

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE PSICOLOGIA

DIEGO DA SILVA LIMA

IMPLICAÇÕES DA EXPOSIÇÃO AO ZIKA VÍRUS DURANTE A GESTAÇÃO PARA O  
DESENVOLVIMENTO DA FUNÇÃO VISUAL

São Paulo  
2019

DIEGO DA SILVA LIMA

**Implicações da exposição ao Zika Vírus durante a gestação para o desenvolvimento da função visual**

**Versão original**

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

**Área de concentração:** Neurociências e Comportamento

**Orientadora:** Dora Fix Ventura

São Paulo  
2019

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

Catálogo na publicação  
Biblioteca Dante Moreira Leite  
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Lima, Diego da Silva.

Implicações da exposição ao Zika Vírus durante gestação para o desenvolvimento da função visual /Diego da Silva Lima; orientadora: Dora Fix Ventura. -- São Paulo, 2019.

78 f.

Dissertação -- Área de Concentração: Neurociências e Comportamento – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Zika Vírus 2. Desenvolvimento perceptivo 3. Acuidade visual I.  
Título.

**Autor:** Diego da Silva Lima

**Título:** Implicações da exposição ao Zika Vírus durante a gestação para o desenvolvimento da função visual

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências (Área de Concentração: Neurociências e Comportamento)

Aprovado em: \_\_\_\_\_

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a) \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.(a) Dr.(a) \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.(a) Dr.(a) \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## **Dedicatória**

Dedico o presente trabalho a Adolfina da Silva Rocha (*in memoriam*) por todos os ensinamentos, companhia e compreensão, que se mantiveram mesmo quando a distância e obrigações cotidianas não permitiram me manter mais próximo.

## **Agradecimentos**

À minha família (Danielsie Silva do Carmo, Adolfina da Silva Rocha, Mauro Rezende) e à minha namorada (Karollinny Morais Silveira), que me acompanham desde muito antes de o projeto ser apenas uma possibilidade, e demonstraram sempre apoio incondicional;

À prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dora Ventura, por prontamente me oferecer a oportunidade de trabalho junto ao LABVIS-USP, e pela sábia orientação e suporte em todos os aspectos durante o desenvolvimento do trabalho;

Ao prof. Dr. Russell Hamer pelas importantes perspectivas que ajudaram decisivamente na conclusão do presente trabalho, e pelos conselhos sobre a carreira científica de forma mais ampla;

À equipe do Labvis-USP pela parceria na coleta dos dados, análise e discussão dos resultados (Dr<sup>a</sup>. Valtenice França, Dr<sup>a</sup>. Cristiane Martins, prof. Dr. Max Damico, Dr<sup>a</sup>. Kallene Summer Vidal, prof. prof. Dr. Marcelo Costa, Ms. Luiz Baran, Leonardo Aparecido Silva, Heydi Segundo Tabares, Sarah Leonardo Dias);

A toda a equipe do Hospital Universitário da Faculdade de Medicina de Jundiaí envolvida no projeto, representada pelo prof. Dr. Saulo Passos (coordenador da Coorte Zika Jundiaí), pelo excepcional empenho em encaminhar as participantes, por levantar os dados laboratoriais e clínicos essenciais à interpretação e contextualização dos dados aqui apresentados, e além disso pela sempre amigável recepção;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro essencial durante os dois anos de execução deste trabalho.

## **Apoio Financeiro**

O presente trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através dos programas Projeto Temático (número de processo 2014/26818-2) e Bolsas de Mestrado de Fluxo Contínuo (número de processo 2016/24631-8), e ainda pelo programa Pró-Amazônia da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (número de processo 3263/2013).

## Resumo

Lima, D. S. (2019). *Implicações da exposição ao Zika Vírus durante a gestação para o desenvolvimento da função visual* (Dissertação de Mestrado). Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A Síndrome Congênita do Zika (CZS) é uma condição que afeta o desenvolvimento infantil quando o Vírus Zika (ZIKV) infecta uma mãe gestante. Esta condição é caracterizada pela microcefalia e por uma série de outras manifestações neurológicas e oftalmológicas. Atrofias coriorretinianas, manchas focais pigmentadas, estrabismo e infecção em estruturas do sistema nervoso central relacionadas à visão são todos achados já identificados em pacientes com CZS ou verificados em modelos experimentais. Devido à multiplicidade de formas pelas quais o ZIKV pode prejudicar a função visual no início da vida, nos propusemos a estudar esta condição pela avaliação da acuidade visual (AV) longitudinalmente em uma amostra de crianças infectadas, independente da presença de manifestações clínicas da síndrome. O presente trabalho objetiva avaliar o desenvolvimento da AV de crianças infectadas por ZIKV durante a gestação e relacionar as potenciais manifestações da CZS a quaisquer perdas de AV identificadas. Crianças em um Grupo Controle (N=27), um grupo cuja confirmação de exposição ao ZIKV veio por uma amostra da mãe (ZE; N=22), e um grupo cuja confirmação de exposição ao ZIKV veio por uma amostra da criança (ZI; N=11) tiveram sua AV medida pelo método dos Cartões de Acuidade de Teller (TAC) de 2 a 4 vezes durante os primeiros 30 meses de vida. A AV se desenvolveu normalmente em pacientes que não apresentaram sintomas clínicos da CZS, com raras exceções. Em uma subamostra do grupo ZI que apresentou sintomas clínicos consistentes com a CZS, a AV estava dentro dos valores normativos, com exceção de uma criança na qual foram identificadas atrofias coriorretinianas. A presença de sintomas oftalmológicos parece ser preditiva de perdas visuais de alta magnitude. Em casos de crianças infectadas pelo ZIKV em que sintomas clínicos estão ausentes ou se apresentam de forma sutil, a AV parece estar se desenvolvendo normalmente, mas acompanhamento mais completo a longo prazo é sugerido para estes casos.

