52
5. DISCUSSÃO	58
6. CONCLUSÃO.....	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

8. ANEXOS	83
-----------------	----

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

O vírus Zika (ZIKV) foi isolado pela primeira vez em 1947 na Floresta de Zika em Uganda, a partir do soro de macaco *Rhesus* (macaca mulatta), sendo novamente isolado no mesmo local em 1948 de mosquitos *Aedes africanus* durante um estudo envolvendo o vírus da febre amarela, indicando que o mosquito poderia ser o vetor (DICK *et al.*, 1952).

Dick (1952) realizando testes sorológicos detectou anticorpos neutralizantes anti-ZIKV em soro de habitantes de Uganda, mostrando que o vírus poderia infectar humanos. Porém, o primeiro isolamento de ZIKV de soro humano foi realizado na Nigéria, no qual foi utilizado o soro de uma garota de dez anos de idade que apresentava dor de cabeça e febre, confirmando a capacidade do ZIKV infectar humanos (MACNAMARA, 1954). O primeiro caso humano melhor caracterizado ocorreu em Uganda em 1964, o paciente apresentava febre, dor de cabeça e exantema maculopapular generalizado com duração de cinco dias (SIMPSON, 1964 apud OLSON *et al.*, 1981). Em 1969 o ZIKV foi isolado na Malásia (Ásia) de mosquitos *Aedes aegypti* (MARCHETTE *et al.*, 1969 apud OLSON *et al.*, 1981).

No período de 1960 à 2006 todos os casos relatados de ZIKV se restringiram as regiões da África e da Ásia, sendo somente em 2007 detectado um surto pelo ZIKV na ilha de Yap nos Estados Federados da Micronésia. A infecção viral ocorreu em mais de 70% dos habitantes com mais de 3 anos de idade; neste estudo não foi possível detectar o vírus em amostras de mosquitos, porém foi sugerido que o *Aedes hensilli*, por ser abundante na ilha, poderia ser o vetor de transmissão do vírus (DUFFY *et al.*, 2009).

O segundo surto relatado de ZIKV ocorreu na Polinésia Francesa em 2013 onde mais de 30.000 pessoas foram infectadas pelo ZIKV (CHAN *et al.*, 2016; HANCOCK *et al.*, 2014). O vírus se espalhou para algumas ilhas do Pacífico como Nova Caledônia, Ilhas Cook, Vanuatu, Ilhas Salomão e Ilha de Páscoa (Chile), tendo este último ocorrido em 2014, em que provavelmente o ZIKV proveniente da Polinésia Francesa chegou até o local através do festival anual de Tapati, constituindo assim o primeiro caso no ocidente (MUSSO, 2015).

Em seguida, o vírus chegou nas Américas e em 2015 um surto de ZIKV se iniciou no Brasil. Análises filogenéticas mostraram que o genoma do ZIKV circulando no Brasil e o genoma de ZIKV que circulando na Polinésia Francesa pertencem a linhagem asiática, sendo

assim, diversas teorias foram criadas partindo do fato que o ZIKV poderia ter vindo da Polinésia Francesa (MUSSO, 2015).

A primeira teoria se baseia na chegada do vírus no Brasil em 2014 na competição de futebol da Copa do Mundo, porém nenhum país do pacífico que estava tendo casos de ZIKV participou do evento. A segunda teoria é de que o vírus tenha entrado no período da Competição Mundial de Canoagem realizada também em 2014 no Rio de Janeiro e que contava com a participação de quatro países do Pacífico (Polinésia Francesa, Nova Caledônia, Ilhas Cook, e Ilha de Páscoa) (MUSSO, 2015). Há ainda a possibilidade do ZIKV ter vindo em 2013 a partir do evento de futebol da Copa das Confederações, uma vez que competidores provenientes da Polinésia Francesa estavam participando do evento (FARIA *et al.*, 2016). O fenômeno do *El Niño*, associado a climas quentes, também foi considerado fator importante para a difusão do mosquito transmissor e consequentemente do ZIKV pela América do Sul em 2015 (CAMINADE *et al.*, 2017).

No início de 2015, foram observados um aumento no número de casos de doença exantemática pelos profissionais de saúde da região Nordeste do Brasil, sendo esses casos até então, notificados às autoridades de saúde como suspeita de dengue. Em março do mesmo ano foram confirmados casos de ZIKV na Bahia (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015) e posteriormente casos no Rio Grande do Norte também positivaram para ZIKV (ZANLUCA *et al.*, 2015), atingindo no final de 2015 outros locais do Brasil.

No entanto, o ZIKV recebeu atenção especial após o crescente número de casos de microcefalia e Guillain- Barré (GBS) possivelmente associados ao ZIKV, sendo declarado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) situação de Emergência de Saúde Pública de Preocupação Internacional em fevereiro de 2016 (HEYMANN *et al.*, 2016). Diante deste cenário, a febre pelo vírus Zika se tornou de notificação compulsória conforme Portaria nº 204 de 17 fevereiro de 2016 pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) (BRASIL, 2016).

Em decorrência da intensa investigação científica sobre a temática, em março do mesmo ano a OMS estabeleceu a relação causal entre ZIKV e microcefalia, assim como outras malformações congênitas, como Síndrome Congênita do Zika Vírus (OMS, 2016; MELO *et al.*, 2016; RASMUSSEN *et al.*, 2016).

1.2. Epidemiologia no Brasil

Apesar do Brasil apresentar uma grande proporção de infecções por ZIKV em 2015, somente no ano de 2016 que a real dimensão do número de casos foi reconhecida. Isto se deveu ao estabelecimento da notificação compulsória de casos suspeitos de infecção pelo vírus Zika com a inclusão das classificações “Doença aguda pelo vírus Zika”, “Doença aguda pelo vírus Zika em gestantes” e “Óbito com suspeita de doença pelo vírus Zika” à lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública (GARCIA; DUARTE, 2016).

Em 2016 foram registrados 215.319 casos prováveis de ZIKV, a maioria nas primeiras semanas do ano (Figura 1), sendo confirmados 130.701 casos. A região Centro-Oeste apresentou maior taxa de incidência, seguido da região Nordeste, Sudeste, Norte e Sul. Ainda nesse ano foram confirmados 8 óbitos pela infecção do ZIKV, 4 no Rio de Janeiro, 2 no Espírito Santo, 1 no Maranhão e 1 na Paraíba (BRASIL, 2016). Com relação às gestantes, registrou-se 17.000 casos prováveis de infecção em 2016, sendo 11.052 casos confirmados por testes laboratoriais ou critérios clínicos (BRASIL, 2016).

Figure 1. Gráfico do número de casos prováveis de febre pelo vírus Zika por semana epidemiológica de início de sintomas. Fonte: Brasil, 2016.

Em 2015 foram confirmados 954 casos de alteração no crescimento e desenvolvimento relacionado ao ZIKV, sendo 930 relacionados à recém-nascidos e crianças e 24 referentes a fetos, abortos e natimortos. Em 2016, esse número aumentou para 1.927 casos,

sendo 1.768 casos em recém-nascidos e crianças e 159 referentes a fetos, abortos e natimortos (BRASIL, 2019).

Em 2017, 2018 e 2019 houve regressão de ocorrências de infecção pelo ZIKV, assim como no número de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionados à infecção do vírus Zika, totalizando 360, 178 e 55 casos confirmados respectivamente. O maior número de casos confirmados de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionado ao ZIKV no período de 2015 à 2019 foi na região Nordeste do Brasil, seguido das regiões Sudeste, Centro-Oeste, Norte e Sul (Figura 2) (BRASIL, 2019).

Figure 2. Distribuição dos casos confirmados de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionados à infecção do vírus Zika, segundo município de residência, no período de 2015 -2019. Fonte: Brasil, 2019.

1.3. Vírus Zika: estrutura e transmissão

O ZIKV é um vírus de RNA de fita simples de polaridade positiva que pertence a família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, assim como os vírus da Febre Amarela (YFV), Dengue (DENV) e vírus do Oeste do Nilo (WNV) (LEE *et al.*, 2017). O genoma apresenta 10.794 kb de comprimento e codifica uma poliproteína que é clivada em 3 proteínas estruturais, a proteína precursora da membrana (prM), capsídeo (C) e envelope (E); e 7

proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (FAYE *et al.*, 2014; SHANKAR *et al.*, 2017) (Figura 3).

Figure 3. Representação do genoma do ZIKV que codifica uma poliproteína que é posteriormente clivada em proteínas não-estruturais e proteínas estruturais, apresentadas na figura abaixo na estrutura da partícula viral. Imagem modificada de Pierson; Diamond, 2018 e Viral Zone, 2016.

Há duas linhagens filogenéticas de ZIKV, a Africana (dividida em leste e oeste da África) e a Asiática. Há evidências que a linhagem que deu origem a disseminação do vírus pelas Américas foi a linhagem asiática (BERTHET *et al.*, 2014; HADDOW *et al.*, 2012).

O ZIKV por ser um arbovírus é transmitido principalmente pela picada de mosquitos do gênero *Aedes*, como o *Ae. africanus*, o *Ae. albopictus* e o *Ae. aegypti*, sendo este último considerado o principal vetor no Brasil (COSTA-DA-SILVA *et al.*, 2017; DIALLO *et al.*, 2014). Contudo mosquitos de outras espécies também podem transmitir o vírus como o *Culex quinquefasciatus*, por exemplo (GUEDES *et al.*, 2017).

No ciclo silvestre o vírus é transmitido entre mosquitos hematófagos e hospedeiros primatas não humanos. No ciclo urbano, a transmissão ocorre entre o mosquito e humano, uma vez que há a picada de mosquito no humano infectado pelo ZIKV, o sangue ingerido contém o vírus que se replica no intestino médio e nas glândulas salivares do mosquito e após o período de incubação este já consegue transmitir o ZIKV em sua picada injetando a saliva contendo o vírus (THOMPSON *et al.*, 2017).

A transmissão não vetorial do ZIKV pode ocorrer via vertical, da mãe para o feto (CALVET *et al.*, 2016; DE NORONHA *et al.*, 2016); o ZIKV é encontrado no leite materno porém ainda não há evidências suficientes de que é possível a transmissão pelo aleitamento materno (COLT *et al.*, 2017). Há relatos de que o vírus pode ser transmitido sexualmente e por transfusão sanguínea, dado que o ZIKV é encontrado no sêmen, saliva, sangue, secreções vaginais e cervicais (FOY *et al.*, 2011; HUIITS *et al.*, 2017; MUSSO *et al.*, 2014).

1.4. Manifestações clínicas e diagnóstico laboratorial

A maioria dos casos de ZIKV não apresentam sintomas, no entanto, quando são sintomáticos o período de incubação é em torno de 3 a 10 dias e os sinais e sintomas descritos são parecidos com aqueles observados em infecção por DENV e outras infecções virais, dificultando o diagnóstico clínico (SAIZ *et al.*, 2017). O paciente com ZIKV pode apresentar exantema, febre, conjuntivite, mialgia e cefaleia com duração de até 10 dias. A manifestação mais frequentemente relatada é o exantema, que atinge 90% dos casos, se apresentando maculopapular e pruriginoso com duração de 4 a 5 dias, podendo estar precedido de fadiga e febre. Quando presente, a febre apresenta-se leve (38°C) persistindo por no máximo 2 dias (BRASIL, 2016). A dor na cabeça, nos músculos e nas articulações apresenta-se moderada e o inchaço nas articulações é frequente e em leve intensidade. A conjuntivite pode ocorrer em 50% dos casos, podendo ser acompanhado de dor retro-orbitária. Vômito, náusea, diarreia e dor abdominal são incomuns porém já foram descritos (MITTAL *et al.*, 2017).

Adultos infectados com ZIKV podem evoluir para Síndrome de Guillain-Barré, uma doença inflamatória do Sistema Nervoso Periférico, caracterizado por fraqueza muscular e paralisia. Em gestantes brasileiras foram descritos a linfadenopatia em 40% dos casos, acompanhado de mialgia e cefaleia. A infecção durante a gravidez pode atingir o feto, levando a Síndrome Congênita do vírus Zika, como a microcefalia e morte fetal (PIERSON; DIAMOND, 2018).

O diagnóstico padrão ouro, que apresenta maior sensibilidade e especificidade é a detecção do RNA viral por reação em cadeia da polimerase precedida da transcrição reversa (RT-PCR) em amostras de soro, plasma, saliva, líquido amniótico, sêmen e urina (NOORBAKHSH *et al.*, 2019). O período virêmico curto pode afetar negativamente a detecção do genoma viral, sendo possível identificar o ZIKV no soro em até 4 dias após o início dos sintomas (WAGGONER; PINSKY 2016). O vírus Zika tem uma persistência maior na urina, podendo ser detectado por RT-PCR por até 14 dias após o início dos sintomas

(GOURINAT *et al.*, 2015). Entretanto, já foi descrito a detecção do genoma viral por períodos superiores, sendo identificado persistência viral no sêmen em até 93 dias após início dos sintomas (OLIVEIRA *et al.*, 2018) e no soro em até 120 dias em gestantes, não se sabendo ao certo qual a implicação da persistência viral nos desfechos adversos observados em gestantes infectadas (LOZIER *et al.*, 2018; MEANEY-DELMAN *et al.*, 2016; PÉREZ-PADILLA *et al.*, 2019). O resultado negativo pelo RT-PCR não exclui a infecção pelo ZIKV, uma vez que a amostra pode ter sido coletada fora do período de viremia.

A detecção de anticorpos também pode ser utilizada no diagnóstico do ZIKV, apesar de apresentar uma grande reação cruzada com outros flavivírus, como DENV, YFV e WNV, sendo um desafio o diagnóstico do ZIKV em territórios em que há circulação desses vírus ou pacientes vacinados (CHARREL *et al.*, 2016). Logo, os testes sorológicos como o ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática) e testes rápidos requerem a realização de outro teste confirmatório, o PRNT (teste de neutralização por redução de placas). O PRNT detecta anticorpos neutralizantes anti-ZIKV, tanto IgM quanto IgG. A produção de IgM pode começar uma semana após início dos sintomas e o IgG a partir do 15º dia (RABE *et al.*, 2016) (Figura 4).

Figure 4. Esquematização do período de detecção do vírus Zika pelos testes laboratoriais de acordo com o início das manifestações clínicas. O período de incubação do vírus Zika corresponde de 3 a 10 dias e a partir do início dos sintomas até o décimo quarto dia é possível realizar a reação em cadeia da polimerase precedida da transcrição reversa (RT-PCR). A partir do sétimo dia, anticorpos podem ser detectados por testes sorológicos. Imagem adaptada de Sullivan Nicolaides Pathology, 2014.

1.5. Síndrome Congênita pelo ZIKV (CZS)

O grupo mais vulnerável à infecção pelo ZIKV são as grávidas, que quando infectadas podem transmitir o vírus para o feto culminando em alterações no desenvolvimento fetal e até mesmo na inviabilização da gestação (Figura 5). A princípio foram detectados ZIKV em tecido cerebral e fluido amniótico, comprovando posteriormente um tropismo do vírus no

cérebro e na placenta. Em gestantes, o vírus consegue ultrapassar a placenta e infectar o feto se replicando principalmente no cérebro em desenvolvimento e podendo causar malformação fetal (CALVET *et al.*, 2016; DE NORONHA *et al.*, 2016).

O termo Síndrome Congênita pelo Zika vírus é um termo atribuído a alterações congênitas encontradas em fetos e neonatos infectados pelo ZIKV durante a gestação. A microcefalia foi o primeiro sinal a ser detectado em casos de fetos com mães infectadas pelo ZIKV, tendo como definição a medida da circunferência cefálica occipito-frontal de dois ou mais desvios padrão abaixo da média para a idade e sexo. No Brasil, ficou determinado microcefalia a medida igual ou inferior a 31,9 cm do perímetro cefálico para os meninos e para as meninas perímetro cefálico igual ou inferior a 31,5 cm (BRASIL, 2016).

Entretanto, a microcefalia é apenas um sinal que pode ou não ser observado mediante alterações do Sistema Nervoso Central. Os achados radiológicos mais frequentes são a calcificação e atrofia de várias regiões do cérebro, mas principalmente na junção do córtex à massa branca, a malformação do desenvolvimento cortical (principalmente nos lobos frontais), ventriculomegalia, anormalidades do corpo caloso e redução do volume cerebral (ARAGÃO *et al.*, 2019). Neonatos podem também apresentar trombose venosa e vasculopatia lenticuloestriada, disfunção do tronco encefálico, hipoplasia cerebelar, diminuição do volume cerebral e artrogripose (DEL CAMPO *et al.*, 2017; MELO *et al.*, 2016).

Os sinais e sintomas advindos dessas características são: microcefalia fetal ou pós-natal, alterações auditivas e oftalmológicas, epilepsia, irritabilidade e desproporção craniofacial, suturas intracranianas sobrepostas, excesso de pele na nuca, proeminência do osso occipital. Dentre as alterações oftalmológicas foram descritos estrabismo, cicatriz coriorretiniana, maculopatia e cegueira. Anormalidades nos membros e atraso no desenvolvimento psicomotor foram descritos, apresentando hipertonia, hipotonia, discinesia, hemiplegia, hemiparesia e espasticidade (TEIXEIRA *et al.*, 2018; VENTURA *et al.*, 2016).