Palavras-chave: Zika Vírus. Desenvolvimento perceptivo. Acuidade visual.



## Abstract

Lima, D. S. (2019). *Implications of Zika Virus exposure during pregnancy for visual function development* (Master's Thesis). Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Congenital Zika Syndrome (CZS) is a developmental condition resulting from Zika Virus (ZIKV) maternal infection during pregnancy. This condition is characterized by microcephaly and a series of other neurological and ophthalmological outcomes. Chorioretinal atrophies, focal pigmentary mottling, strabismus and infection in vision-related central nervous system structures have all been identified in CZS patients or verified in experimental models. Due to the multiple ways in which ZIKV might impair visual function in early life, we studied this condition through the assessment of visual acuity (VA) longitudinally in a sample of infected children, irrespective of the presence of CZS symptoms. The present work aims to follow up the VA development of children infected by ZIKV during pregnancy and relate the potential CZS symptoms to any identified losses. Children in a Control Group (N=27), in a group in which confirmation of exposure came from a sample from the mother (ZE; N=22) and a group in which confirmation of exposure came from a sample from the child (ZI; N=11) had their VA measured via the Teller Acuity Cards (TAC) method on 2 to 4 occasions during the first 30 months of life. VA developed normally in patients that did not present CZS outcomes, with rare exceptions. In a sub-sample of the ZI group which presented clinical symptoms consistent with CZS, VA was within normative values, with the exception of one child that presented chorioretinal atrophies. The presence of ophthalmological outcomes seems to be predictive of visual function losses of high magnitude. In cases of ZIKV-infected children without symptoms or presenting only mild symptoms, VA seems to be developing normally. A more long-term follow up is suggested for such cases.

Keywords: Zika Virus. Perceptual development. Visual acuity.

## **Lista de figuras**

Figura 1 - Esquema da situação de aplicação do TAC.....	42
Figura 2 - Trajetórias de desenvolvimento da AV dos três grupos.....	49
Figura 3 - AV do Grupo Controle, normalizada e separada por momento da avaliação.....	51
Figura 4 - AV dos grupos ZE e ZI, normalizada e separada por momento de avaliação.....	52
Figura 5 - AV média dos três grupos.....	53

## Lista de tabelas

Tabela 1 - Resumo da literatura descrevendo achados oftalmológicos relacionados ao ZIKV.....	28
Tabela 2 - Resumo da literatura descrevendo perdas de função visual em casos de CZS.....	35
Tabela 3 - Relação dos pacientes do grupo ZI que apresentaram manifestações clínicas consistentes com quadro de CZS.....	41
Tabela 4 - Média da medida antropométrica de perímetro cefálico ao nascimento dos pacientes que não apresentaram manifestações clínicas da CZS.....	41
Tabela 5 - AV média (expressa em escores Z) dos três grupos.....	53

## Lista de siglas

ZIKV	Vírus Zika
YFV	Vírus da febre amarela
DENV	Vírus da dengue
JEV	Vírus da encefalite japonesa
WNV	Vírus do Oeste do Nilo
RT-qPCR	PCR quantitativo em tempo real (PCR: reação em cadeia pela polimerase)
IgG	Imunoglobina G
IgM	Imunoglobina M
CZS	Síndrome Congênita do Zika
AV	Acuidade Visual
PC	Perímetro cefálico
cpcm	Ciclos por Centímetro
cpg	Ciclos por Grau de Ângulo Visual
TAC	Cartões de Acuidade de Teller
logMAR	Logaritmo do Ângulo Mínimo de Resolução
IC	Intervalo de Confiança
OE	Olho esquerdo
OD	Olho direito
AO	Ambos os olhos