As imagens por tomografia computadorizada (CT) e a ressonância magnética (MRI), assim como a ultrassonografia são úteis ao acessar possíveis alterações no desenvolvimento fetal (CASTRO *et al.*, 2017).

Figure 5. Representação dos eventos até a apresentação da Síndrome Congênita do Zika Vírus em neonato, com volume cerebral reduzido. Imagem modificada de Saiz *et al.*, 2017 e Rombi *et al.*, 2020.

1.6. Imunopatogênese do ZIKV

Devido as consequências que essa infecção pode acarretar, principalmente a síndrome congênita do Zika, houve um aumento significativo da produção científica com o objetivo de compreender melhor a relação do vírus com o sistema imunológico humano e com as alterações do desenvolvimento fetal. Estudos mostraram que após a infecção pelo ZIKV as células humanas produzem grandes quantidades de citocinas após a entrada celular mediada pelos receptores de superfície como DC-SIGN, AXL, TYRO3, e TIM-1 (FAIZAN *et al.*, 2017). Na fase aguda de infecção há a produção de citocinas pró-inflamatórias sistemicamente (IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α), citocinas que desempenham a ativação de linfócitos T (IL-2, IL-4, IL-13, IL-17, IL-9) e interferons do tipo I (IFN- α/β) (LUM *et al.*, 2018; TAPPE *et al.*, 2016; NAVECA *et al.*, 2018).

O interferon do tipo I, que é liberado por todas as células nucleadas, exerce importante controle do vírus Zika, inibindo a replicação viral, ativando as células NK e induzindo a regulação positiva de MHC de classe I (GLASNER *et al.*, 2017; KUMAR *et al.*, 2016). Camundongos deficientes de sinalização do interferon do tipo I (*Ifnar1*^{-/-}) infectados pelo ZIKV tiveram progênie com restrição do crescimento intrauterino ou perda fetal (MINER *et al.*, 2016).

Diversos trabalhos mostram que o ZIKV evade da ação do IFN do tipo I por diferentes mecanismos. Pesquisas realizadas com cultura de células demonstraram que a proteína NS5

do ZIKV se liga e degrada STAT2, fator de transcrição envolvido na sinalização intracelular do IFN, inibindo os genes estimulados por interferon (ISGs) e consequentemente bloqueando a ação antiviral exercida por esta citocina (GRANT *et al.*, 2017; LAZEAR *et al.*, 2017). Outro estudo demonstrou que as proteínas não estruturais NS1 e NS4 do ZIKV interagem e bloqueiam a fosforilação de TANK-binding kinase 1 (TBK1), importante na sinalização celular que ocorre após o reconhecimento viral, para a produção de IFN- β . Já as proteínas NS2B-NS3 do ZIKV inibem a cascata de sinalização intracelular induzida pelo IFN pela degradação de Jak 1, proteína integrante desse processo (WU *et al.*, 2017). Adicionalmente, o ZIKV bloqueia a fosforilação de STAT1 e STAT2 em células dendríticas humanas, auxiliando no escape da resposta antiviral de IFN I (BOWEN *et al.*, 2017).

Uma vez que o vírus evade o sistema imune, acaba se replicando no hospedeiro, principalmente gestantes, conseguindo ultrapassar a placenta e infectar o feto, levando a doença neonatal.

A imunidade da mulher muda durante a gravidez para garantir a tolerância materna ao feto através da liberação de hormônios específicos, variando para estados anti-inflamatórios e pró-inflamatórios em diferentes momentos da gestação, prevenindo a rejeição fetal e placentária e combatendo infecções durante esse período. Essa modulação imunológica leva a redução no número de células dendríticas e monócitos, na diminuição da atividade de macrófagos e inibição de células B, T e células natural killer (NK) prevalecendo um perfil de resposta Th2 (KING; TEIXEIRA; MAHALINGAM, 2017). A gestação é capaz de alterar a resposta da imunidade inata local em modelo murino. Após inoculação de ZIKV intravaginal, camundongos prenhes apresentaram maiores frequências de células dendríticas tolerogênicas no útero e macrófagos uterinos em comparação aos camundongos que não estavam prenhes, sugerindo que o controle imunológico da infecção viral aguda pode diminuir em gestantes (LESTEBERG; FADER; BECKHAM, 2019).

A placenta é constituída de uma porção fetal, o córion viloso e de uma porção materna, a decídua, correspondente a camada funcional do endométrio. Cada vilosidade do córion viloso é revestida por trofoblastos que posteriormente se diferenciam em citotrofoblasto e sinciotrofoblasto. A decídua é rica em macrófagos, células T e principalmente NK deciduais uterinos (dNK). Os dNKs compreendem cerca de 70% dos leucócitos presentes na decídua e atuam protegendo o feto de patógenos por destruir células infectadas, no entanto, essas células são caracterizadas por uma menor atividade citotóxica e maior atividade de suporte gestacional, atuando juntamente ao trofoblasto na placentação, produzindo citocinas imunoreguladoras, fatores angiogênicos e contribuindo no

remodelamento tecidual. Os macrófagos decíduais também exibem um perfil imunoregulador favorecendo o remodelamento tecidual e a angiogênese, fagocitando células apoptóticas prevenindo assim a liberação de mediadores pró-inflamatórios. Ademais, encontram-se na decídua células T CD8⁺ co-expressando Tim-3 e CTLA-4 que desempenham atividade imunossupressiva pela produção de citocinas anti-inflamatórias, a diminuição dessas células está associada a um aumento de citocinas TNF- α e IFN- γ e a ocorrência de abortos. Já as células T CD4⁺ presentes na decídua apresentam a prevalência de um perfil de resposta Th2, devido a liberação das citocinas IL-13, IL-10, IL-4 e IL-6 pelas próprias células da decídua. As células T reguladoras (Treg) se apresentam na decídua em maior quantidade no terceiro trimestre gestacional e desempenham papel importante na tolerância por suprimir linfócitos autoreativos e antígenos paternos pela produção de TGF- β e IL-10 (TEIXEIRA *et al.*, 2020).

O trofoblasto, que permite a nutrição do embrião em desenvolvimento, devido ao mecanismo de tolerância materno não expressam moléculas de MHC nem sob estímulo de IFN- γ . Entretanto, estas células liberam IFN do tipo III (IFN λ 1) com ação tanto parácrina quanto autócrina para proteger da infecção viral (BAYER *et al.*, 2017). Foi observado que IFN λ 1 contribui nas respostas anti-ZIKV em modelo murino, a administração desse mediador no meio da gestação reduziu a carga de ZIKV em órgãos maternos e fetais e reduziu as lesões placentárias e a morte fetal (CHEN *et al.*, 2017).

Além dos trofoblastos presentes nos vilos coriônicos, macrófagos residentes placentários (células de Hofbauer) também estão presentes, conferindo a barreira celular da placenta (QUICKE *et al.*, 2017; TABATA *et al.*, 2017). Estudos demonstraram que o ZIKV pode infectar os fibroblastos dos vilos da placenta e as células de Hofbauer, que tem a habilidade de migrar para os vasos do feto, sendo assim, a hipótese mais provável atualmente é de que o ZIKV poderia estar usando essas células para poder chegar até os vasos fetais (DE NORONHA *et al.*, 2016) (Figura 6).

Figura 6. O ZIKV atravessa a placenta infectando as células de Hofbauer, que tem acesso aos vasos fetais, chegando até o feto. Imagem adaptada de Rombi *et al.*, 2020.

Uma vez que o ZIKV chega até o feto, é proposto que se espalhe por disseminação hematogênica ou pelo líquido cefalorraquidiano (NOWAKOWSKI *et al.*, 2016). Acredita-se que as células progenitoras neurais e a glia radial são os principais alvos do ZIKV, sendo a glia radial o grupo de células primeiramente afetado pelo vírus, visto que possuem alta expressão de receptores AXL, viabilizando a entrada viral. A glia radial são um grupo de células progenitoras do córtex cerebral fetal que dão origem a neurônios, astrócitos e oligodentrócitos, e a entrada do ZIKV nessas células pode levar a apoptose e inibição do crescimento neural levando a alterações na formação do cérebro fetal. Em menor proporção, foi sugerido que o ZIKV também infecta neurônios maduros, contribuindo na magnitude das malformações fetais (ROMBI *et al.*, 2020).

Diversas pesquisas relacionadas ao ZIKV trouxeram evidências que avançaram no conhecimento sobre essa temática. No entanto, há algumas questões que ainda permanecem, não se sabe o porquê nem todos os fetos são afetados pela infecção gestacional do ZIKV e se a imunidade da gestante influencia na habilidade do vírus ultrapassar a barreira placentária. O entendimento da mudança do perfil imunológico na gestação e o comportamento imunológico da gestante diante a infecção pelo ZIKV são importantes para compreender as alterações congênitas observadas no recém-nascido.

2. OBJETIVO

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Investigar os parâmetros virológicos e imunológicos a partir de amostras de uma coorte de gestantes infectadas com o vírus Zika (ZIKV) durante a gestação a fim de esclarecer os aspectos da associação desta infecção com o desenvolvimento de doenças neonatais.

2.2. Objetivos específicos

- Coletar e analisar quanto a presença de material genético de ZIKV as amostras de soro de gestantes com acompanhamento de pré-natal na rede básica de saúde.
- Investigar a presença de anticorpos neutralizantes anti-ZIKV em amostras de soro de gestantes com acompanhamento de pré-natal na rede básica de saúde.
- Coletar e avaliar dados clínico-epidemiológicos referentes às gestantes incluídas na coorte nos respectivos sistemas de informação disponíveis.
- Dosar e comparar o perfil de citocinas de soro de gestantes que foram positivas e negativas para o ZIKV e que tiveram ou não recém- nascidos com algum tipo de doença, a fim de determinar alguma discrepância entre os grupos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Construção de uma coorte de gestantes

Este foi um estudo prospectivo baseado em uma coorte de gestantes pré- estabelecida na rede básica de saúde da cidade de Ribeirão Preto- SP. A coorte de gestantes foi construída com o apoio do Programa de Assistência Integral de Saúde da Mulher (PAISM) da Secretaria de Saúde de Ribeirão Preto durante o período de fevereiro de 2016 à março de 2017 (Figura 7).

A captação e admissão das gestantes foram realizadas na rede básica de saúde de Ribeirão Preto (UBS/UBDS), em que foi coletado uma amostra de sangue de toda paciente grávida que aceitou participar do estudo nas consultas mensais de pré-natal (5,0mL em tubos BD Vacutainer® SST™ II Advance). Essas amostras foram discriminadas com um selo arredondado de cor vermelha e encaminhados à Secretaria de Saúde de Ribeirão Preto, onde foram separadas e encaminhadas no mesmo dia ao Laboratório de Virologia Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - FMRP/USP. Em seguida as amostras foram processadas, colocadas em tubos de congelamento e armazenadas no freezer a -70°C até a realização dos ensaios.

Todas as gestantes foram informadas à respeito do objetivo do estudo e de sua importância. Aquelas que concordaram em participar da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelos Comitês de Ética do Hospital das Clínicas da FMRP/USP e da Secretaria de Saúde de Ribeirão Preto (Número do parecer do Comitê de Ética em Pesquisa: 1.428.859). Todo o seguimento de pré-natal foi feito sob coordenação do Programa de Assistência integral à Saúde da Mulher da Secretaria de Saúde de Ribeirão Preto.

As pacientes foram submetidas regularmente durante a gravidez a dois exames ultrassonográficos. Aquelas que tiveram detecção de má-formação fetal e apresentaram positividade para ZIKV pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL) foram referenciadas para o Ambulatório de Defeitos no Desenvolvimento Fetal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (AMEFE–HC-FMRP-USP), não sendo mais acompanhadas no estudo.

Tanto a solicitação de exames complementares como o ultrassom morfológico coube ao obstetra responsável pelo atendimento pré-natal destas gestantes.

O tempo de seguimento foi variável para cada gestante, pois elas foram admitidas no estudo em diferentes estágios da gestação, porém, todas foram seguidas até o momento do parto.

Foram considerados critérios de inclusão: ser residente de Ribeirão Preto e ser gestante com acompanhamento na rede básica de saúde de Ribeirão Preto. Co-morbididades como hipertensão arterial e diabetes não foram critérios de exclusão. Os critérios de exclusão foram: paciente com amostra insuficiente para a realização dos testes diagnósticos e paciente sem informações clínico-epidemiológico nos sistemas de informação em saúde.

Figura 7. Fluxograma da construção de um coorte de gestantes com acompanhamento de pré-natal na rede básica de saúde de Ribeirão Preto no período de fevereiro de 2016 à março de 2017.

3.2. Coleta de dados clínico-epidemiológicos das gestantes

Todas as gestantes com amostras coletadas foram investigadas quanto a presença de sintomas de ZIKV pela respectiva notificação de suspeita de ZIKV no sistema de informação CeVeSP (Central de Vigilância de Emergência em Saúde Pública- SP). No CeVeSP estão contidas as fichas de investigação de gestantes com exantema em qualquer idade gestacional que foram notificadas com suspeita de ZIKV junto ao sistema de saúde de Ribeirão Preto.

As pacientes encontradas neste sistema de informação tiveram coletadas informações estabelecidas em suas respectivas fichas de investigação como: data de início de sintomas, data de nascimento ou idade, data da investigação, data da última menstruação (DUM), idade gestacional (IG) ao ser notificada, data de nascimento do recém-nascido (RN) e resultados de exames realizados no pré-natal como investigação de Sífilis, Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovírus e Herpes. Além disso, é disponível na ficha o desfecho da gestação em RN saudável, RN com malformação congênita e evolução para aborto, natimorto ou óbito neonatal.

Informações do RN das gestantes notificadas com suspeita de ZIKV, como peso ao nascer, perímetro cefálico, altura e apgar, foram coletadas do sistema de informação SINASC (Sistema de Informação sobre Nascidos Vivos). O SINASC reúne dados da ficha de declaração de nascido vivo, completada ao nascimento do RN e emitida pelo profissional de saúde responsável pelo acompanhamento da gestação, parto ou recém-nascido.

As pacientes não encontradas no CeVeSP, portanto que não foram notificadas com suspeita de infecção pelo ZIKV, tiveram seus dados clínicos e da gestação coletados no sistema de informação HYGIA WEB. O HYGIA WEB é um sistema de informação em saúde de Ribeirão Preto, que contém informações de prontuário e de atendimento do paciente.

Foram coletadas informações como data de nascimento ou idade, DUM, data de nascimento do RN, peso ao nascer, Apgar e resultados de exames realizados no pré-natal como investigação de Sífilis, Toxoplasmose, Citomegalovírus, HIV, Hepatite B e C. Foram também investigados o desfecho da gestação em RN saudável, RN com malformação congênita e evolução para aborto, natimorto ou óbito neonatal. Informações não encontradas no HYGIA WEB foram pesquisadas no SINASC.

3.3. Testes diagnósticos

A fim de otimizar o diagnóstico de ZIKV das amostras coletadas, separou-se as gestantes em notificadas com suspeita de infecção de ZIKV pelo sistema de saúde de Ribeirão Preto e aquelas sem notificação de suspeita de infecção pelo ZIKV.

Pacientes com notificação de suspeita de ZIKV pelo sistema de saúde de Ribeirão Preto, por terem apresentado sintomas, foram investigadas quanto a presença de material genético de ZIKV na amostra de soro coletada próxima à data do início de sintomas por meio da reação em cadeia da polimerase precedida da transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR). Além disso, foram investigados a presença de anticorpos neutralizantes por PRNT

(teste de neutralização por redução de placas) da última amostra coletada, prioritariamente, daquelas pacientes que apresentaram amostra negativa para RT-qPCR, com o objetivo de confirmar se houve ou não infecção pelo ZIKV durante a gestação.

As gestantes que não foram notificadas com suspeita de infecção pelo ZIKV foram avaliadas quanto à infecção pelo ZIKV durante a gestação pela presença de anticorpos neutralizantes por meio do PRNT da última amostra coletada. Aquelas que apresentaram resultado negativo foi realizado RT-qPCR de uma das amostras para confirmar o resultado.

3.3.1. Produção do estoque viral e titulação por ensaio de placa

Para a preparação do estoque viral células VERO foram cultivadas em garrafas de 25 cm² com meio de cultura celular DMEM com 1% de antibiótico/ anti-micótico (penicilina/ estreptomicina- Cultilab) e suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), as células foram mantidas em estufa incubadora de CO₂ à 37°C. Após confluência celular de 95% as células foram infectadas com a cepa ZikaSPH2015 (CUNHA *et al.*, 2016) com MOI de 0,1. As células foram então incubadas por 1 hora em agitação leve à 37°C para a adsorção viral. Após isso, as partículas virais residuais foram removidas por meio da lavagem da garrafa com solução de PBS 1X, e foi adicionado meio de cultura DMEM com 1% de antibiótico/ anti-micótico e suplementado com 2% de SBF. A garrafa foi mantida na estufa incubadora de CO₂ à 37°C de 5 à 6 dias, período correspondente à observação do efeito citopático. Quando observado o efeito citopático, o sobrenadante foi coletado e centrifugado à 9000 rpm por 10 minutos à 4°C, para a separação e remoção dos debris celulares. Este sobrenadante foi aliquoteado e armazenado à -70°C até o uso no ensaio de formação de placa.

A quantificação do estoque viral produzido foi realizada por meio do ensaio de formação de placas, realizado em placas de 24 poços semeadas com células VERO. Para a titulação do estoque viral foi utilizada uma alíquota do estoque viral contendo 50µL. Essa alíquota foi diluída em 450µL de meio DMEM com 1% de antibiótico/ anti-micótico e a partir desta diluição foram realizadas mais 10 diluições seriadas 1:10. 200µL de cada diluição foram adicionados em duplicada na placa preparada com células Vero.

Para a adsorção do vírus na célula, a placa foi incubada por 1 hora com agitação leve à 37°C. Após esse período, o inóculo viral foi removido e foi adicionado um meio semissólido constituído de 3g de Carboximetilcelulose (CMC) diluído em 100mL de água ultrapura e meio de cultura DMEM 2X contendo 2% de SBF e 1% de antibiótico/ anti-micótico. O meio

semissólido restringe a movimentação viral de modo que o vírus ao sair da célula infectada apenas infecte células vizinhas a esta, formando placas de lise na monocamada de células.

A placa foi mantida em estufa incubadora de CO₂ à 37°C por 5 dias. Após isso, o sobrenadante foi removido e as células foram fixadas com 500µL de solução de formaldeído 10X por 30 minutos em agitação leve à temperatura ambiente. Em seguida, o formaldeído foi removido e as células foram coradas com 300µL de solução de cristal violeta a 2% em agitação leve por 30 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, a placa foi lavada com água para remover o excesso de cristal violeta, possibilitando observar pontos sem coloração indicando as placas de lise celular (PFU). A média do número de placas observada na duplicada foi extrapolada para PFU/mL. O estoque viral produzido teve uma titulação de $5,25 \times 10^5$ PFU/mL.

3.3.2. Reação em cadeia da polimerase precedida da transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR)

Para a investigação de material genético de ZIKV em soro de gestantes procedeu-se a extração de RNA viral das amostras utilizando o kit QIAamp RNA Viral (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante. Após isso, a amplificação do segmento viral foi efetuada utilizando o kit comercial TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix (Thermo Fisher Scientific) utilizando 2 pares de *primers* e suas respectivas sondas conforme descrito na Tabela 1. Os pares de *primers* e sondas foram selecionados conforme especificidade e sensibilidade apresentado em estudos anteriores (MORAES *et al.*, 2018). As amostras foram testadas primeiramente utilizando o par de *primers* e sonda ZIKV-E, aquelas que apresentaram resultado negativo foram então testadas utilizando o par de *primers* e sonda ZIKV-B.

Ambas as reações foram feitas em um volume final de 10 µL, contendo 0,125 µL de primer forward, 0,125 µL de primer reverse, 0,125 µL de sonda, 2,5 µL de master mix, 4 µL de RNA viral e 3,125 µL de água ultra pura livre de RNase. A RT-qPCR em tempo real foi realizada pelo software Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR.

Antes da PCR o RNA é utilizado como molde para a síntese de cDNA utilizando uma temperatura de 50°C por 10 minutos, prosseguido da temperatura de 95°C por 1 minuto, para a inativação da transcriptase reversa e ativação da polimerase. Posteriormente foi realizado 45 ciclagens de 95°C por 15 segundos para a desnaturação da fita dupla do cDNA e 60°C por 45 segundos para o anelamento dos oligonucleotídeos e extensão das fitas de DNA. Em seguida, o aparelho realiza a quantificação baseada na

quantidade de fluorescência emitida pela sonda FAM. As amostras foram avaliadas apenas qualitativamente em positivo ou negativo para a presença de genoma viral de ZIKV.

Tabela 1. Sequência de *primers* e sondas utilizados na detecção de RNA do ZIKV por RT-qPCR em tempo real.

<i>Primer/ Sonda</i>	<i>Sequência</i>	<i>Referência</i>
<i>Primer Foward ZIKV-E</i>	5' AAGTTTGCATGCTCCAAGAAAAT 3'	Pyke <i>et al.</i> , 2014
<i>Primer Reverse ZIKV-E</i>	5' CAGCATTATCCGGTACTCCAGAT 3'	Pyke <i>et al.</i> , 2014
Sonda ZIKV-E	5'-FAM-ACCGGGAAGAGCATCCAGCCAGA-MGB-3'	Pyke <i>et al.</i> , 2014
<i>Primer Foward ZIKV-B</i>	5' CCGCTGCCCCAACACAAG 3'	Lanciotti <i>et al.</i> , 2008
<i>Primer Reverse ZIKV-B</i>	5' CCACTAACGTTCTTTTGACAGACAT 3'	Lanciotti <i>et al.</i> , 2008
Sonda ZIKV-B	5'-FAM-AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA- MGB-3'	Lanciotti <i>et al.</i> , 2008

3.3.3. Detecção de anticorpos neutralizantes anti-ZIKV por PRNT (*Plaque Reduction Neutralization Test*)

Para a detecção de anticorpos neutralizantes anti-ZIKV é realizado o teste de neutralização PRNT₅₀ com *cut-off* de 1:500. Segundo Persona (2018), esta diluição de soro apresentou resultados mais específicos de detecção, minimizando reações cruzadas.

Neste teste, alíquota de cada uma das amostras foram previamente mantidas à 56°C por 1 hora para que o sistema complemento presente na amostra fosse inativado e não interferisse no resultado final do ensaio. Em seguida as amostras foram diluídas 1:500 com meio de cultura DMEM contendo 1% de antibiótico/ anti-micótico. Para controle do ensaio, uma amostra com altos títulos de neutralização para o ZIKV (controle positivo) e outra amostra com ausência de anticorpos anti-ZIKV (controle negativo) foram também mantidas à 56°C por 1 hora para a inativação e foram diluídas de maneira igual.

Foram adicionadas 60 unidades formadoras de placas (PFU) de ZIKV nas amostras diluídas e foram mantidas em estufa incubadora de CO₂ à 37°C por 1 hora, para ocorrer a neutralização do ZIKV por anticorpos neutralizantes presentes na amostra. Em seguida, as amostras foram dispostas em uma placa de 24 poços contendo células Vero com confluência de 95 a 100%. A placa foi incubada em estufa de CO₂ à 37°C por 1 hora, para que houvesse a adsorção viral caso o vírus não tenha sido neutralizado.

O inóculo foi removido e foi adicionado a cada poço da placa o meio semissólido constituído de 3g de Carboximetilcelulose (CMC) diluído em 100mL de água ultrapura e meio de cultura DMEM 2X contendo 2% de SBF e 1% de antibiótico/ anti-micótico. Sendo

possível garantir que cada partícula viral se restringisse próximo ao local de infecção. A placa foi mantida em estufa de CO₂ à 37°C por 5 a 6 dias.

Após esse período, o meio semissólido foi removido e as células foram fixadas com formaldeído 10X por 30 minutos em agitação leve à temperatura ambiente. O formaldeído foi retirado e as células foram coradas utilizando-se cristal violeta a 2% em agitação leve por 30 minutos à temperatura ambiente. O corante foi removido, a placa foi lavada com água para remoção do excesso de cristal violeta.

À observação da placa, o controle positivo por apresentar alto título de neutralização do ZIKV, apresentou-se com tapete celular corado intacto, já que os anticorpos se ligam as partículas virais e estas não conseguem causar lise celular. No controle negativo, por se tratar de uma amostra com ausência de anticorpos anti-ZIKV, apresentou-se com pequenos pontos sem coloração chamados de placas que indicam lise celular; como não há anticorpos para neutralizar as partículas virais, estas conseguem entrar na célula e causar morte celular.

As amostras que apresentaram neutralização de mais de 50% das partículas virais de ZIKV são consideradas positivas, ou seja, as pacientes foram infectadas pelo vírus e tem presente em sua amostra de soro anticorpos anti-ZIKV. Aquelas que apresentaram menos de 50% de neutralização das partículas virais de ZIKV, não foram consideradas como infectadas pelo ZIKV e não possuem anticorpos específicos anti-ZIKV.

3.4. Dosagem e análise do perfil de citocinas em amostra de soro

A fim de analisar o perfil imunológico de gestantes infectadas pelo ZIKV que tiveram RN com doenças neonatais e aquelas que tiveram RN sem qualquer alteração, foi realizada a dosagem das citocinas por meio da utilização de *beads* magnéticas, utilizando o kit MILLIPLEX® MAP Human Th17 Magnetic Bead Panel (Millipore).

Esta técnica envolve uma mistura de microesferas de poliestireno magnéticas (*beads* magnéticas) recobertas por anticorpos específicos para citocinas humanas. Após o anticorpo se ligar especificamente a citocina, outro anticorpo ligado a uma ficoeritrina (PE) se liga ao complexo *bead*-citocina, sendo assim, a quantificação é permitida pela fluorescência emitida dessa ligação.

A preparação das *beads* magnéticas, dos controles, da solução de matriz, da curva padrão e da solução de lavagem foram realizadas conforme instruções do kit. Um volume de 25µL de amostra de soro foi incubado com 25µL de *beads* magnéticas em uma placa de 96 poços, com agitação moderada e protegido da luminosidade à 4°C por 18h. Em seguida, a

placa foi lavada em placa magnética duas vezes com solução de lavagem, sendo adicionado 25µL de anticorpo de detecção em cada poço. A placa foi mantida ao abrigo da luz em agitação moderada por uma hora à temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado 25µL de ficoeritrina conjugada à estreptavidina em cada poço e novamente a placa foi mantida ao abrigo da luz em agitação moderada por 30 minutos à temperatura ambiente. Duas novas lavagens em placa magnética foram realizadas utilizando a solução de lavagem e incubado com o *Drive Fluid* por 5 minutos em agitação moderada. A leitura da placa foi realizada pelo Luminex MAGPIX® utilizando os softwares Xponent (Luminex) e Milliplex Analyst (Millipore).

Foram selecionadas citocinas pró-inflamatórias e citocinas anti-inflamatórias para a dosagem e análise nas amostras de gestantes sendo elas: GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-22, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, IL-13.

As pacientes que apresentaram amostra com resultado positivo para o RT-qPCR ou PRNT foram consideradas infectadas pelo ZIKV durante a gestação, porém somente as que tiveram amostra coletada durante a fase aguda da infecção (positiva por RT-qPCR) foram consideradas na análise de citocinas, visto que essas proteínas tem maior produção nesse período.

Foram consideradas na quantificação das citocinas, pacientes com diferentes desfechos gestacionais. As gestantes que tiveram RN saudáveis foram consideradas com desfecho gestacional positivo e as que apresentaram RN com malformação congênita, natimorto, óbito neonatal ou evoluíram para aborto, foram caracterizadas com desfecho negativo.

Para a dosagem e análise do perfil de citocinas as gestantes foram separadas em 4 grupos:

- Pacientes que tiveram ZIKV na gestação e apresentaram desfecho negativo (grupo de estudo). Foram selecionadas 29 pacientes, destas todas tinham amostra coletada na fase aguda da infecção e apenas 5 tinham amostras coletadas na fase de convalescença.

- Pacientes que tiveram ZIKV na gestação e apresentaram desfecho positivo. No total 30 pacientes foram selecionadas, sendo que todas tinham amostra coletada na fase aguda da infecção e somente 7 continham amostras de convalescença.

- Pacientes que não tiveram ZIKV na gestação (negativo por RT-qPCR e PRNT) e apresentaram desfecho negativo. Totalizaram 8 pacientes selecionadas.

- Pacientes que não tiveram ZIKV na gestação (negativo por RT-qPCR e PRNT) e apresentaram desfecho positivo. Foram selecionadas 29 pacientes.

Foi analisado uma amostra na fase aguda de infecção e uma amostra na fase de convalescença (as que tinham amostras coletadas) das pacientes positivas por ZIKV. Das gestantes negativas para o ZIKV as citocinas foram analisadas em apenas uma amostra de cada paciente.

As pacientes dos diferentes grupos foram selecionadas de modo que a idade e idade gestacional fossem proporcionais nos quatro grupos.

3.5. Análise Estatística

Para testar as diferenças entre 2 grupos foram aplicados os testes t de Student (paramétrico) ou Mann-Whitney (não-paramétrico) bi-caudais. Para comparação de 3 ou mais subgrupos de pacientes, foram utilizadas análises de ANOVA (paramétrica) ou Kruskal-Wallis (não-paramétrica), seguidas dos pós testes de Tukey e Dunn, respectivamente. A decisão entre aplicação de testes paramétricos e não-paramétricos foi baseada no resultado do teste Kolmogorov-Smirnov ou Shapiro-Wilks de normalidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software GraphPad Prim 8. Para todos os testes utilizados o nível de significância adotado foi $\alpha=0,05$.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização das amostras

Foram recebidas amostras de 989 gestantes no período de fevereiro de 2016 à março de 2017. Ao coletar os dados no sistema de informação CeVeSP, constatou-se que 343 gestantes foram notificadas com suspeita de infecção por ZIKV, destas, 5 residiam fora de Ribeirão Preto, 2 possuíam amostra insuficiente para os testes, e 1 não tinha informações sobre a gestação no sistema de informação, sendo excluídas do estudo, totalizando 335 pacientes notificadas com suspeita de ZIKV.

Quanto aos desfechos gestacionais, 308 pacientes tiveram RN saudáveis, 17 evoluíram para aborto, 7 tiveram RN com malformações congênicas, 2 tiveram natimortos e 1 gestante teve um óbito neonatal.

Destas pacientes, apenas 3 tiveram 9 coletas de amostra de soro, 3 pacientes com 8 coletas, 5 com 7 coletas, 6 pacientes com 6 coletas, 10 pacientes com 5 coletas, 12 com 4 coletas, 21 com 3 coletas, 61 com 2 coletas e 214 com apenas 1 amostra coletada. A quantidade de amostras coletadas por paciente de acordo com o desfecho gestacional é descrita na tabela 2.

Tabela 2. Número de coletas de soro das gestantes que foram notificadas com suspeita de infecção por ZIKV pelo sistema de saúde de Ribeirão Preto no período de fevereiro de 2016 à março de 2017 de acordo com o desfecho gestacional.

Número de Amostras Coletadas	Desfecho Gestacional					Total
	RN Saudável	RN com Malformação Congênita	Aborto	Natimorto	Óbito neonatal	
1 amostra	195	3	14	1	1	214
2 amostras	57	3	0	1	0	61
3 amostras	17	1	3	0	0	21
4 amostras	12	0	0	0	0	12
5 amostras	10	0	0	0	0	10
6 amostras	6	0	0	0	0	6
7 amostras	5	0	0	0	0	5
8 amostras	3	0	0	0	0	3
9 amostras	3	0	0	0	0	3

Um total de 646 pacientes não foram encontradas no CeVeSP, ou seja, não foram notificadas com suspeita de infecção pelo ZIKV. Ao se investigar no sistema de informação HYGIA WEB, observou-se que este não continha dados referentes a 115 pacientes, sendo estas excluídas do estudo. Das 531 pacientes sem notificação de suspeita de infecção pelo ZIKV que foram incluídas no estudo, 481 tiveram RN saudável, 37 evoluíram para aborto, 9 pacientes tiveram RN com malformação congênita, 3 tiveram óbito neonatal e 1 teve um natimorto.

Apenas 1 paciente apresentou 9 coletas de soro, enquanto que 7 pacientes tiveram 8 coletas, 35 gestantes 7 coletas, 37 apresentaram 6 coletas, 38 apresentaram 5 coletas, 38 apresentaram 4 coletas, 55 gestantes 3 coletas, 74 gestantes 2 coletas e 246 pacientes apresentaram apenas 1 amostra coletada. A tabela 3 descreve a proporção de amostras coletadas por desfecho gestacional.

O número de amostras de cada paciente, variou de acordo com a idade gestacional de quando a paciente iniciou as consultas de pré-natal na rede básica de saúde durante o estudo. Além das gestantes que iniciaram o pré-natal tardiamente e as que já estavam no final da gestação quando iniciado o estudo, apresentaram um menor número de coletas também as gestantes que tiveram positividade para ZIKV pelo IAL, que foram encaminhadas ao hospital de alta complexidade, as que não deram continuidade ao pré-natal na rede pública de saúde e aquelas que tiveram perda fetal. Sendo assim, tanto as pacientes com notificação de suspeita de ZIKV quanto aquelas sem notificação, as que tiveram desfecho negativo (RN com malformação neonatal, aborto, natimorto ou óbito neonatal) apresentaram um menor número de coletas, sendo importante salientar que de acordo com o HYGIA WEB, as pacientes sem notificação que exibiram malformação do RN, natimorto e óbito neonatal tiveram de 3 a 13 consultas de pré-natal.

Tabela 3. Número de coletas de soro das gestantes que não foram notificadas com suspeita de infecção por ZIKV com acompanhamento de pré-natal na rede pública de saúde de Ribeirão Preto no período de fevereiro de 2016 à março de 2017 de acordo com o desfecho gestacional.