# Sumário

1. Introdução.....	14
1.1. Vírus zika: história epidemiológica recente.....	14
1.2. Vírus Zika: caracterização.....	16
1.3. A Síndrome Congênita do Zika.....	18
1.4. Manifestações oftalmológicas da SCZ.....	24
1.5. O desenvolvimento visual normal no início da vida.....	29
1.6. A função visual de crianças com Síndrome Congênita do Zika.....	33
1.6. Justificativa.....	35
1.7. Objetivos.....	36
2. Métodos.....	38
2.1. Participantes.....	38
2.2. Procedimento.....	42
2.3. Análise de dados.....	43
3. Resultados.....	47
3.1. Acuidade dos pacientes dos grupos Controle, ZE ou ZI livres de sintomas ou com sintomas sutis.....	47
3.2. Acuidade dos pacientes do grupo ZI com sintomas graves.....	50
4. Discussão.....	54
4.1. Resultados da avaliação de AV e sua relação com manifestações clínicas potencialmente ligadas à CZS.....	54
4.2. Limitações.....	56
4.3. Direções futuras de pesquisa.....	57
5. Conclusão.....	60
Referências.....	62

# 1. Introdução

## 1.1. Vírus zika: história epidemiológica recente

O vírus zika (ZIKV) é conhecido desde 1947, quando foi identificado em um ciclo silvático de transmissão (de primata não-humano para mosquito para outro primata não-humano) na floresta de Zika, situada na Uganda (Dick, Kitchen, & Haddow, 1952). O vírus foi isolado inicialmente a partir do soro de um macaco-rhesus posicionado como sentinela durante um estudo de campo sobre a febre amarela. O mesmo trabalho descreve um segundo isolamento, feito em 1948, a partir de um mosquito *Aedes africanus* na mesma localidade. Verificou-se a identidade entre essas duas cepas ao observar que respostas imunológicas que primatas desenvolviam para uma cepa neutralizavam respostas para a segunda cepa. O mesmo trabalho verificou através de testes de neutralização cruzada que os anticorpos desenvolvidos durante essas respostas eram distintos dos anticorpos produzidos como resposta a outros flavivírus como o vírus da febre amarela (YFV) ou da dengue (DENV).

A capacidade do vírus de infectar humanos foi identificada logo em seguida, a partir da constatação de que parcela da população da Uganda e Nigéria possuíam anticorpos neutralizantes contra ZIKV, e a partir do isolamento do ZIKV do plasma de pacientes apresentando um quadro clínico semelhante ao da febre amarela (MacNamara, 1954). Nos anos seguintes, anticorpos neutralizantes contra ZIKV foram identificados em outras ocasiões nas populações destes e de outros países na África e Ásia como o Egito, Índia, Malásia, Bornéu, Filipinas e Vietnã (Smithburn, Kerr, & Gatne, 1954; Smithburn, Taylor, Rizk, & Kader, 1954; Pond, 1963; A. J. Haddow, Williams, Woodall, Simpson, & Goma, 1964; Marchette, Garcia, & Rudnick, 1969; D. L. Moore et al., 1975; Fagbami, 1979; Hayes, 2009). Descrições dos sintomas causados pela infecção no mesmo período, entretanto, são mais escassas. Dois estudos de caso isolados descrevem a infecção como levando a sintomas como dor de cabeça frontal, exantemas, febre e mal-estar (Simpson, 1964), e ainda dores retro-orbitais, suor, calafrios e dores nas articulações (Filipe, Martins, & Rocha, 1973), persistentes por um período de cinco dias a uma semana.

O ZIKV foi relacionado a uma epidemia de febre durante uma investigação na Ilha de Java, Indonésia, entre 1977 e 1978 (Olson, Ksiazek, Suhandiman, & Triwibowo, 1981). De uma amostra de 219 participantes, 60 (27%) tiveram confirmação de infecção por flavivírus. Testes subsequentes de neutralização cruzada apontaram anticorpos contra ZIKV de forma

exclusiva em 7 pacientes, e ZIKV em conjunto com outros flavivírus, como o DENV, em outros 10 pacientes. Esses pacientes mostraram sintomas como febre, calafrios, suor e artralgia, similar aos casos isolados que haviam sido descritos anteriormente. Mosquitos *A. aegypti* e *A. albopictus* populavam densamente a região onde o estudo foi realizado, e já eram reconhecidos como vetores do DENV na região. Previamente a este estudo, o ZIKV havia sido isolado a partir de mosquitos *A. aegypti* em uma região próxima, na Malásia, estabelecendo esta espécie como vetor do ZIKV (Marchette et al., 1969).

Entre abril e maio de 2007, o ZIKV foi responsável por uma epidemia na Ilha de Yap, nos Estados Federados da Micronésia. O vírus foi identificado por meio de diagnóstico sorológico e molecular via técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) em 49 pessoas (de um total de 185 investigadas), enquanto que outras 59 foram consideradas casos prováveis (Duffy et al., 2009). Os pacientes com diagnóstico confirmado que apresentaram sintomas (38%) descreveram a presença de febre, exantemas, artralgia, mialgia e conjuntivite. Um estudo de soroprevalência com 557 residentes da ilha (que possuía na ocasião uma população total de pouco menos de 7000 habitantes) estimou que 74% de toda a população tenha entrado em contato com o vírus, apesar de a maioria dos casos serem assintomáticos. Durante esta epidemia, foram estabelecidos parâmetros importantes para o diagnóstico sorológico e molecular da infecção por ZIKV (Lanciotti et al., 2008). Foi documentada, por exemplo, o alto grau de reatividade cruzada entre ZIKV e DENV quando o diagnóstico é feito por meio de sorologia IgM, especialmente quando os pacientes já estão imunizados contra DENV.