Número de Amostras Coletadas	Desfecho Gestacional					Total
	RN Saudável	RN com Malformação Congênita	Aborto	Natimorto	Óbito neonatal	
1 amostra	207	7	29	1	2	246
2 amostras	67	0	7	0	0	74
3 amostras	53	1	1	0	0	55
4 amostras	37	1	0	0	0	38
5 amostras	38	0	0	0	0	38
6 amostras	36	0	0	0	1	37
7 amostras	35	0	0	0	0	35
8 amostras	7	0	0	0	0	7
9 amostras	1	0	0	0	0	1

4.2. Testes Diagnósticos

Todas as 335 gestantes notificadas com suspeita de ZIKV tiveram as amostras testadas por RT-qPCR, enquanto somente 84 pacientes foram testadas quanto a presença de anticorpos neutralizantes anti-ZIKV, priorizando a análise daquelas que foram negativas por RT-qPCR com desfecho negativo (RN com malformação congênita, aborto, natimorto e óbito neonatal). As gestantes que foram testadas positivas quanto a presença de material genético do ZIKV totalizaram 183, enquanto que 152 foram negativas.

As 183 gestantes que foram positivas por RT-qPCR, diferem quanto ao desfecho gestacional, sendo que 166 mulheres apresentaram RN saudáveis, 10 evoluíram para aborto, 5 tiveram RN com malformação congênita, havendo 1 natimorto e 1 óbito neonatal.

Apenas 45 gestantes que foram positivas por RT-qPCR foram testadas quanto a presença de anticorpos neutralizantes anti-ZIKV (PRNT). Destas 35 apresentaram anticorpos neutralizantes (27 mulheres que tiveram RN saudável, 5 que evoluíram para aborto e 3 que tiveram RN com malformação congênita) e 10 não apresentaram anticorpos anti-ZIKV (9 pacientes que tiveram RN saudáveis e 1 que apresentou RN com malformação congênita). É justificável que destas 10 pacientes, a maioria tinha apenas 1 coleta de amostra não tendo portanto anticorpos anti-ZIKV.

Quanto ao desfecho gestacional das 152 pacientes negativas por RT-qPCR, 142 mulheres apresentaram RN saudável, 7 pacientes evoluíram para aborto, 2 tiveram RN com malformação congênita e 1 gestante apresentou um natimorto. Das pacientes negativas 39 foram investigadas quanto à infecção pelo ZIKV durante a gestação através da análise da presença de anticorpos neutralizantes anti-ZIKV (PRNT) da última amostra coletada, priorizando a análise das amostras de pacientes que apresentaram desfecho negativo. Constatou-se que 17 pacientes foram positivas quanto a presença de anticorpos neutralizantes anti-ZIKV, destas, 14 tiveram RN saudáveis, 2 tiveram RN com malformação congênita e 1 paciente evoluiu para aborto. Das pacientes com resultados negativos para a presença de anticorpos neutralizantes anti-ZIKV 15 apresentaram RN saudável, 6 evoluíram para aborto e 1 apresentou um natimorto.

Amostras de 110 pacientes (incluindo todos os casos de desfecho negativo de gestação) das 531 sem notificação de suspeita de infecção pelo ZIKV foram analisadas quanto a presença de anticorpos neutralizantes anti-ZIKV. Constatou-se que 35 gestantes foram positivas (25 mulheres que tiveram RN saudável, 5 que evoluíram para aborto, 2 que tiveram RN com malformação congênita e 3 que apresentaram óbito neonatal) e 75 foram negativas (35 pacientes apresentaram RN saudável, 6 tiveram RN com malformação congênita, 32 evoluíram para aborto, 1 obteve um óbito neonatal e 1 apresentou um natimorto). Devido ao fato da maioria das pacientes negativas terem apresentado de 1 a 2 coletas, caso estivessem na fase de viremia não apresentariam anticorpos anti-ZIKV, portanto 55 pacientes que apresentaram resultado negativo para o PRNT foram selecionadas para análise por RT-qPCR. Observou-se que 17 pacientes foram positivas (10 pacientes que evoluíram para aborto, 5 mulheres que tiveram RN saudável, 1 que apresentou RN com malformação congênita e 1 que teve um natimorto) enquanto 38 gestantes foram negativas (30 mulheres que tiveram RN saudável, 6 que evoluíram para aborto e 2 pacientes que apresentaram RN com malformação congênita) (Figura 8).

Sendo assim, observa-se que 57,8% (52) das pacientes sem notificação foram positivas para o ZIKV, destas cerca de 42,3% (22) apresentaram desfecho gestacional negativo, incluindo em maior proporção pacientes que evoluíram para aborto (28,8%), seguido de malformação congênita do RN (5,8%), óbito neonatal (5,8%) e natimorto (1,9%). Ao reunir os resultados dos testes diagnósticos de pacientes notificadas, observa-se resultado semelhante, as que foram positivas e tiveram desfecho gestacional negativo, apresentaram em maior proporção aborto (5,5%), seguido de malformação congênita do RN (3,5%), óbito neonatal (0,5%) e natimorto (0,5%) (Tabela 4).

Figura 8. Fluxograma dos resultados dos testes diagnósticos (RT-qPCR e PRNT) de gestantes com acompanhamento de pré-natal na rede básica de saúde de Ribeirão Preto no período de fevereiro de 2016 à março de 2017 de acordo com o desfecho gestacional.

Tabela 4. Resultado dos testes diagnósticos de gestantes notificadas ou não com suspeita de infecção pelo ZIKV de acordo com o desfecho gestacional.

Desfecho Gestacional	ZIKV Positivo		ZIKV Negativo	
	Notificadas com suspeita de ZIKV (N= 200)	Sem notificação de suspeita de ZIKV (N= 52)	Notificadas com suspeita de ZIKV (N= 22)	Sem notificação de suspeita de ZIKV (N= 38)
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
RN saudável	180 (90)	30 (57,7)	15 (68,2)	30 (79)
Aborto	11 (5,5)	15 (28,8)	6 (27,3)	6 (15,8)
Malformação Congênita	7 (3,5)	3 (5,8)	0	2 (5,2)
Óbito neonatal	1 (0,5)	3 (5,8)	0	0
Natimorto	1 (0,5)	1 (1,9)	1 (4,5)	0

4.3. Caracterização Clínico-epidemiológico das Gestantes ZIKV Positivas

Analizou-se por completo amostras de 312 pacientes nas quais 252 gestantes foram confirmadas infectadas pelo ZIKV durante a gestação (positivo por RT-qPCR ou PRNT).

Apresentaram desfecho positivo (RN saudável) 210 pacientes com mediana de idade de 26 ($\pm 6,3$). Já as gestantes que obtiveram desfecho negativo (RN com malformação congênita, aborto, natimorto e óbito neonatal), totalizaram 42 pacientes com mediana de idade de 29,5 ($\pm 6,8$).

Os desfechos negativos de pacientes que foram infectadas pelo ZIKV apresentaram em maior proporção a evolução para aborto (26), seguido de RN com malformação congênita (10), óbito neonatal (4) e natimorto (2) (Figura 9).

Figura 9. Caracterização das gestações com desfecho negativo que foram confirmadas infectadas por ZIKV por qRT-PCR ou PRNT durante a gestação.

As 26 gestantes que evoluíram para aborto não exibiram alterações nos exames de pré-natal. Destas, 18 evoluíram para aborto no primeiro trimestre de gestação, sendo verificado 2 gestações anembrionárias e 6 apresentaram aborto no segundo trimestre de gestação, sendo constatado um feto com linfangioma. Não foram encontradas informações do período gestacional do aborto de 2 pacientes. A caracterização dos abortos observados em pacientes notificadas ou não com suspeita de infecção pelo ZIKV foram descritos na tabela 5.

Todas as gestantes que tiveram RN com malformação congênita, não apresentaram alteração dos exames de pré-natal. Dentre as malformações, constatou-se 4 microcefalias, com mediana da medida do perímetro cefálico de 31cm ($\pm 2,75$), sendo um deles caracterizado também com ventriculomegalia bilateral e calcificações intracranianas; apenas 1 RN com microcefalia nasceu pré-termo e 1 RN nasceu com baixo peso.

Observou-se 2 RNs normocefálicos porém com alterações neurológicas, o paciente 21 com ultrassonografia de crânio com calcificações grosseiras e o paciente 99 com ultrassonografia de crânio com alteração, orelhas direita e esquerda alteradas, vasculopatia lenticulo-estriada, vindo posteriormente à óbito com 11 meses de idade por choque séptico. Ambos os neonatos nasceram a termo, sem diminuição de volume cerebral.

Outras malformações observadas foram, um RN com dedo da mão supranumerário, um RN com fenda palatina não especificada, um RN com defeito do septo atrioventricular total com comunicação interatrial (CIA) e comunicação interventricular (CIV) e um RN com ausência, atresia e estenose congênita do ânus sem fístula, todos esses recém-nascidos nasceram a termo.

Os 4 óbitos neonatais foram de RNs que nasceram pré-termo de gestantes com resultado de exames de pré-natal sem alterações. Um óbito neonatal foi de um RN microcefálico, caracterizado com artrogripose, sem dados de peso e Apgar, vindo a falecer 1 hora após o parto. Os demais óbitos neonatais apresentaram baixo peso ao nascer, sendo o segundo caso um RN caracterizado com displasia renal e tetralogia de Fallot, com Apgar 0/0, vindo a óbito 6 minutos após o parto. Outro caso de óbito neonatal foi proveniente de gestante com pré-eclâmpsia grave e com corioangioma placentário, o recém-nascido obteve um Apgar de 2/8, falecendo logo após o nascimento. O quarto caso de óbito neonatal foi caracterizado com outras deformidades congênitas do pé e bolsa-rota de 20 horas, com coleta de cultura anal e vaginal para pesquisa de Streptococcus e urocultura exibindo resultado negativo, o RN apresentou Apgar 4/7 e veio a óbito 6 horas após o parto.

As gestantes que exibiram natimortos também apresentaram resultados de exames de pré-natal sem alterações. Um natimorto nasceu pré-termo, exibindo baixo peso, calcificações periventriculares, apresentando hipoplasia de vérnix, corpo caloso não identificado, membros inferiores hiperextendidos, pés tortos, micrognatia e microcefalia. O outro natimorto nasceu a termo e à necropsia do RN constatou-se estado tóxico- infeccioso e pneumonia intersticial bilateral. A caracterização dos neonatos de pacientes notificadas ou não com suspeita de infecção pelo ZIKV, que tiveram malformação fetal, óbito neonatal e natimorto, foram descritos na tabela 6.

Tabela 5. Descrição da caracterização das gestantes positivas para o ZIKV, notificadas ou não com suspeita de ZIKV às autoridades de saúde, que evoluíram para aborto de acordo com período gestacional de perda fetal.

Suspeita de ZIKV (N)	Características (N)	Paciente	Especificações
Notificadas (N= 11)	Primeiro Trimestre (N= 6)	7	Sem especificações
		6	Sem especificações
		10	Sem especificações
		8	Sem especificações
		9	Sem especificações
		97	Sem especificações
	Segundo Trimestre (N= 3)	1	Sem especificações
		4	Feto com linfangioma
		5	Sem especificações
	Sem informações de IG (N= 2)	2	Sem especificações
		3	Sem especificações
Sem Notificação (N= 15)	Primeiro Trimestre (N= 12)	12	Sem especificações
		11	Sem especificações
		13	Sem especificações
		14	Sem especificações
		16	Sem especificações
		18	Sem especificações
		19	Sem especificações
		20	Sem especificações
		100	Sem especificações
		104	Sem especificações
		102	Gestação Anembrionária
		103	Gestação Anembrionária
	Segundo Trimestre (N= 3)	15	Sem especificações
		17	Sem especificações
		101	Sem especificações

Tabela 6. Caracterização dos neonatos de gestantes positivas para o ZIKV, notificadas ou não com suspeita de ZIKV às autoridades de saúde, que apresentaram malformação do RN, óbito neonatal e natimorto.

Suspeita de ZIKV	Desfecho Gestacional (N)	Características	Paciente	Perímetro Cefálico	Peso ao Nascer (g)	Apgar	Nascimento
Notificadas	Malformação Congênita (N= 7)	Microcefalia	22	31,0	2.300	9/10	Termo
			25	Sem informações	Sem informações	Sem informações	Termo
			23	31,5	Sem informações	Sem informações	Pré-termo
			24	26,5	2.550	9/10	Termo
		Microcefalia e ventriculomegalia bilateral e calcificações intracranianas	21	33,5	Sem informações	Sem informações	Termo
		Crânio com calcificações grosseiras	99	36,2	4.210	9/10	Termo
		Crânio com alterações; vasculopatia lenticulo-estriada; orelha direita e esquerda alteradas					
	Óbito Neonatal (N= 1)	Dedo da mão supranumerário	98	Sem informações	Sem informações	Sem informações	Termo
			27	Sem informações	Sem informações	Sem informações	Pré-termo
	Natimorto (N= 1)	Calcificações periventriculares, apresentando hipoplasia de vérnix, corpo caloso não identificado, membros inferiores hiperextendidos, pés tortos, micrognatia e microcefalia	28	Sem informações	1.135	0/0	Pré-termo
Sem Notificação	Malformação Congênita (N= 3)	Ausência, atresia e estenose congênita do anus, sem fístula	26	Sem informações	3.380	9/10	Termo
		Fenda palatina não especificada	105	Sem informações	3.625	9/10	Termo
		Defeito do septo atrioventricular total	106	Sem informações	3.455	6/9	Termo
	Óbito Neonatal (N= 3)	Displasia renal e tetralogia de Fallot com óbito após 6 minutos de vida	107	Sem informações	630	0/0	Pré-termo
			108	Sem informações	525	2/8	Pré-termo
		Pré-eclâmpsia grave e corioangioma placentário com óbito após nascimento	109	Sem informações	2250	4/7	Pré-termo
	Natimorto (N= 1)	Outras deformidades congênitas do pé e bolsa-rotas de 20 horas com cultura anal e vaginal negativo com óbito 6 horas após o parto					
		Necropsia do RN: estado tóxico-infeccioso e pneumonia intersticial bilateral (N=1)	29	Sem informações	3600	0/0	Termo

Analisando as pacientes notificadas com suspeita de ZIKV e confirmadas pelos testes diagnósticos, observou-se que do total de gestantes infectadas pelo ZIKV no primeiro

trimestre de gestação 38 (71,7%) apresentaram RN saudáveis, 10 (18,9%) evoluíram para aborto, 3 (5,6%) tiveram RN com malformação congênita (paciente 23, 24 e 25), 1 (1,9%) teve natimorto e 1 (1,9%) teve um óbito neonatal. As gestantes que foram infectadas no segundo trimestre de gestação tiveram em sua maioria RN saudável (76 [95%]), enquanto 3 (3,8%) apresentaram RN com malformação (paciente 21, 22 e 99) e 1 (1,2%) evoluiu para aborto. Aquelas que foram infectadas no terceiro trimestre de gestação, perfizeram 66 (98,5%) que tiveram desfecho positivo e 1 (1,5%) que apresentaram RN com malformação congênita (paciente 98) (Figura 10).

Figura 10. Proporção dos desfechos gestacionais de pacientes notificadas com suspeita de infecção pelo ZIKV pelo sistema de saúde de Ribeirão Preto e confirmadas pelos testes diagnósticos (RT-qPCR ou PRNT) de acordo com o período gestacional de infecção. A. Pacientes infectadas no primeiro trimestre de gestação de acordo com o desfecho gestacional. B. Pacientes infectadas no segundo trimestre de gestação de acordo com o desfecho gestacional. C. Pacientes infectadas no terceiro trimestre de gestação de acordo com o desfecho gestacional.

4.4. Caracterização Clínico-epidemiológico das Gestantes ZIKV Negativas

Das 312 pacientes analisadas, 60 foram negativas para infecção por ZIKV tanto por RT-qPCR quanto por PRNT. Os desfechos positivos ocorreram em 45 gestantes com mediana de idade de 26 anos ($\pm 6,8$) e os desfechos negativos ocorreram em 15 gestantes com mediana de idade de 26 anos ($\pm 5,0$).

Os desfechos negativos foram caracterizados com 2 RNs com malformações congênitas, 12 abortos e 1 natimorto. Todas as pacientes que apresentaram desfecho negativo não apresentaram alterações nos exames de pré-natal.

Os recém-nascidos que exibiram malformações nasceram a termo, sendo um deles diagnosticado com comunicação interventricular e o outro com malformações congênitas específicas do coração. Com relação aos abortos, 6 ocorreram no primeiro trimestre de

gestação, 3 no segundo trimestre de gestação e 3 não se tem maiores informações de idade gestacional durante o ocorrido. Quanto ao natimorto, não há nos sistemas de informação, dados relativos à idade gestacional e etiologias associadas.

4.5. Análise de Citocinas das Amostras Seleccionadas

A fim de avaliar o perfil imunológico das gestantes infectadas ou não pelo ZIKV com diferentes desfechos gestacionais, a dosagem das citocinas foi realizada em amostras de soro de 4 grupos das gestantes seleccionadas: amostra de fase aguda de infecção pelo ZIKV de 29 pacientes infectadas que tiveram desfecho negativo (6 apresentaram RN com malformação congênita [pacientes 22, 25, 23, 24, 21 e 26], 20 evoluíram para aborto [pacientes 7, 6, 10, 8, 9, 12, 11, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 1, 4, 5, 15, 17, 2 e 3], 1 exibiu um óbito neonatal [paciente 27] e 2 tiveram natimorto [pacientes 28 e 29]), amostra de fase aguda de infecção pelo ZIKV de 30 pacientes infectadas que apresentaram desfecho positivo, amostra de 8 pacientes que foram negativas para o ZIKV e tiveram desfecho negativo (2 exibiram RN com malformação congênita e 6 evoluíram para aborto) e amostra de 29 gestantes negativas para o ZIKV com desfecho positivo (Tabela 7).

Das citocinas quantificadas, IL-22, IL-4, IL-2, IL-17F e GM-CSF exibiram valores abaixo do limite de detecção e foram excluídas das análises. Analisando os 4 grupos, não houve diferença na concentração de citocinas dos pacientes com desfechos negativos infectadas ou não pelo ZIKV. Entretanto, observou-se concentrações maiores das citocinas IL-13 ($p < 0.0001$) e IL-17A ($p = 0.0006$) no grupo de gestantes negativas para o ZIKV com desfecho positivo em relação as pacientes positivas para o ZIKV tanto com desfecho positivo quanto negativo. Além disso, as pacientes negativas para o ZIKV e com desfecho positivo tiveram maiores níveis de IL-5 ($p = 0.0012$) em relação as gestantes negativas para o ZIKV com desfecho negativo e as pacientes positivas para o ZIKV tanto com desfecho positivo quanto negativo (Tabela 7 e Figura 11).

Ao examinar as amostras de fase aguda de infecção das pacientes positivas para o ZIKV, não houve diferenças na concentração de citocinas de pacientes com diferentes desfechos gestacionais (Tabela 8). As amostras da fase de convalescença da infecção das pacientes positivas para ZIKV também foram analisadas. Das 29 pacientes positivas para ZIKV com desfecho negativo, apenas 5 apresentaram de 2 a 3 amostras coletadas em meses distintos, a amostra de convalescença seleccionada foi aquela coletada posteriormente à amostra que exibiu positividade dentro de no mínimo 30 dias. Quanto ao período entre a

amostra coletada na fase aguda e a amostra coletada na fase de convalescença, 3 gestantes tiveram um período de 1 mês (paciente 21, 23 e 26), 1 com tempo de 2 meses (paciente 4) e 1 com 4 meses (paciente 24). Quanto as 30 pacientes positivas para ZIKV com desfecho positivo selecionadas, 7 coletaram de 2 a 9 amostras de soro. Quanto ao tempo transcorrido entre a coleta da amostra que apresentou positividade (amostra de fase aguda) para a próxima coleta realizada (amostra de fase de convalescença) 5 pacientes (paciente 36, 40, 46, 54 e 59) tiveram tempo de 1 mês, 1 com tempo de 2 meses (paciente 44) e 1 com 4 meses (paciente 32).

Ao investigar a concentração de citocinas da fase de convalescença de infecção de pacientes positivas para ZIKV com diferentes desfechos gestacionais, constatou-se que apenas a citocina pró-inflamatória TNF- α apresentou diferença estatística ($p= 0.0152$) com maiores níveis no soro de gestantes com desfecho negativo (Tabela 9 e Figura 12).

Avaliando a cinética das citocinas das 12 pacientes selecionadas, que possuíam amostra de soro coletada tanto na fase aguda de infecção quanto na fase de convalescença com distintos desfechos gestacionais não foi observado diferença relevante nos níveis de citocinas na fase aguda e de convalescença (Figura 13).

Tabela 7. Concentrações das citocinas detectadas no soro de pacientes que foram positivos ou negativos para infecção por ZIKV por RT-qPCR em tempo real e que tiveram recém-nascidos saudáveis (desfecho positivo) ou apresentaram aborto, natimorto, óbito neonatal e recém-nascidos com malformações congênitas (desfecho negativo) em Ribeirão Preto- SP, Brasil, fevereiro de 2016 à março de 2017. É apresentado também o valor de p para o teste não-paramétrico de Kruskal- Wallis.

Citocinas	ZIKV Negativo		ZIKV Positivo		Valor de p
	Desfecho Positivo	Desfecho Negativo	Desfecho Positivo	Desfecho Negativo	
	(N = 29)	(N = 8)	(N = 30)	(N = 29)	
	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	
IFN- γ	6.91 (10.01)	1.36 (1.25)	4.44 (5.02)	5.70 (10.73)	0.0361*
IL-10	0.03 (0.06)	1.03 (2.91)	2.10 (3.88)	0.71 (1.42)	0.0665
IL-13	255.53 (387.63)	14.17 (21.55)	57.66 (181.26)	131.91 (343.96)	<0.0001
IL-17A	2.94 (1.40)	1.68 (1.61)	1.68 (1.39)	1.67 (1.68)	0.0006
IL-5	8.06 (13.31)	0.99 (0.36)	1.80 (3.44)	5.27 (11.80)	0.0012
IL-6	7.44 (28.62)	0.16 (0.21)	2.13 (4.33)	3.80 (9.22)	0.2846
TNF- α	12.02 (14.16)	9.29 (6.85)	19.10 (37.43)	16.28 (11.33)	0.1495

*Apesar do valor de p ser significativo, quando realizado as comparações múltiplas e a correção de Dunn, não é observado significância para as subcomparações.

Figura 11. Gráfico da concentração das citocinas IL-13 (A), IL-5 (B) e IL-17A (C) de gestantes infectadas ou não pelo ZIKV que exibiram desfecho positivo (RN saudável) ou desfecho negativo (RN com malformação congênita, aborto, natimorto ou óbito neonatal). Foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal- Wallis, tendo o nível de significância indicado pelo número de asteriscos, ****<0,0001, **<0,01 e *<0,05.

Tabela 8. Concentrações das citocinas detectadas no soro de pacientes que foram positivos para infecção por ZIKV por RT-qPCR em tempo real na fase aguda da doença e que tiveram recém-nascidos saudáveis (desfecho positivo) ou apresentaram aborto, natimorto, óbito neonatal e recém-nascidos com malformações congênitas (desfecho negativo) em Ribeirão Preto- SP, Brasil, fevereiro de 2016 à março de 2017. É apresentado também o valor de p para o teste t.

Citocinas	Desfecho Positivo (N = 30)	Desfecho Negativo (N = 29)	Valor de p
	Média (DP)	Média (DP)	
IFN- γ	4.44 (5.02)	5.70 (10.73)	0,5702
IL-10	2.10 (3.88)	0.71 (1.42)	0,0746
IL-13	57.66 (181.26)	131.91 (343.96)	0,3078
IL-17A	1.68 (1.39)	1.67 (1.68)	0,9814
IL-5	1.80 (3.44)	5.27 (11.80)	0,1372
IL-6	2.13 (4.33)	3.80 (9.22)	0,3812
TNF- α	19.10 (37.43)	16.28 (11.33)	0,6959

Tabela 9. Concentrações das citocinas detectadas no soro de pacientes que foram positivos para infecção por ZIKV por RT-qPCR em tempo real na fase de convalescença da doença e que tiveram recém-nascidos saudáveis (desfecho positivo) ou apresentaram aborto, natimorto, óbito neonatal e recém-nascidos com malformações congênitas (desfecho negativo) em Ribeirão Preto- SP, Brasil, fevereiro de 2016 à março de 2017. É apresentado também o valor de p para o teste t.

Citocinas*	Desfecho Positivo (N = 7)	Desfecho Negativo (N = 5)	Valor de p
	Média (DP)	Média (DP)	
IFN- γ	2.34 (3.72)	1.54 (2.75)	0.6964
IL-13	9.31 (19.46)	7.92 (17.71)	0.9021
IL-17A	1.67 (1.77)	1.36 (1.60)	0.7618
IL-5	0.87 (0.47)	5.33 (6.90)	0.1132
IL-6	0.52 (0.69)	0.17 (0.18)	0.2985
TNF- α	4.02 (2.76)	9.50 (3.77)	0.0152

* A citocina IL-10 não foi detectada no soro de nenhum dos pacientes na fase de convalescença.

Figura 12. Gráfico da concentração da citocina TNF- α de gestantes na fase de convalescença de infecção pelo ZIKV que exibiram desfecho positivo (RN saudável) ou desfecho negativo (RN com malformação congênita, aborto, natimorto ou óbito neonatal). Foi utilizado o teste t, tendo o nível de significância indicado pelo asterisco $* < 0,05$.

Figura 13. Cinética das citocinas IL-5, IL-6, IL-17A, TNF- α e IFN- γ na fase aguda e de convalescência de infecção do ZIKV de gestantes com desfecho gestacional positivo (A,B,C,D e E) e com desfecho gestacional negativo (F,G,H,I e J).

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A chegada do ZIKV no Brasil veio acompanhado de um aumento do número de casos de microcefalia e outras desordens cerebrais em bebês de mulheres infectadas pelo vírus. A notificação compulsória de suspeita de infecção pelo ZIKV foi fundamental na análise mais apurada do cenário do surto em cada região do Brasil, permitindo averiguar o acometimento em gestantes.

Neste estudo, observou-se que 57,8% das gestantes sem notificação de suspeita de infecção apresentou positividade para o ZIKV, sendo que 42,3% das pacientes positivas exibiram desfecho gestacional negativo. Não se sabe porém, se essas subnotificações se referem a pacientes que não apresentaram sintomas ou se não foram devidamente captadas pelo sistema de saúde. De qualquer forma, estudos apontam que 80% da população infectada pelo ZIKV são assintomáticos (CALVET; SANTOS; SEQUEIRA, 2016), sendo demonstrado por alguns trabalhos que grávidas com ausência de sintomas durante a gestação exibem bebês com Síndrome Congênita pelo Zika vírus (CZS) com características semelhantes à bebês de gestantes sintomáticas (MENESES *et al.*, 2017; PAIXAO *et al.*, 2018; VIANNA *et al.*, 2020).

Tendo em vista as complicações em fetos infectados pelo ZIKV, tanto de gestantes sintomáticas quanto assintomáticas, é necessário que a vigilância e acompanhamento das grávidas seja constante em todo período pré-natal, a fim de identificar e monitorar possíveis complicações. Coyne e Lazear (2016) sugerem que o ZIKV deveria ser um patógeno considerado nos TORCH, como a Rubéola, *Toxoplasma gondii*, outros, Citomegalovírus e Herpes simples, que são capazes de acessar o compartimento fetal causando complicações no feto.

O neurotropismo do ZIKV em fetos, inicialmente observado pelo crescente número de casos de microcefalia, evidencia as possibilidades de complicações fetais da infecção na gestação. No entanto, neste estudo observou-se que nem todas as pacientes positivas para o ZIKV apresentaram desfecho negativo, inclusive mais da metade das gestantes apresentaram desfecho gestacional positivo. Esse resultado corrobora com a literatura, que demonstrou que apenas 5-13% da população de gestantes infectadas pelo ZIKV apresentaram complicações fetais (WALKER *et al.*, 2019), não se sabendo exatamente o motivo do vírus não acometer todos os fetos de mulheres infectadas durante a gestação.

Apesar de estudos mostrarem que a prematuridade e o baixo peso neonatal tem maior incidência em gestantes com idade superior a 35 anos, o acometimento fetal de gestantes infectadas pelo ZIKV não ocorrem com frequência nessa faixa etária (ALVES *et al.*, 2017;

GRAVENA *et al.*, 2013). Neste estudo, a mediana de idade das gestantes positivas que apresentaram desfecho negativo foi de 29,5 ($\pm$ 6,8) e as que apresentaram desfecho positivo foi de 26 ($\pm$ 6,3), corroborando com a literatura (BRASIL *et al.*, 2016).

Apesar da infecção pelo ZIKV estar intimamente relacionada as desordens cerebrais de recém-nascidos, neste estudo as pacientes positivas com desfecho negativo apresentaram em maior proporção a evolução para aborto do que malformações do RN, natimorto e óbitos neonatais. A maioria dos casos de aborto ocorreram ainda nas primeiras semanas de gestação, assim como a infecção pelo ZIKV (segundo datas de início de sintomas de gestantes notificadas), sendo também observado casos de inviabilização gestacional no segundo trimestre. Na literatura existem poucos casos descritos de gestantes infectadas pelo ZIKV que evoluíram para o aborto, com infecção e perda fetal ocorrendo nas primeiras semanas de gestação (EIJK *et al.*, 2016; GONCÉ *et al.*, 2018). Estudo realizado no Brasil em 2016 mostrou que de setembro a dezembro do mesmo ano, houve uma diminuição de 15% na taxa de nascidos vivos em relação ao ano anterior, período este concomitante ao surto de ZIKV, sendo proposto que a infecção pelo ZIKV teria sido a causa dessa diminuição (COELHO *et al.*, 2017). Outro trabalho realizado com primatas não humanos demonstrou que 26% dos infectados pelo ZIKV nas primeiras semanas de gestação, apresentaram perda fetal (DUDLEY *et al.*, 2019).

Notou-se neste estudo que 2 mulheres que evoluíram para aborto apresentaram perda fetal no primeiro trimestre constituindo gestação de ordem anembrionária, neste caso o óvulo foi fecundado e implantado no útero gravídico, porém não desenvolveu um embrião. Essa condição é responsável por 50% dos casos de aborto espontâneo sendo amplamente caracterizada como consequência de alterações genéticas, não tendo casos descritos provenientes de infecções (WANG *et al.*, 2019).

Em um dos abortos, ocorrido no segundo trimestre gestacional, foi detectado um feto com linfangioma, uma malformação do vaso linfático que tem maior ocorrência na região do pescoço, axila e tórax, passível de ser detectado pelo ultrassom ou ressonância magnética (ARISOY *et al.*, 2015). Frequentemente os linfangiomas fetais são associados a anormalidades cromossômicas, no entanto podem também estar associados a outras anormalidades como a hidropisia fetal e o polidrâmnio (ANTUNES *et al.*, 2009; Farnaghi; Kothari, 2013). Não há na literatura casos de pacientes infectadas pelo ZIKV com fetos exibindo linfangioma, no entanto, há descrito casos em que fetos apresentam os fatores relacionados polidrâmnio e hidropisia fetal, esse excesso de líquido amniótico na cavidade

amniótica e o acúmulo anormal de líquido em regiões do corpo fetal está relacionado ao aumento da mortalidade perinatal (CHAN *et al.*, 2016; SARNO *et al.*, 2016).

É estimado que 50-70% das gestações evoluem para aborto antes mesmo das mulheres saberem que estão grávidas, os fatores predisponentes para a perda fetal são idade avançada, histórico de aborto espontâneo, tabagismo, uso de álcool e drogas, doenças crônicas mal controladas e infecções, além disso, podem ter etiologia genética e imunológica, no entanto, frequentemente a causa dos abortos são desconhecidas, principalmente quando ocorrem nas primeiras semanas gestacionais (MAGNUS *et al.*, 2019; PINAR *et al.*, 2018). Logo, devido ao fato do aborto espontâneo ser comumente observado, se torna difícil a associação com a infecção pelo ZIKV na gestação, somado à isso tem-se o fato do difícil diagnóstico pelo curto período virêmico e pela maior apresentação dos casos sem sintomas. Sendo assim, a perda fetal em pacientes infectadas pelo ZIKV deve ser um desfecho gestacional comum porém de difícil reconhecimento, sendo demonstrado por este estudo um acometimento maior que o estimado.

Quanto as malformações congênitas observadas em pacientes infectadas pelo ZIKV, observou-se microcefalia, ventriculomegalia bilateral e calcificações intracranianas. Os RNs sem diminuição do perímetro cefálico apresentaram calcificações intracranianas, orelhas direita e esquerda alteradas, vasculopatia lentículo-estriada. Esses resultados corroboram com a literatura (BRITT, 2018). Outras malformações como fenda palatina não especificada, defeito do septo atrioventricular total, ausência, atresia e estenose congênita do ânus sem fístula e dedo da mão supranumerário também foram notados neste estudo.

Apesar da fenda palatina ser um sinal incomum em fetos infectados pelo ZIKV, já foi descrito anteriormente em bebês de mães com provável infecção pelo ZIKV na gestação, acompanhado de anormalidades cerebrais (SILVA *et al.*, 2016). Pouco se sabe das alterações faciais de fetos acometidos pelo ZIKV, sugere-se que podem acontecer pelo fato do desenvolvimento da face e do cérebro estarem integrados; um estudo realizado com cultura celular mostrou que o ZIKV é capaz de infectar células da crista neural, podendo afetar o cérebro e a face (BAYLESS *et al.*, 2016).

Defeitos cardiovasculares já foram descritos em bebês expostos ao ZIKV durante a gestação, mostrando que o acometimento cardíaco também pode ocorrer na ausência de acometimento aparente do Sistema Nervoso Central (OROFINO *et al.*, 2018; SANTANA *et al.*, 2019). Estudo realizado com modelo animal de primatas não humanos revelou que cardiomiopatias podem ocorrer em fetos expostos ao ZIKV no primeiro trimestre de gestação (STEINBACH *et al.*, 2020).