Uma epidemia similar, mas em escala maior, foi observada sete anos depois, na Polinésia Francesa (Cao-Lormeau et al., 2014). Foram registrados 5895 casos suspeitos, apresentando os mesmos sintomas descritos na epidemia de Yap. 584 amostras de sangue passaram por testagem via RT-PCR, e infecção foi confirmada em 294 deles. Estima-se que um total de 19.000 pessoas (aproximadamente 7% da população) tenham sido infectadas. Análises filogenéticas dessas amostras demonstraram alto grau de homologia com o vírus identificado na ilha de Yap.

O ZIKV foi identificado nas Américas pela primeira vez em março de 2015, no Nordeste brasileiro, por dois grupos independentes de pesquisadores. No primeiro trabalho (Zanluca et al., 2015) foi encontrado RNA viral consistente com ZIKV em oito de um conjunto de 21 amostras coletadas em pacientes apresentando sintomas análogos aos da dengue na cidade de Natal-RN. Posteriormente, Campos, Bandeira & Sardi (2015)

descreveram uma série de casos de 24 pacientes do município de Camaçari-BA, sete dos quais testaram positivo para ZIKV. Supõe-se que o vírus tenha sido introduzido no país durante o ano de 2014, quando houve aumento de turistas viajando a partir da Polinésia Francesa para participar de eventos esportivos (Salvador & Fujita, 2016). Como um dos vetores responsáveis pela transmissão do vírus (*A. Aegypti*) é endêmico no país e existe em população abundante, principalmente no período de chuvas (entre novembro e março) (Vissoci et al., 2018), o ZIKV se alastrou pelo país em alta velocidade. Entre o início de 2015 e o final de 2016, já haviam sido registrados aproximadamente 300.000 casos suspeitos de ZIKV no país (Oliveira et al., 2017) No início de março de 2016, o vírus havia se espalhado do país para, pelo menos, outros 33 países da América do Sul e Central (Hennessey, 2016; Petersen, Jamieson, Powers, & Honein, 2016).

Apesar de epidemias em larga escala de ZIKV terem sido documentadas apenas recentemente, casos de infecção por ZIKV podem ter sido historicamente sub-reportados. Os agentes virais DENV e Vírus Chikungunya (CHIKV), também transmitidos por mosquitos, estão frequentemente presentes nas mesmas regiões de incidência do ZIKV, são responsáveis por sintomatologia similar à causada pelo ZIKV. O DENV possui alto grau de reatividade cruzada com ZIKV em exames sorológicos, portanto casos ocorrendo fora dessas epidemias podem ter sido erroneamente atribuídos a esse ou outros agentes (A. D. Haddow et al., 2012). Além disso, a infecção por ZIKV é assintomática em aproximadamente 80% dos casos, e quando estão presentes, na maioria dos casos evoluem para remissão espontânea em um curto espaço de tempo após a infecção (Petersen et al., 2016), portanto infecções pelo vírus podem ter sido consideradas como de importância reduzida quando comparadas a quadros como o da febre causada por DENV, que pode levar à morte em casos mais severos (Martina, Koraka, & Osterhaus, 2009).

## **1.2. Vírus Zika: caracterização**

O ZIKV é um flavivírus, (família *flaviviridae*) que tem por protótipo o YFV. O termo *flavus* (traduzido do latim como amarelo) é uma referência ao sintoma de icterícia causada pelo YFV durante o período infeccioso (Chambers, Hahn, Galler, & Rice, 1990). Os vírus dessa família são em sua maioria dependentes de vetores artrópodes hematófagos (como mosquitos) para sua transmissão, portanto são adicionalmente caracterizados como arbovírus (Chambers et al., 1990). Além do YFV e ZIKV, são exemplos de flavivírus de relevância epidemiológica para a população humana os vírus da dengue (DENV), o vírus do Oeste do Nilo (WNV) e o vírus da encefalite japonesa (JEV).



O sequenciamento genético completo do ZIKV foi realizado em 2007 (Kuno & Chang, 2007), demonstrando que o vírus segue a mesma organização genética dos demais flavivírus: uma molécula de RNA de fita única, de aproximadamente 10.7 mil nucleotídeos, com uma região codificante central flanqueada por duas regiões não-codificantes (Chambers et al., 1990; Kuno & Chang, 2007). A região codificante é responsável por sintetizar uma única poliproteína que é subsequentemente clivada para compor três proteínas estruturais (capsídeo, proteína envelope, e precursora de membrana) e outras sete proteínas não estruturais.

Os flavivírus infectam a célula hospedeira por um mecanismo de endocitose mediada por receptor. Após infecção, são sintetizadas novas partículas de RNA virais e poliproteínas explorando o retículo endoplasmático da célula. Partículas virais maduras são subsequentemente transportadas pelo complexo trans-Golgi para fora da célula por exocitose, renovando o ciclo de infecção (Mukhopadhyay, Kuhn, & Rossmann, 2005; S. Singh & Kumar, 2018). A literatura ainda é inconclusiva sobre quais receptores da célula hospedeira propiciam a entrada do ZIKV. O receptor AXL, da família TAM de receptores (cujos componentes são os receptores Tyro3, AXL e Mertk, todos relacionados a respostas imunológicas) tem sido levantado como um forte candidato, devido ao seu elevado nível de expressão em células onde o ZIKV possui alto grau de tropismo, como células da pele, células neurais progenitoras e células gliais (Nowakowski et al., 2016). Entretanto, o papel desse receptor como propiciador da infecção (ou pelo menos como propiciador exclusivo) tem sido contestado por trabalhos que demonstram infecção por ZIKV mesmo em modelos experimentais nos quais este receptor é bloqueado (Hastings et al., 2017). Outro receptor apontado é o TLR-3 da família TLR de receptores (também relacionados a respostas imunológicas) cuja expressão se correlaciona com a infecção em células neurais progenitoras (Dang et al., 2016). Vacinas para ZIKV ainda não estão disponíveis, mas estão em rápido processo de desenvolvimento. Vacinas de DNA em particular têm mostrado forte potencial em modelos experimentais (Larocca et al., 2016).

O vírus é tradicionalmente dividido em duas linhagens principais: uma Africana (subdividida em oriental, que foi inicialmente identificada na Uganda, e outra ocidental, identificada posteriormente na Nigéria), e outra asiática, reconhecida como a responsável pelas epidemias na Micronésia, Polinésia Francesa e Brasil (A. D. Haddow et al., 2012; Faye et al., 2014). Estudos têm sugerido que a linhagem asiática tenha ainda se diferenciado um pouco antes das epidemias de larga escala na Polinésia Francesa e Brasil (Gubler, Vasilakis, &

Musso, 2017; Rossi, Ebel, Shan, Shi, & Vasilakis, 2018), entretanto o papel dessa diferenciação no quadro sintomatológico apresentado (se existente) ainda não está claro (Rossi et al., 2018).

A picada de mosquitos do gênero *Aedes*, endêmico em todos os continentes, principalmente em regiões de clima tropical, é a principal forma de transmissão do ZIKV, o que explica a ampla disseminação recente do vírus (Petersen et al., 2016). Alguns trabalhos demonstraram que o vírus pode ser transmitido ainda por contato sexual (Hills, 2016; Didier Musso et al., 2015), ou por transfusões de sangue (D. Musso et al., 2014), assim como pelo leite materno (Blohm et al., 2018; Colt et al., 2017) achados que possuem importantes implicações para fins de elaboração de políticas de prevenção.

O diagnóstico da infecção por ZIKV não pode se basear apenas no quadro clínico do paciente devido à não-especificidade dos sintomas, que se confundem com os causados, por exemplo, por DENV e CHIKV (Gourinat, O'Connor, Calvez, Goarant, & Dupont-Rouzeyrol, 2015). Exames sorológicos de ZIKV estão disponíveis comercialmente, mas tendem a apresentar alto grau de reatividade cruzada com outros flavivírus, principalmente com DENV e YFV (Lanciotti et al., 2008; Safronetz et al., 2017). A infecção por ZIKV pode ser detectada de forma mais segura através de diagnóstico molecular realizado próximo à fase de viremia, por meio de técnica de RT-qPCR, utilizando primers específicos para o vírus. Estima-se que o RNA permaneça no sangue por um período de aproximadamente 6 dias após a fase de viremia aguda, e por um período maior de até 15 dias e em volume maior em amostras de urina (Gourinat et al., 2015).

### **1.3. A Síndrome Congênita do Zika**

#### **1.3.1. Descoberta da Síndrome**

Apesar de ser conhecido desde 1947 (Dick et al., 1952), apenas a partir de 2015 o ZIKV foi relacionado a quadros de infecção congênita. Até então, o vírus vinha sendo associado quase exclusivamente a sintomas como febre baixa, exantemas, dores de cabeça e dores no corpo, semelhante a outros flavivírus como DENV e YFV. Os primeiros relatos de malformações relacionadas a infecção por ZIKV surgiram após a epidemia de larga escala no Brasil entre 2015-2016 (Petersen et al., 2016), ocasião na qual foi notado um aumento expressivo na quantidade de crianças nascidas com microcefalia no país. Enquanto nos anos anteriores havia sido registrada uma média de 0,5 casos de microcefalia por 10.000

nascimentos, na segunda metade de 2015 foram registrados cerca de 20 casos por 10.000 nascimentos (Schuler-Faccini, 2016).