As malformações anorretais e a polidactilia não foram anteriormente observados em neonatos provenientes de mães infectadas pelo ZIKV. No entanto, as malformações anorretais são comuns em cirurgias pediátricas, apresentando etiologia multifatorial e estando frequentemente associadas a outras malformações como vertebrais, cardíacas e renais (OH *et al.*, 2020). Já polidactilia apresenta incidência de 1/500 nos pés e 1/1000 nas mãos, podendo ser apresentado isoladamente ou em síndromes genéticas, além disso, o histórico familiar de dedo supranumerário corresponde um fator de 30% de ocorrência (PASCOAL *et al.*, 2018).

Além das malformações observadas em nascidos vivos, algumas anomalias também ocorreram em neonatos que vieram a óbito pouco tempo após o nascimento. Dentre eles, um RN com microcefalia associada a artrogripose, condição caracterizada pela contratura das articulações. A artrogripose já foi descrita como associada a casos de fetos infectados pelo ZIKV, piorando o prognóstico neonatal (ALVINO; MELLO; OLIVEIRA, 2016). Outras malformações ocorridas isoladamente ainda não descritas anteriormente em fetos expostos ao ZIKV, como deformidades congênitas do pé, displasia renal e tetralogia de Fallot foram detectados em neonatos que evoluíram para óbito, necessitando de maior investigação quanto a capacidade destes acometimentos pelo ZIKV.

Dentre os bebês que já nasceram mortos, foi identificado um natimorto com malformações como hipoplasia de vértex, corpo caloso não identificado, membros inferiores hiperextendidos, pés tortos, micrognatia e microcefalia, características pertencentes a CZS, também observados em neonatos na literatura (AZEVEDO *et al.*, 2018; BRASIL, 2017; CAMPO *et al.*, 2017). O outro natimorto constatou-se estado tóxico- infeccioso e pneumonia intersticial bilateral. A pneumonia fetal não foi observada anteriormente em fetos com ZIKV, no entanto este achado está associado a infecções como citomegalovírus na gestação (COCLITE; NATALE; NIGRO, 2013).

Foi observado também em neonatos que apresentaram alterações neurológicas, a prematuridade e o baixo peso ao nascer, tanto nos nascidos vivos quanto nos nascidos mortos e os óbitos neonatais. Um estudo realizado na Bahia mostrou que a incidência de baixo peso ao nascer é maior em neonatos com CZS que aqueles que não foram acometidos (CARVALHO-SAUER *et al.*, 2019).

Inicialmente acreditava-se que o acometimento fetal estava intimamente ligado à infecção nos primeiros estágios da gestação, visto que o feto ainda não está completamente formado, garantindo a infecção viral nas células progenitoras neurais acarretando em desordens cerebrais. Neste estudo, analisando as pacientes notificadas, portanto que dispunham de data de início dos sintomas, observou-se que em todos os trimestres

gestacionais havia pelo menos um caso de acometimento fetal, ainda que em maior frequência naquelas infectadas nos primeiros meses de gestação, visto que o aborto foi o desfecho negativo mais observado. Os óbitos neonatais e os natimortos apenas ocorreram em mulheres infectadas no primeiro trimestre de gestação, mostrando que a infecção nas primeiras semanas apresentam pior prognóstico do feto. As microcefalias e malformações cerebrais ocorreram em maior proporção em neonatos de gestantes infectadas pelo ZIKV no primeiro trimestre gestacional, no entanto no segundo trimestre também é observado acometimento cerebral, sendo que a infecção no terceiro trimestre apenas foi associado à malformação de dedo supranumerário. Na literatura já se tem descritos casos de fetos expostos ao ZIKV no terceiro trimestre gestacional exibindo desordens neurais, mostrando que as anomalias podem ocorrer em todos os períodos gestacionais de infecção pelo ZIKV (SOUZA *et al.*, 2016).

Neste estudo, a quantidade de amostras coletadas podem estar, dentre outros parâmetros, associadas à continuidade das consultas de pré-natal na rede básica de saúde. As pacientes negativas para o ZIKV, sem notificação de suspeita de ZIKV e exibindo desfecho negativo, tiveram apenas 1 coleta de amostra, sendo sugestivo, descontinuidade do pré-natal podendo acarretar na própria consequência do desfecho negativo, uma vez que o pré-natal é fundamental no acompanhamento gestacional, na detecção e prevenção precoce de doenças. Porém, não se exclui a possibilidade de infecção pelo ZIKV, visto que tendo apenas uma amostra, a dificuldade de acessar a possibilidade de infecção é maior, considerando que a amostra pode não ter sido coletada no período virêmico, ou coletada em período inferior a produção de anticorpos neutralizantes.

Na infecção viral, a resposta imunológica inata é a primeira linha de defesa do corpo, com liberação de mediadores chamados de citocinas que modulam respostas celulares (MACHADO *et al.*, 2004). Comparando os níveis de citocinas no soro de gestantes infectadas ou não pelo ZIKV, verificou-se menores concentrações séricas das citocinas IL-13, IL-17A e IL-5 em mulheres infectadas pelo ZIKV que apresentaram tanto desfecho positivo quanto negativo em relação as pacientes negativas que exibiram desfecho positivo.

A citocina IL-13 está envolvida na polarização dos macrófagos para um perfil anti-inflamatório M2 enquanto as citocinas IFN- γ , GM-CSF e TNF- α , polarizam os macrófagos para um perfil pró-inflamatório M1 (JENA *et al.*, 2019). Os macrófagos tem papel fundamental na manutenção de uma gestação saudável, dando suporte a atividades de regulação do trofoblasto, desenvolvimento da placenta e implantação, sendo assim, a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos pode resultar em condições adversas da gravidez como restrição do crescimento fetal ou até mesmo perda fetal,

contudo não se sabe os mecanismos envolvidos nessa massiva ativação celular (NING; LIU; LASH, 2015).

Os resultados obtidos neste estudo corroboram com a literatura, mostrando que na gestação saudável os macrófagos são caracterizados pelo fenótipo imunossupressor com polarização para um perfil M2, dando suporte ao fato de que essas células tem papel na tolerância imunológica materno-fetal (TANG *et al.*, 2015). Além disso, as citocinas IL-13 e IL-5 atuam na indução da estimulação e da proliferação de linfócitos B (OPAL; DEPALO, 2000; KOIKE; TAKATSU, 1994). Apesar de não se ter observado diferença nos níveis dessas citocinas entre as pacientes positivas com diferentes desfechos gestacionais, o resultado observado na diminuição desses mediadores em pacientes infectadas, revelam que o ZIKV induz um estado mais pró-inflamatório com resposta imunológica de perfil Th1, além disso, há a possibilidade de um retardo da produção de anticorpos no combate viral, no entanto não há na literatura mecanismos de evasão do vírus Zika envolvendo a modulação dessas citocinas.

Neste trabalho, não foi observado aumento de citocinas pró-inflamatórias em pacientes infectados pelo ZIKV na fase aguda de infecção, contrário ao estudo realizado com amostra de plasma de pacientes adultos na fase aguda que mostraram que pacientes com ZIKV apresentaram maiores níveis de mediadores pró-inflamatórios como IFN- γ , IL-18, IL-6, TNF- α , IL-17A, IL-9, IL-22 e IL-2 em relação a pacientes adultos saudáveis (LUM *et al.*, 2018).

Por outro lado, menores níveis de IL-5 também foram observados em pacientes negativos para o ZIKV que exibiram desfecho negativo, demonstrando que essa citocina pode ser essencial na manutenção de uma gestação saudável, entretanto, não há na literatura descrito o envolvimento desta citocina na gestação relacionado ao comprometimento fetal ou inviabilização gestacional.

Na gestação a citocina IL-17A é produzida principalmente pelos linfócitos T CD4⁺ na circulação materna e decídua, enquanto que na placenta este mediador é produzido pelos macrófagos, sendo sugerido por estudos anteriores que na gestação saudável essa citocina inflamatória garante proteção contra microrganismos extracelulares e tem participação no desenvolvimento placentário (PAVLOV *et al.*, 2018). Apesar de alguns estudos mostrarem aumento desta citocina em pacientes adultos com ZIKV, um trabalho realizado com gestantes saudáveis comparando níveis de citocinas de mulheres que tiveram bebês normais e pacientes que evoluíram para aborto, observou menores concentrações de IL-17A em amostra de plasma de gestantes que obtiveram defecho negativo, demonstrando que esta citocina é fundamental na manutenção da gravidez (KAMINSKI *et al.*, 2018). Neste estudo, não

observou-se diferença da concentração desta citocina em pacientes com diferentes desfechos gestacionais, todavia notou-se níveis mais baixos em pacientes com ZIKV em relação a pacientes saudáveis com neonatos sem alterações. Não se tem na literatura relatos de modulação viral do ZIKV desta citocina, no entanto estes resultados sugerem que tendo o vírus um tropismo por células placentárias, a diminuição desta citocina pode estar associada a um menor combate viral, facilitando o acesso ao compartimento fetal.

Não houve diferença entre os níveis de citocinas em amostras de fase aguda de gestantes infectadas pelo ZIKV que exibiram bebês saudáveis daquelas que tiveram desfecho negativo. Porém, analisando amostras da fase de convalescença, foi observado que pacientes com desfecho negativo apresentaram maiores concentrações séricas da citocina TNF- α em relação as que tiveram desfecho positivo. Resultado diferente foi observado em um estudo utilizando soro de gestantes infectadas pelo ZIKV, em que aquelas que tiveram desenvolvimento anormal de fetos exibiram maiores concentrações desta citocina na fase aguda da doença em relação as mulheres que tiveram bebês saudáveis (KAM *et al.*, 2017).

O TNF- α atua de maneira distinta em diversos tipos celulares, já foi descrito que esse mediador imunológico pode ser prejudicial na manutenção da gravidez, sendo produzido principalmente por macrófagos, podendo implicar no dano da placenta, por prejudicar no crescimento do trofoblasto e o desenvolvimento do embrião levando a implicações gestacionais e até mesmo perda fetal (HILL; POLGAR; ANDERSON, 1995). Ademais, já foi descrito que o TNF- α atua também reduzindo a viabilidade neuronal em cultura celular (WOOD *et al.*, 2015). Logo, os resultados encontrados sugerem que a expressão prolongada de TNF- α induzida pelo ZIKV, leva ao comprometimento do trofoblasto, permitindo o acesso ao compartimento fetal e levando ao acometimento neural do feto.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho caracterizou as gestantes com acompanhamento de pré-natal na rede básica de saúde de Ribeirão Preto, demonstrando que pacientes sem notificação de suspeita de ZIKV apresentaram positividade nos testes diagnósticos, exibindo desfecho negativo da mesma forma que as que foram notificadas. Por outro lado, as gestantes infectadas pelo ZIKV que tiveram desfecho negativo apresentaram em maior proporção aborto, seguido de malformações fetais, óbitos neonatais e em menor número, natimortos. O acometimento fetal foi observado em gestantes que apresentaram infecção em qualquer período gestacional, porém, os piores prognósticos gestacionais foram observados naquelas mulheres que apresentaram infecção no primeiro trimestre de gestação.

A quantificação de citocinas das gestantes infectadas pelo ZIKV revelou menores níveis de IL-13, IL-5 e IL-17A, em relação as pacientes negativas que tiveram neonatos sem alterações. Apesar de não ter sido observado diferença na concentração sérica de citocinas de pacientes com ZIKV na fase aguda da doença, com diferentes desfechos gestacionais, notou-se na fase de convalescença aumento dos níveis de TNF- α em amostras de pacientes infectadas com desfecho negativo em relação as infectadas que apresentaram desfecho positivo. Os resultados obtidos nesse estudo, sugerem que o ZIKV induz um estado inflamatório, que poderia ser capaz de comprometer o desenvolvimento placentário, fazendo com que o vírus tenha acesso ao compartimento fetal e acometa as células neurais do feto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, N.C.C.; FEITOSA, K.M.A.; MENDES, M.E.S.; CAMINHA, M.F.C. Complicações na gestação em mulheres com idade maior ou igual a 35 anos. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v. 38, n. 4, p. 1–8, 2017.

ALVINO, A.C.M.I.; MELLO, L.R.M.; OLIVEIRA, J.A.M.M. Associação de artrogripose em neonatos com microcefalia pelo Zika vírus – série de casos. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.**, v. 16, p. 89–94, 2016.

ANTUNES, G.; JUNIOR, H.W.; DALTRO, P.A.; et al. Avaliação de linfangiomas cervicais fetais por ressonância magnética e correlação com achados ultrassonográficos. **Radiologia Brasileira**, v. 42, n. 5, p. 299–302, 2009.

ARAGÃO, M.F.V.V.; PETRIBU, N.C.L.; LIDEN, V.V.; VALENCA, M.M.; BRITO, C.A.A.; PARIZEL, P.M. Updated Imaging Findings in Congenital Zika Syndrome. A Disease Story That is Still Being Written. **Topics in Magnetic Resonance Imaging**, v. 28, n. 1, 2019.

ARISOY, R.; ERDOGDU, E.; KUMRU, P.; et al. Prenatal diagnosis and outcome of lymphangiomas and its relationship with fetal chromosomal abnormalities. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, 2015.

AZEVEDO, R.S.S.; ARAUJO, M.T.; OLIVEIRA, C.S.; et al. Zika Virus Epidemic in Brazil. II. Post-Mortem Analyses of Neonates with Microcephaly, Stillbirths, and Miscarriage. **Journal of Clinical Medicine**, v. 7, n. 12, 2018.

BAYER, A.; LENNEMANN, N.J.; OUYANG, Y.; et al. Type III Interferons Produced by Human Placental Trophoblasts Confer Protection Against Zika Virus Infection. **Cell Host Microbe**, v. 19, n. 5, p. 705–712, 2017.

BAYLESS, N. L.; GREENBERG, R. S.; SWIGUT, T.; et al. Zika Virus Infection Induces Cranial Neural Crest Cells to Produce Cytokines at Levels Detrimental for Brief Report Zika Virus Infection Induces. **Cell Host and Microbe**, v. 20, n. 4, p. 423–428, 2016.

BERTHET, N.; NAKOUNÉ, E.; KAMGANG, B.; et al. Molecular Characterization of Three Zika Flaviviruses Obtained from Sylvatic Mosquitoes in the Central African Republic. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 14, n. 12, p. 862–865, 2014.

BOWEN, J.R.; QUICKE, K.M.; MADDUR, M.S.; et al. Zika Virus Antagonizes Type I Interferon Responses during Infection of Human Dendritic Cells. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 2, p. 1–30, 2017.

BRASIL, P.; MOREIRA, M. E.; NOGUEIRA, R. M. R.; et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. **N Engl J Med**, v. 375, n. 24, p. 2321–2334, 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016. v. 48, n. 2, 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika: situação epidemiológica, ações desenvolvidas e desafios, 2015 a 2019. v. 50, 1-31, 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Zika Vírus: perfil epidemiológico em mulheres, 2016. V. 47, n. 37; 2016

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Zika Vírus: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. 2016. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/zika-virus>. Último acesso em 22/04/2020.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vírus Zika no Brasil: a resposta do SUS, 2017.

BRITT, W.J. Seminars in Perinatology Adverse outcomes of pregnancy-associated Zika virus infection. **Seminars in Perinatology**, v. 61959, p. 1–13, 2018.

CALVET, G.; AGUIAR, R.S.; MELO, A.S.O.; et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 653–660, 2016.

CALVET G.A.; SANTOS F.B.; SEQUEIRA P.C. Zika virus infection: epidemiology, clinical manifestations and diagnosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 29, n. 5, p. 459-466, 2016.

CAMINADE, C.; TURNER, J.; METELMANN, S.; et al. Global risk model for vector-borne transmission of Zika virus reveals the role of El Niño 2015. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 1, p. 119–124, 2017.

CAMPO, M.; FEITOSA, I.M.L.; RIBEIRO, E.M.; et al. The phenotypic spectrum of congenital Zika syndrome. **American Journal of Medical Genetics**, v. 173, n. 4, p. 841–857, 2017.

CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Disease**, v. 21, n. 10, p. 1885–1886, 2015.

CARVALHO-SAUER, R.; NASCIMENTO, C.; BARRETO, F.R.; GLORIA, M. International Journal of Infectious Diseases Congenital Zika Syndrome : Prevalence of low birth weight and associated factors. Bahia, 2015 – 2017. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 82, p. 44–50, 2019.

CASTRO, J.D.V.; PEREIRA, L.P.; DIAS, D.A.; et al. Presumed Zika virus-related congenital brain malformations: the spectrum of CT and MRI findings in fetuses and newborns. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 75, n. 10, p. 703–710, 2017.

CHAN, J.F.W. *et al.* Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease. **Journal of Infection**, v. 72, n. 5, p. 507–524, 2016.

CHARREL, R.N.; LEPARC-GOFFART, I.; PAS, S.; LAMBALLERIE, X. Background review for diagnostic test development for Zika virus infection. **Bulletin of the World Health Organization**, p. 574–584, 2016.