Os primeiros casos surgiram na Região Nordeste do país em setembro de 2015 (Schuler-Faccini, 2016), que compreendia a semana epidemiológica 45 do ZIKV (Ministério da Saúde, 2018b; Oliveira et al., 2017, 2017), intervalo próximo do período de gestação médio de 38-40 semanas. A forte associação temporal entre o início da epidemia e os primeiros casos microcefalia em regiões com alta incidência de ZIKV seria o primeiro fator sugestivo do surgimento de uma nova síndrome congênita, entretanto tal associação por si só seria insuficiente para estabelecer o vírus como mecanismo causal por trás das novas manifestações clínicas. Outras hipóteses para esse aumento dos casos de microcefalia haviam sido levantadas na época, como maior sensibilidade para detecção e registro desses casos, motivados pela percepção pública da potencial ameaça. Tal percepção veio acompanhada da criação de um protocolo especial de notificação em um contexto nacional de sub-notificação de casos de microcefalia (Victora et al., 2016; Schuler-Faccini, 2016).

O diagnóstico molecular de infecção por ZIKV realizado durante o período de gestação em mães afetadas foi fundamental para que a associação entre ZIKV e os casos de microcefalia passasse de presumida para confirmada. Calvet et al. (2016) descrevem dois casos nos quais a microcefalia foi diagnosticada no feto por ultrassom. As pacientes tiveram o líquido amniótico coletado na 10<sup>a</sup> e 18<sup>a</sup> semanas de gestação. Todos os testes para os principais agentes conhecidos por causarem infecções congênicas (toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus e herpes simplex, ou TORCH) levaram a resultados negativos. Partículas de RNA de ZIKV foram encontradas na amostra, e análises filogenéticas do material encontrado apontaram alto grau de homologia com a cepa do vírus circulante na Polinésia Francesa em 2013. Melo et al. (2016) discutem outros dois casos de microcefalia diagnosticada por ultrassom, em que ambas as mães tiveram confirmação de infecção por PCR. Um dos fetos estava com perímetro cefálico (PC) 2.6 desvios-padrão abaixo do esperado para a idade, e podiam ser identificadas atrofia cerebral e calcificações dispersas pelo tecido nervoso. No segundo caso, o PC estava 3.1 desvio-padrão abaixo do esperado, havia assimetrias cerebrais, ventriculomegalia unilateral, afinamento do parênquima e malformação do tálamo, e presença de calcificações. A autora compara os dois casos a outras infecções congênicas conhecidas, notando que a presença de calcificações é indicativa de infecção viral.

Autópsias realizadas a partir de gestações interrompidas formaram outra linha de evidência importante para estabelecer a causalidade. Em um caso (Mlakar et al., 2016) foram

notados restrição de crescimento via ultrassom, perímetro cefálico abaixo do terceiro percentil para a idade, e a presença de várias calcificações distribuídas por todo o cérebro. Análises histológicas após a interrupção da gravidez mostrou redução das estruturas encefálicas do feto, presença de calcificações no córtex e substância branca subcortical, e presença de partículas virais detectáveis por microscopia eletrônica. Amostras de tecido neural testaram positivo em teste de RT-qPCR para a presença de ZIKV. Análises filogenéticas apontaram homologia com as cepas identificadas na Polinésia Francesa e outra isolada no Brasil recentemente. Achados semelhantes foram descritos por Martines et al. (2016) em uma série de 5 casos (dois de abortos espontâneos e três de óbitos próximos ao nascimento): foram identificadas microcefalia, lisencefalia, hipoplasia cerebelar e ventriculomegalia, artrogripose, microcalcificações, nódulos microgliais, degeneração celular e necrose, acompanhados da presença de antígenos de ZIKV no citoplasma de neurônios e células gliais em estado de degeneração.

### **1.3.2. Quadro clínico e epidemiologia**

Várias séries de casos viriam a ser publicadas entre 2015 e 2016 relatando de forma detalhada um conjunto de características morfológicas e prejuízos funcionais em crianças afetadas que passariam a ser denominadas Síndrome Congênita do Zika, ou CZS (Chan, Choi, Yip, Cheng, & Yuen, 2016; Miranda-Filho et al., 2016; C. A. Moore et al., 2017). Características detectáveis por exame físico neonatal incluíam a microcefalia, colapso craniano (incluindo desproporção craniofacial, depressão biparietal e occipito proeminente), e pele do escalpo em excesso, características secundárias resultantes de um descompasso entre o crescimento do sistema nervoso central e as estruturas derivadas do ectoderma como osso e pele (Miranda-Filho et al., 2016; C. A. Moore et al., 2017).

Dentre os achados detectáveis em exames de neuroimagem, destaca-se a presença de calcificações cerebrais, encontradas principalmente na zona periventricular, parenquimal, nos núcleos da base e nas junções da substância branca com a substância cinzenta cortical (Aragao et al., 2016; Schuler-Faccini, 2016). Tais calcificações são uma manifestação comum no sistema nervoso em outras infecções congênicas como em casos de toxoplasmose ou de infecção por citomegalovírus (Miranda-Filho et al., 2016). O córtex cerebral pode apresentar uma série de malformações como lisencefalia (ausência de padrão de giros natural desta estrutura), padrão de girificação alterado (se presentes, sulcos e giros podem encontrar-se em posições não-usuais) e ventriculomegalia (alargamento dos ventrículos cerebrais secundário à atrofia cerebral) (Aragao et al., 2016; Moura da Silva et al., 2016; Soares de Oliveira-

Szejnfeld et al., 2016). Outros achados descritos incluem hipoplasia do corpo caloso, do tronco encefálico e do cerebelo (Aragao et al., 2016; Moura da Silva et al., 2016; Schuler-Faccini, 2016; Soares de Oliveira-Szejnfeld et al., 2016).

A presença de tais danos globais reflete-se em prejuízos motores imediatamente detectáveis. Artrogriose (contraturas congênitas), hipertonia, espasticidade, disfagia (dificuldades com os reflexos de deglutição) e convulsões epiléticas são frequentemente reportadas (van der Linden et al., 2016). Pacientes podem apresentar ainda perda do controle voluntário das mãos e de reflexos de agarrar, ou dificuldades para sustentar a cabeça e hiperreflexia (Moura da Silva et al., 2016; van der Linden et al., 2016). Prejuízos auditivos tanto de natureza condutiva quanto de natureza neurossensorial têm sido reportadas em alguns casos (Leal, 2016) assim como perdas visuais (Ver sessões 1.4 e 1.6). Tal quadro de prejuízos globais implica atrasos significativos do desenvolvimento cognitivo de pacientes diagnosticados com a síndrome (França et al., 2016; Lopes Moreira et al., 2018).

A microcefalia viria a se tornar o principal critério classificatório para a síndrome, o que na prática impôs alguns desafios diante da existência de múltiplos critérios. No início da epidemia da síndrome, o Ministério da Saúde Brasileiro sugeriu o diagnóstico baseado em um critério universal de PC de -2 desvios-padrão (33 cm) abaixo da média para ambos os sexos e independente de idade gestacional, o que na prática levou a uma alta taxa de falsos positivos (Victora et al., 2016). Esse critério foi posteriormente revisado para um critério mais conservador que considera sexo e idade gestacional, baseado no padrão InterGrowth da Organização Mundial da Saúde (aproximadamente 32 cm para meninos e 31.6 cm para meninas). Critérios ainda mais conservadores de 3 desvios-padrão chegaram a ser propostos, mas não foram universalmente adotados (Victora et al., 2016).

Apesar de uma das manifestações mais frequentes, a microcefalia não é observada em todos os casos, sendo possível que crianças apresentem sinais de CZS mesmo com um PC dentro dos valores normativos (Rice et al., 2018; Soares de Oliveira-Szejnfeld et al., 2016; C. V. Ventura, Maia, Dias, Ventura, & Belfort, 2016). Moore et al. (2017) elencaram, além da microcefalia acompanhada de colapso craniano (1º critério), outras quatro características prevalentes em casos de CZS e que poderiam ser utilizadas para diagnóstico diferencial da síndrome: (2) estreitamento do córtex cerebral com calcificações subcorticais; (3) presença de cicatrizes maculares e manchas focais pigmentadas na retina (ver sessão 1.4); (4) contraturas congênitas; e (5) hipertonia e síndrome motora extrapiramidal.

Entretanto, a exposição ao vírus durante a gestação não implica automaticamente no desenvolvimento da síndrome. Utilizando dados de incidência do estado da Bahia, Johansson et al. (2016) estimaram que apenas 1% a 13% das infecções em gestantes resultem na síndrome. Análises epidemiológicas têm demonstrado que tal risco é distribuído geograficamente de forma heterogênea, com estimativas de risco variando de 0,16% em estados do Sul do país como Santa Catarina (que registrou apenas casos raros), passando por 3,61% no Rio de Janeiro, até valores mais elevados no Nordeste brasileiro, como 12,57% no Pernambuco e 17,11% na Paraíba (Jaenisch et al., 2017). Tal risco, entretanto, é difícil de ser estimado, pois depende de dinâmicas epidemiológicas como aumento da prevalência da população imunizada. Enquanto no ano de 2015 os casos foram concentrados principalmente na região Nordeste, em 2016 novas regiões passaram a apresentar alta incidência, como o estado do Rio de Janeiro e a Região Centro-Oeste (Oliveira et al., 2017; Vissoci et al., 2018). Entre os anos de 2017 e 2018, a incidência reduziu-se drasticamente em todo o território nacional (Ministério da Saúde, 2018b).