CHEN, J.; LIANG, Y.; YI, P.; HAWKINS, H.K.; ROSSI, S.L.; SOONG, L.; CAI, J.; MENON, R.; SUN, J. Outcomes of congenital Zika disease depend on timing of infection and maternal-fetal interferon action. **Cell Reports**, v. 21, n. 6, p. 1588-1599, 2017.

COCLITE, E.; NATALE, C.; NIGRO, G. Congenital and perinatal cytomegalovirus lung infection. **The Journal of Maternal- Fetal and Neonatal Medicine**, v. 26, n. 17, p. 1671–1675, 2013.

COELHO, F.C; ARMSTRONG, M.; SARACENI, V.; LEMOS, C. Can Zika Account for the Missing Babies? **Frontiers from Public Health**, v. 5, 2017.

COLT, S.; GARCIA-CASAL, M.N.; PEÑA-ROSAS, J.P.; et al. Transmission of Zika virus through breast milk and other breastfeeding-related bodily-fluids: A systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 4, 2017.

COSTA-DA-SILVA, A.L.; IOSHINO, R.S.; DE ARAÚJO, H.R.C.; et al. Laboratory strains of *Aedes aegypti* are competent to Brazilian Zika virus. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1–13, 2017.

COYNE, C.B.; LAZEAR, H.M. Zika virus — reigniting the TORCH. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 11, p. 707-715, 2016.

CUNHA, M.S.; ALVES, L.; ROCCO, M.; et al. First Complete Genome Sequence of Zika Virus (Flaviviridae , Flavivirus) from an Autochthonous Transmission in Brazil. **Genome Announcements**, v. 4, n. 2, p. 2015–2016, 2016.

DEL CAMPO, M.; FEITOSA, I.M.L.; RIBEIRO, E.M.; et al. The phenotypic spectrum of congenital Zika syndrome. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 173, n. 4, p. 841–857, 2017.

DE NORONHA, L.; ZANLUCA, C.; AZEVEDO, M.L.V.; LUZ, K.G.; DOS SANTOS, C.N.D. Zika virus damages the human placental barrier and presents marked fetal neurotropism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 5, p. 287–293, 2016.

DIALLO, D.; SALL, A.A.; DIAGNE, C.T.; et al. Zika virus emergence in mosquitoes in Southeastern Senegal, 2011. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. 4–11, 2014.

DICK, G.W.A. *et al.* Epidemiological Notes on Some Viruses Isolated in Uganda. **Public**

Health, v. 41, n. 1, p. 119, 1952.

DICK, G.W.A.; KITCHEN, S.F.; HADDOW, A.J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.

DUDLEY, D.M.; ROMPAY, K.V.; COFFEY, L.L.; et al. Miscarriage and Stillbirth Following Maternal Zika Virus Infection in Nonhuman Primates. **Nature Medicine**, v. 24, n. 8, p. 1104-1107, 2019.

DUFFY, M.; CHEN, T.; HANCOCK, T.; et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **N Engl J Med**, v. 360, p. 2536–2543, 2009.

EIJK, A.A.; GENDEREN, P.J.; VERDIJK, R.M.; et al. Miscarriage Associated with Zika Virus Infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 10, p. 1002-1004, 2016.

FARNAGHI, S.; KOTHARI, A. The value of early recognition of fetal lymphangioma. **Australasian Journal of Ultrasound in Medicine**. v. 16, n. 3, p. 147-152, 2015.

FARIA N.R. *et al.* Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**, v. 352, n. 6283, p. 345–349, 2016.

FAIZAN, M.I.; ABDULLAH, M.; ALI, S.; et al. Zika Virus-Induced Microcephaly and Its Possible Molecular Mechanism. **Intervirology**, v. 59, p. 152–158, 2017.

FAYE, O.; FREIRE, C.C. M.; IAMARINO, A.; et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. 36, 2014.

FOY, B.D.; KOBYLINSKI, K.C.; FOY, J.L.C.; et al. Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 880–882, 2011.

GARCIA L.P.; DUARTE E. Evidências da vigilância epidemiológica para o avanço do conhecimento sobre a epidemia do vírus Zika. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 25, n. 4, p. 679-681, 2016.

GLASNER, A *et al.* Zika virus escapes NK cell detection by upregulating MHC class I molecules. **Journal of Virology**, v. 91, n. 22, 2017.

GONCÉ, A.; MARTÍNEZ, M.J.; MARBÁN-CASTRO, E.; SACO, A.; SOLER, A.; et al. Spontaneous Abortion Associated with Zika Virus Infection and Persistent Viremia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 5, p. 933-935, 2018.

GOURINAT, A.; CONNOR, O.O.; CALVEZ, E.; GOARANT, C. Detection of Zika Virus in Urine. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 84–86, 2015.

GRANT, A *et al.* Zika virus targets human STAT2 to inhibit type I interferon signaling. **Cell Host Microbe**, v. 19, n. 6, p. 882–890, 2017.

GRAVENA, A.A.F.; PAULA, M.G.; MARCON, S.S.; CARVALHO, M.D.B.; PELLOSO, S.M. Idade materna e fatores associados a resultados perinatais. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 26, n. 2, p. 130–135, 2013.

GUEDES, D.R.D.; PAIVA, M.H.S.; DONATO, M.M.A.; et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerging Microbes and Infections**, v. 6, n. 8, 2017.

HADDOW, A.D.; SCHUH, A.J.; YASUDA, C.Y.; et al. Genetic characterization of zika virus strains: Geographic expansion of the asian lineage. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, 2012.

HANCOCK, W. T.; MARFEL, M.; BEL, M. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 11, p. 1960, 2014.

HEYMANN, D.L.; HODGSON, A.; SALL, A.A.; et al. Zika virus and microcephaly: Why is this situation a PHEIC? **The Lancet**, v. 387, n. 10020, p. 719–721, 2016.

HILL, J. A.; POLGAR, K.; ANDERSON, D. J. T-Helper 1-Type Immunity to Trophoblast in Women With Recurrent Spontaneous Abortion. **Journal of the American Medical Association**, v. 273, n. 4, 1995.

HUITS, R.; SMET, B.; ARIËN, K.K.; ESBROECK, M.V.; CNOPS, L. Zika virus in semen : a prospective cohort study of symptomatic travellers returning to Belgium. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 95, n. September, p. 802–809, 2017.

JENA, M.K.; NAYAK, N.; CHEN, K.; NAYAK, N.R. Role of Macrophages in Pregnancy and Related Complications. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 67, n. 5, p. 295-309, 2019.

KAM, Y.; LEITE, A.; LUM, F.; et al. Specific Biomarkers Associated With Neurological Complications and Congenital Central Nervous System Abnormalities From Zika Virus – Infected Patients in Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, p. 172-181, 2017.

KAMINSKI, V.L.; ELLWANGER, J.H.; MATTE, M.C.C.; SAVARIS, M.C.; VIANNA, P.; CHIES, J.A.B. IL-17 blood levels increase in healthy pregnancy but not in spontaneous abortion. **Molecular Biology Reports**, v. 45, n. 5, p. 1565-1568, 2018.

KING, N.J.C.; TEIXEIRA, M.M.; MAHALINGAM, S. Zika Virus: Mechanisms of Infection During Pregnancy. **Cell Press**, v. 25, n. 9, 2017.

KUMAR, A.; HOU, S.; AIRO, A.M.; et al. Zika virus inhibits type - I interferon production and downstream signaling. **EMBO reports**, v. 17, n. 12, p. 1766–1775, 2016.

LANCIOTTI, R.S.; KOSOY, O.L.; LAVEN, J.J.; et al. Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, 2008.

LAZEAR, H.M.; GOVERO, J.; SMITH, A.M.; et al. A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. **Cell Host Microbe**, v. 19, n. 5, p. 720–730, 2017.

LEE, A.J.; BHATTACHARYA, R.; SCHEUERMANN, R.H.; PICKETT, B.E. Identification

of diagnostic peptide regions that distinguish Zika virus from related mosquito-borne Flaviviruses. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, p. 1–18, 2017.

LESTEBERG, K.E.; FADER, D.S.; BECKHAM, J.D. Pregnancy alters innate immune responses to Zika virus infection in the genital tract. **BioRxiv**, 2019.

LOZIER, M.J.; ROSENBERG, E.S.; DOYLE, K.; et al. Prolonged Detection of Zika Virus Nucleic Acid Among Symptomatic Pregnant Women : A Cohort Study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 67, 2018.

LUM, F.; LYE, D.C.B.; TAN, J.J.L.; et al. Longitudinal Study of Cellular and Systemic Cytokine Signatures to Define the Dynamics of a Balanced Immune Environment During Disease Manifestation in Zika Virus – Infected Patients. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 218, p. 814-824, 2018.

MACHADO, P.R.L.; ARAÚJO, M.A.S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E.M. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6, 2004.

MACNAMARA, F. N. Zika virus: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 2, p. 139–145, 1954.

MAGNUS, M.C.; WILCOX, A.J.; MORKEN, N.; WEINBERG, C.R.; HÅBERG, S.E. Role of maternal age and pregnancy history in risk of miscarriage : prospective register based study. **British Medical Journal**, 2019.

MEANEY-DELMAN, D.; ODUYEBO, T.; POLEN, K.N.D.; et al. Prolonged Detection of Zika Virus RNA in Pregnant Women. **Obstetrics & Gynecology**, v. 128, n. 4, p. 724–730, 2016.

MELO, A.S.O.; AGUIAR, R.S.; AMORIM, M.M.R.; et al. Congenital Zika Virus Infection. **JAMA Neurology**, v. 73, n. 12, p. 1407, 2016.

MENESES, A.; ISHIGAMI, A.C.; MELLO, L.M.; et al. Lessons Learned at the Epicenter of Brazil's Congenital Zika Epidemic: Evidence From 87 Confirmed Cases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, n. 10, 2017.

MINER, J.J.; CAO, B.; GOVERO, J.; NOGUCHI, K.K.; MYSOREKAR, I.U.; DIAMOND, M.S. Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. **Cell**, v. 165, n. 5, p. 1081-1091, 2016.

MITTAL, R.; NGUYEN, D.; DEBS, L.H.; PATEL, A.P.; LIU, G. Zika Virus : An Emerging Global Health Threat. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, 2017.

MORAES, F.M.; ESPÓSITO, D.L.A.; KLEIN, T.M.; FONSECA, B.A.L. Searching for the best real-time RT-PCRs to detect Zika virus infections : the importance of comparing several protocols. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, p. 1–5, 2018.

MUSSO, D. Zika virus transmission from French Polynesia to Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1887–1889, 2015.

MUSSO, D.; NHAN, T.; ROBIN, E.; ROCHE, C. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia. **Euro Surveill**, v. 19, n. November 2013, p. 20761, 2014.

NAVECA, F.G.; PONTES, G.S.; CHANG, A.Y.; et al. Analysis of the immunological biomarker profile during acute Zika virus infection reveals the overexpression of CXCL10 , a chemokine linked to neuronal damage. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 6, p. 1–13, 2018.

NING, F.; LIU, H.; LASH, G.E. The Role of Decidual Macrophages During Normal and Pathological Pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 75, p. 298-309, 2016.

NOORBAKHS, F.; ABDOLMOHAMMADI, K.; FATAHI, Y. Zika Virus Infection , Basic and Clinical Aspects : A Review Article. **Iran J Public Health**, v. 48, n. 1, p. 20–31, 2019.

NOWAKOWSKI, T.J.; POLLEN, A.A.; LULLO, E.; SANDOVAL-ESPINOSA, C.; BERSHTEYN, M.; KRIEGSTEIN, A.R. Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Neural Stem Cells Brief Report Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Neural Stem Cells. **Cell Stem Cell**, v. 18, n. 5, p. 591–596, 2016.

OH, C.; YOUN, J.K.; HAN, J.; et al. Analysis of Associated Anomalies in Anorectal Malformation: Major and Minor Anomalies. **J Korean Med Sci**, v. 35, n. 14, 2020.

OLIVEIRA, I.; ALEJO-CANCHO, I.; GASCÓN, J.; et al. Persistence of Zika virus in semen 93 days after the onset of symptoms. **Enferm Infecc Microbiol Clin.**, v. 36, n. 1, p. 21–23, 2018.

OLSON, J. G.; KSIAZEK, T. G.; SUHANDIMAN, G.; TRIWIBOWO, V. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 3, p. 389–393, 1981.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Zika situation report. Zika virus, Microcephaly and Guillain-Barré syndrome. 2016. Disponível em <http://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/31-march-2016/en/>. Último acesso em 20.11.2017.

OPAL, S.M.; DEPALO, V.A. Anti-Inflammatory Cytokines. **American College of Chest Physicians**, v. 117, n. 4, p. 1162–1172, 2000.

OROFINO, D.H.G.; PASSOS, S.R.L.; OLIVEIRA, R.V.C.; et al. Cardiac findings in infants with in utero exposure to Zika virus- a cross sectional study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 3, 2018.

PAIXAO, E.S.; LEONG, W.; RODRIGUES, L.C. Asymptomatic Prenatal Zika Virus Infection and Congenital Zika Syndrome. **Open Forum Infectious Diseases**, v.5, n. 4, p. 1–5, 2018.

PASCOAL, D.; CARDOSO, P.S.; LING, T.P.; BALACÓ, I.; ALVES, C. Polidactilia das Mãos e Pés- Caso Clínico Raro. **Revista Portuguesa de Ortopedia e Traumatologia**, v. 26, n. 3, p. 245–252, 2018.

PAVLOV, O.; SELUTIN, A.; PAVLOVA, O.; SELKOV, S. Macrophages are a source of IL-17 in the human placenta. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 80, n. 4, 2018.

PERSONA, M.R. Estudo comparativo entre testes sorológicos para o diagnóstico específico da infecção pelo vírus zika. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo.

PÉREZ-PADILLA, J.; PAZ-BAILEY, G.; MEANEY-DELMAN, D.; et al. **Open J Obstet Gynecol.**, v. 9, n. 5, p. 698–706, 2019.

PIERSON, T.C.; DIAMOND, M.S. Review The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes. **Nature**, v. 560, 2018.

PINAR, M.H.; GIBBINS, K.; HE, M.; et al. Early Pregnancy Losses: Review of Nomenclature , Histopathology , and Possible Etiologies. **Fetal and Pediatric Pathology**, v. 37, n. 3, p. 191-209, 2018.

PYKE, A.T.; DALY, M.T.; CAMERON, J.N.; et al. Imported Zika Virus Infection from the Cook Islands into Australia , 2014. **PLoS Currents Outbreaks**, 2020.

QUICKE, K.M.; BOWEN, J.R.; JOHNSON, E.L.; et al. Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. **Cell Host Microbe**, v. 20, n. 1, p. 83–90, 2017.

RABE, I.B.; STAPLES, J.E.; VILLANUEVA, J.; HUMMEL, K.B.; JOHNSON, J.A. Interim Guidance for Interpretation of Zika Virus Antibody Test Results. **MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 21, p. 543–546, 2016.

RASMUSSEN, S.A.; JAMIESON, D.J.; HONEIN, M.A.; PETERSEN, L.R. Zika Virus and

Birth Defects- Reviewing the Evidence for Causality. **The New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 20, p. 1981-1987, 2016.

ROMBI, F.; BAYLISS, R.; TUPLIN, A.; YEOH, S. The journey of Zika to the developing brain. **Molecular Biology Reports**, , n. 0123456789, 2020.

SAIZ, J.C.; MARTÍN-ACEBES, M.A.; BUENO-MARÍ, R.; et al. Zika Virus: What have we learnt since the start of the recent epidemic? **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–25, 2017.

SANTANA, M.B.; LAMAS, C.C.; ATHAYDE, J.G.; et al. Congenital Zika syndrome : is the heart part of its spectrum ? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 8, p. 1043–1044, 2019.

SARNO, M.; SACRAMENTO, G.A.; KHOURI, R.; ROSÁRIO, M.S. Zika Virus Infection and Stillbirths : A Case of Hydrops Fetalis, Hydranencephaly and Fetal Demise. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, 2016.

SHANKAR, A.; PATIL, A.A.; SKARIYACHAN, S. Recent perspectives on genome, transmission, clinical manifestation, diagnosis, therapeutic strategies, vaccine developments, and challenges of zika virus research. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.

SILVA, A.A.M.; GANZ, J.S.S.; SOUZA, P.S.; et al. Early Growth and Neurologic Outcomes of Infants with Probable Congenital Zika Virus Syndrome. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 11, p. 1953-1956, 2016.

SOUZA, A.S. DE; DIAS, C.M. Fetal Infection by Zika Virus in the Third Trimester : Report of 2 Cases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 12, p. 1622–1625, 2016.

STEINBACH, R.J.; HAESE, N.N.; SMITH, J.L.; et al. A neonatal nonhuman primate model of gestational Zika virus infection with evidence of microencephaly, seizures and cardiomyopathy. **PLoS One**, v. 15, n. 1, 2020.

TABATA, T.; PETITT, M.; PUERTA-GUARDO, H.; et al. Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. **Cell Host**

Microbe, v. 20, n. 2, p. 155–166, 2017.

TANG, M.X.; HU, X.H.; LIU, Z.Z.; KWAK-KIM, J.; LIAO, A. What are the roles of macrophages and monocytes in human pregnancy? **Journal of Reproductive Immunology**, v. 112, p. 73-78, 2015.

TAPPE, D.; VICENTE, J.; GIRÓN, P.; et al. Cytokine kinetics of Zika virus - infected patients from acute to reconvalescent phase. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 205, n. 3, p. 269–273, 2016.

TEIXEIRA, F.M.E.; PIETROBON, A.J.; OLIVEIRA, L.M.; OLIVEIRA, L.M.S.; SATO, M.N. Maternal-Fetal Interplay in Zika Virus Infection and Adverse Perinatal Outcomes. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.

TEIXEIRA, G.A.; DANTAS D.N.A.; CARVALHO, G.A.F.L.; SILVA, A.N.; LIRA, A.L.B.C.; ENDERS, B. C. Análise do conceito síndrome congênita pelo Zika vírus. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 25, n. 2, p. 567–574, 2020.

THOMPSON, S.J.; PEARCE, J.M.; RAMEY, A.M. Vectors, Hosts, and Control Measures for Zika Virus in the Americas. **EcoHealth**, p. 1–19, 2017.

VENTURA, C.V.; MAIA, M.; VENTURA, B.V.; et al. Ophthalmological findings in infants with microcephaly and presumable intra-uterus Zika virus infection. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 79, n. 1, p. 1–3, 2016.

VIANNA, R.A.O.; RUA E.C.; FERNANDES, A.R.; SANTOS, T.C.S; DALCASTEL, L.A.B.; SANTOS, M.L.B.; PAULA, P.S.; CARVALHO, F.R.; FARIA, A.O.P.; ALMEIDA, P.L.; SALES, L.F.; RILEY, L.W.; OLIVEIRA, S.A.; CARDOSO, S.A.A. Experience in diagnosing congenital Zika syndrome in Brazilian children born to asymptomatic mothers. **Acta Tropica**, 2020.

WAGGONER, J.J.; PINSKY, A. Zika Virus : Diagnostics for an Emerging Pandemic Threat VIRUS. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 860–867, 2016.

WALKER, C.L.; LITTLE, M.T.; ROBY, J.A., et al. Zika Virus and the Non-Microcephalic

Fetus: Why We Should Still Worry. **Am J Obstet Gynecol**, v. 220, n. 1, 2019.

WANG, Z.; CHANG, S.; LU, X.; YAO, X.; LIU, X. Relationship between HLA-DPA1 genetic polymorphism and anembryonic pregnancy. **Molecular Genetics and Genomic Medicine**, v. 8, n. 1, 2020.

WOOD, L. B.; WINSLOW, A. R.; PROCTOR, E. A.; et al. Identification of neurotoxic cytokines by profiling Alzheimer's disease tissues and neuron culture viability screening. **Nature Scientific Reports**, 2015.

KOIKE, M.; TAKATSU, K. IL-5 and Its Receptor : Which Role Do They Play in the Immune Response ? **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 104, n. 1, p. 1–9, 1994.

WU, Y.; LIU, Q.; ZHOU, J.; et al. Zika virus evades interferon-mediated antiviral response through the co-operation of multiple nonstructural proteins in vitro. **Cell Discovery**, v. 17006, n. 3, p. 1–14, 2017.

ZANLUCA, C.; CAMPOS, V.; MELO, A.; et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015.

8. ANEXOS

8. ANEXOS

Anexo A- Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação sobre as infecções causadas pelo vírus Zika.

Pesquisador: Benedito Antonio Lopes da Fonseca

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 52664516.7.0000.5440

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.428.859

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa a ser realizado nessa instituição, tendo como investigador principal o Professor Doutor Benedito Antonio Lopes da Fonseca.

O vírus Zika (ZIKV) é um vírus transmitido por mosquitos, particularmente o *Aedes aegypti*, que pertence à família Flaviviridae e o gênero Flavivirus, a mesma família e gênero a que pertencem os vírus da dengue (Lindenbach et al., 2013; Fonseca & Figueiredo, 2015). O ZIKV foi isolado em 1947 do sangue de um macaco sentinela que adoeceu na Floresta Zika, em Uganda, durante uma pesquisa sobre febre amarela (Lanciotti et al., 2008). Nos anos seguintes, este vírus foi isolado de mosquitos e de humanos na África Oriental e Ocidental, porém sem o relato de epidemias. Um inquérito epidemiológico realizado em Uganda mostrou que 6,1% dos sujeitos pesquisados tinham anticorpos contra o ZIKV. Outros estudos mostraram que, já nas décadas de 50 e 60, este vírus também estava presente na Ásia, demonstrando a sua capacidade de dispersão a outras regiões do nosso planeta. Aumentando a sua área de prevalência, em 2007 ele causou uma importante epidemia no Ilha Yap, na Micronésia e subsequentemente, em 2013 e 2014, uma grande epidemia na Polinésia Francesa (Lanciotti et al., 2008, Grard et al., 2014). Desde então, este vírus vem aumentando a sua área de prevalência, migrando inicialmente para a Oceania e mais recentemente, para as Américas e particularmente, o Brasil (Zanluca et al., 2015).

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 1.428.859

O quadro clínico das infecções pelo ZIKV não é específico e lembra, em muitas circunstâncias, as apresentações clínicas da dengue sem sinais de alarme, isto é, febre, exantema, artralgia, dores no corpo e, ocasionalmente, conjuntivite não-purulenta. Até a epidemia na Polinésia Francesa, o ZIKV era associado a apenas infecções sem maior importância. Entretanto, durante esta epidemia, as infecções por este vírus foram associadas à Síndrome de Guillain-Barré, uma doença neurológica grave que afeta primariamente o sistema nervoso periférico (Duffy et al., 2009). Acredita-se que o número de casos da Síndrome de Guillain Barré aumentou em 20 vezes a média anterior à epidemia (Oehler et al., 2013). Este aumento no número de casos também foi observado na Bahia e Pernambuco. Finalmente, em outubro deste ano, inicialmente em Pernambuco e a seguir, em praticamente todo o Nordeste Brasileiro, foi possível observar aumento acentuado nos casos de microcefalia que, devido à sua distribuição generalizada, ausência de um fator externo que pudesse ser responsável pela epidemia, como por exemplo, intoxicações por drogas com potencial teratogênico ou acidente com radiofármacos, aventou-se a possibilidade de ser uma doença causada por um vírus que estivesse circulando na região e, então, as atenções se voltaram para o ZIKV. A associação da microcefalia com o ZIKV veio do encontro de material genético deste vírus em líquido amniótico de duas gestantes da Paraíba e de um óbito fetal ocorrido no Ceará (Ministério da Saúde, 2015). Mesmo assim, faltam maiores evidências para esta associação e testes confirmatórios específicos que demonstrem esta associação.

Objetivo da Pesquisa:

O presente projeto de pesquisa tem os seguintes objetivos:

1. Produção e padronização de um teste de ELISA que permita realizar o diagnóstico sorológico de pacientes infectados por Zika vírus (ZIKV)
2. Padronização de uma reação em cadeia da polimerase precedida pela transcrição reversa (RT-PCR) para detecção do material genético deste vírus durante a fase aguda da doença.
3. Padronização de uma reação de neutralização por redução no número de "plaques" para o diagnóstico preciso destas infecções quando houver a reação cruzada com outros flavivírus.
4. Usar estas metodologias diagnósticas para estabelecer um "coorte" de gestantes em Ribeirão Preto, de maneira a segui-las prospectivamente, e desta maneira, possibilitar a detecção precoce da microcefalia e o estudo da associação entre estas duas doenças. As gestantes serão avaliadas durante a gestação e assim que apresentarem uma doença febril serão investigadas para a infecção pelo ZIKV e se apresentarem recém-nascidos com microcefalia e não tiverem história de doença exantemática na gravidez, também serão investigadas para infecções pelo ZIKV pela detecção dos anticorpos neutralizantes contra o ZIKV.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 1.428.859

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Não há riscos associados a esta pesquisa, apenas a dor decorrente da coleta das amostras de sangue.

Benefícios: A determinação da real associação da infecção pelo vírus Zika com a microcefalia observada em alguns recém-nascidos.

Considera que o maior benefício deste estudo concentra-se no fato de poder determinar com maior propriedade a associação da infecção pelo Zika vírus com a ocorrência de microcefalia sem maiores riscos às gestantes do que uma punção venosa.

No termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), esclarece-se que há o desconforto da coleta de sangue durante a participação no estudo. Ainda no TCLE é mencionado que a participação no estudo poderá ajudar a melhorar a compreensão dos danos potenciais da infecção pelo Zika vírus.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Para atingir os objetivos da pesquisa, o pesquisador responsável afirma que estima-se a participação de 900 gestantes. Diz-se no projeto de pesquisa que, mediante contato com Programa de Assistência Integral à Saúde da Mulher da Secretaria de Saúde de Ribeirão Preto, será realizado o seguimento das pacientes gestantes da rede pública de Ribeirão Preto. As pacientes continuarão a fazer o atendimento de pré-natal nas unidades de origem e, será dada a opção de participar da pesquisa. b) Toda paciente grávida que participar do projeto, ao iniciar o pré-natal colherá uma amostra de sangue para determinar o estado sorológico dela em relação à infecção pelo ZIKV, previamente ao desenvolvimento da gravidez. Este seria a “característica sorológica basal” da paciente e será comparada a uma amostra colhida durante o parto visando detectar a soroconversão para a infecção pelo Zika vírus durante a gravidez.

c) Todas as pacientes serão entrevistadas, desde a sua primeira consulta de pré-natal, e consultas subsequentes, usando um formulário padrão onde serão questionadas mensalmente sobre a presença de doenças exantemáticas febris nela, na família ou contactantes, bem como viagens ou outros fatos que poderão ser de importância para o correto desenvolvimento fetal.

d) Durante a consulta mensal de pré-natal serão coletadas amostras de sangue para que, na eventualidade de uma infecção assintomática resultando em microcefalia, as amostras coletadas mensalmente serão avaliadas para determinar em que período da gestação ocorreu a infecção.

e) As pacientes serão submetidas, regularmente, a dois exames ultrassonográficos durante a gravidez. Na eventualidade de detecção de má-formação fetal durante o ultrassom morfológico, amostras de sangue da paciente e amostras do líquido amniótico serão coletadas e investigadas

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 1.428.859

para a presença do Zika vírus por isolamento e detecção da presença do RNA viral no sangue e líquido amniótico, além da avaliação da presença de anticorpos da classe IgM no sangue materno. A partir da detecção da má-formação fetal, o binômio mãe-feto será seguido no Ambulatório de Defeitos no Desenvolvimento Fetal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (AMEFE - HC-FMRP-USP).

f) Se durante o estudo ocorrer algum óbito fetal em que o feto apresente microcefalia, após o consentimento dos pais, amostras de sangue e vísceras destes fetos serão avaliadas para a presença de possível infecção viral pelo Zika vírus.

g) Deste modo, conseguiremos determinar com maior propriedade a associação da infecção pelo Zika vírus com a ocorrência de microcefalia.

A partir do material biológico colhido das participantes do estudo, o pesquisador pretende:

- 1) Desenvolver Teste ELISA para detecção de anticorpos IgM
- 2) Padronizar técnica de RT-PCR para detecção do vírus Zika
- 3) Proceder o sequenciamento e análise filogenética dos isolados de vírus Zika

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A) Diz-se no termo que se houver identificação de microcefalia, as mães e as crianças serão encaminhadas ao Ambulatório de Defeitos no Desenvolvimento Fetal do HCRP-USP. Indaga-se quem será o responsável por esse atendimento? Falta anexar documento com a concordância da chefia desse ambulatório.

RESPOSTA: Foi anexado o referido documento da Secretaria Municipal da Saúde.

PENDENCIA ATENDIDA.

B) O último parágrafo do termo deve ser modificado. As informações sobre sigilo, garantias de que não há obrigatoriedade em participar e garantias de participação voluntária e retirada do termo de consentimento a qualquer momento, sem prejuízo ao atendimento clínico devem ser dadas em frases em sequência. Ao final dessas informações, deve-se dizer que, após discutir as dúvidas com o pesquisador, se houver desejo em participar do estudo, os indivíduos devem escrever seu nome por extenso, assinar e datar o documento.

RESPOSTA: Em às correções do TCLE, foi acrescentado parágrafo sobre o consentimento em participar do estudo. Portanto, o texto final do item 3 será o seguinte: A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada à minha

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 1.428.859

privacidade. Após esclarecer minhas dúvidas com o pesquisador e houver o desejo em participar do estudo, escreverei o meu nome por extenso, assinarei e datarei o documento, no espaço reservado para este fim.

PENDENCIA ATENDIDA.

C) Para o pesquisador que obtém o termo de consentimento, deve ser feito o mesmo procedimento: deve haver espaço para escrever o nome por extenso, assinatura e data. FOI APRESENTADO TERMO DE ASSENTIMENTO, PORÉM É NECESSÁRIO QUE SE MODIFIQUE AS LINHAS PARA INCLUIR DATA, NOME DO PESQUISADOR QUE OBTEM O TERMO DE ASSENTIMENTO.

RESPOSTA: Foi modificado o TCLE, tendo sido incluído o nome da pesquisadora responsável pela aplicação do TCLE e espaço para sua assinatura, bem como espaços para os nomes por extenso, datas e assinaturas das testemunhas e representantes legais, caso a gestante não saiba ler e escrever ou seja menor de idade, respectivamente.

PENDENCIA ATENDIDA.

D) Caso se pretenda criar biorrepositório com as amostras de sangue a serem colhidas durante o estudo, essa informação deve constar do termo de consentimento e do texto do projeto. Em caso de criação de biorrepositório, é necessário informar no texto do projeto de pesquisa ou em documento em anexo, quem será o responsável pela guarda do material, aonde será armazenado e de que modo as amostras serão catalogadas de modo a preservar a identidade dos participantes. Deve-se garantir, no projeto de pesquisa, que caso as amostras sejam utilizadas em pesquisas futuras, só o serão após submissão do novo projeto de pesquisa a um comitê de ética em pesquisa e que deverá ser tentado contato com o participante para obtenção de sua anuência. Caso se pretenda criar um biorrepositório deve ser informado no texto do termo de consentimento que as amostras poderão ser utilizadas em pesquisas futuras, após aprovação de um comitê de ética e, sempre que possível, será feito contato com o participante.

RESPOSTA: Em relação à pendência 6f, esclareço que não há a intenção de se criar um Biorrepositório vinculado a este projeto de pesquisa. Após o término desta pesquisa e liberado os resultados às gestantes participantes do estudo, estas amostras serão autoclavadas e descartadas.

PENDENCIA ATENDIDA.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa versão - 2

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO	
Bairro: MONTE ALEGRE	CEP: 14.048-900
UF: SP	Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228	Fax: (16)3633-1144
E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 1.428.859

10/02/2016 assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 3 – 26/02/2016 podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_651467.pdf	26/02/2016 11:19:36		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEProjetoZikaPLATBRmodificado_26022016.docx	26/02/2016 11:17:54	Benedito Antonio Lopes da Fonseca	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Carta_resposta_CEP_Zika_26_fev_2016.pdf	26/02/2016 11:15:39	Benedito Antonio Lopes da Fonseca	Aceito
Outros	Protocolodeencaminhamento_acordo_HC_PAISM.pdf	26/02/2016 10:17:12	Benedito Antonio Lopes da Fonseca	Aceito
Outros	AmbulatorioMedicinaFetalHC.pdf	26/02/2016 10:15:37	Benedito Antonio Lopes da Fonseca	Aceito
Outros	CartazGravidezZika.pdf	11/02/2016 01:20:57	Benedito Antonio Lopes da Fonseca	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEProjetoZikaPLATBRmodificado.docx	11/02/2016 01:17:52	Benedito Antonio Lopes da Fonseca	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoZikaGestantesPLATBRmodificado.docx	11/02/2016 01:17:35	Benedito Antonio Lopes da Fonseca	Aceito
Outros	CartarespostaCEPZika.pdf	11/02/2016 01:17:05	Benedito Antonio Lopes da Fonseca	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto2Zika.pdf	11/02/2016 01:07:50	Benedito Antonio Lopes da Fonseca	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	ProjetoZikaPLATBRHCRP.pdf	22/01/2016 14:31:16	Benedito Antonio Lopes da Fonseca	Aceito
Outros	OficioConcordanciaZika.jpg	22/01/2016 13:57:14	Benedito Antonio Lopes da Fonseca	Aceito
Orçamento	OrçamentoProjetoZikaPLATBR.docx	22/01/2016	Benedito Antonio	Aceito

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 1.428.859

Orçamento	OrcamentoProjetoZikaPLATBR.docx	13:56:09	Lopes da Fonseca	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEProjetoZikaPLATBR.docx	21/01/2016 14:59:59	Benedito Antonio Lopes da Fonseca	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoZikaGestantesPLATBR.docx	21/01/2016 14:59:27	Benedito Antonio Lopes da Fonseca	Aceito
Cronograma	CronogramaProjetoZikaPLATBR.docx	21/01/2016 14:58:26	Benedito Antonio Lopes da Fonseca	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 29 de Fevereiro de 2016

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
 (Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br