A presença de sintomas de infecção na mãe e a ocorrência desses sintomas no primeiro trimestre de gestação têm sido apontados como fatores de vulnerabilidade para a ocorrência da síndrome. Revendo o conjunto total de casos de microcefalia presumivelmente relacionados a ZIKV registrados no Brasil até o início de 2016 (N=1501), França et al. (2016) encontraram que a presença de exantemas durante o primeiro trimestre de gestação é altamente preditiva de microcefalia severa (PC médio menor que -3 unidades de Escore Z), e que a presença desses sintomas posteriormente levava a quadros com um PC médio maior (entre -3 e -2 escores Z). Mães que não se recordavam de apresentar sintomas tinham como resultado crianças com PC médio maior que -2 (sugerindo que nem todas as crianças nascidas destes casos seriam classificadas como tendo microcefalia). Análises de risco chegaram a apontar que o risco de contrair a síndrome após o segundo trimestre de gestação é mínimo (Johansson et al., 2016).

### **1.3.3. Mecanismos fisiopatológicos**

Apesar do inesperado potencial neurotrópico do ZIKV, esta não é a primeira ocasião em que um flavivírus é relacionado a infecções sintomáticas no sistema nervoso central. Os vírus do Oeste do Nilo (WNV) e da encefalite japonesa (JNV), apesar de não estarem relacionados a infecções congênitas, podem atravessar a barreira hematoencefálica, infectar neurônios e células gliais, levando, em casos mais severos, a meningite, encefalite, paralisia e morte (Sips, Wilschut, & Smit, 2012; Winkelmann, Luo, & Wang, 2016). O próprio ZIKV

havia sido relacionado, durante a epidemia na Polinésia Francesa, a um caso isolado em adulto da Síndrome de Guillain-Barré (caracterizada por paralisia parcial, que pode ou não perdurar após o período infeccioso) (Oehler et al., 2014), um achado que parece ter sido reproduzido em raras ocasiões durante a epidemia no Brasil (Brasil et al., 2016; Araujo et al., 2016). Suspeita-se que a capacidade do vírus de infectar o sistema nervoso central tenha por origem mutações recentes, ocorridas um pouco antes da epidemia na Polinésia Francesa (Yuan et al., 2017; Zhang et al., 2017).

O ZIKV foi, entretanto, o primeiro flavivírus apontado como tendo potencial teratogênico. Hipotetiza-se que tal potencial anteriormente desconhecido em *flaviviridae* deva-se, entre outros fatores, a uma capacidade particular deste agente de iniciar um processo infeccioso intermediário entre a infecção materna e fetal, acontecendo nas células endoteliais fetais e trofoblastos (células que compõem a barreira placentária). Tais células expressam o receptor AXL (candidato como responsável pelo processo infeccioso por ZIKV) em alta quantidade, e portanto apresentam alta permissibilidade para o ZIKV mas não para outros flavivírus como WNV e DENV (Mysorekar & Diamond, 2016; Richard et al., 2017).

Modelos experimentais *in vitro* empregando organoides cerebrais têm demonstrado o ZIKV infectando seletivamente células neurais progenitoras, células gliais e neurônios em estágio inicial de desenvolvimento, levando à disrupção dos processos de proliferação (divisão de células neurais progenitoras) diferenciação (transformação de células neurais progenitoras em neurônios e células gliais maduras) e migração celular (movimento celular da zona periventricular, rica em células neurais progenitoras, para outras regiões mais externas, que compõem as regiões do córtex cerebral e dos núcleos da base) (Caires-Júnior et al., 2018; Cugola et al., 2016; Dang et al., 2016; Garcez et al., 2016; Li et al., 2016; Tang et al., 2016; van den Pol, Mao, Yang, Ornaghi, & Davis, 2017). O principal mecanismo por trás da síndrome parece ser uma depleção do conjunto inicial de células neurais progenitoras ocorrendo ainda na fase de proliferação, que limita o número de células disponíveis para os processos de migração e diferenciação (Dang et al., 2016; Li et al., 2016). Camundongos em estágio inicial de desenvolvimento, quando inoculados com o vírus, apresentam perdas de tecido cortical e subcortical análogas ao que acontece em casos de CZS (Cugola et al., 2016; van den Pol et al., 2017).

O forte potencial neurotrópico do ZIKV demonstrado em laboratório de certa forma contrasta com o moderado risco de ocorrência da síndrome quando infecta gestantes (Johansson et al., 2016; Jaenisch et al., 2017). Um número de hipóteses têm sido levantadas

sobre os mecanismos por trás da vulnerabilidade à CZS. Mais recentemente, evidência experimental tem sido acumulada de que um processo de aprimoramento dependente de anticorpo (ADE) pode ocorrer de forma cruzada entre o DENV e o ZIKV (Dejnirattisai et al., 2016; Priyamvada et al., 2016). Tal mecanismo, conhecido por atuar entre diferentes sorotipos de DENV, promove a produção de maior viremia e sintomas mais severos em uma segunda infecção com um novo sorotipo, em comparação com a primeira infecção (Mahalingam, Teixeira, & Halstead, 2017). Da mesma forma, uma infecção prévia por DENV poderia potencializar uma infecção por ZIKV adquirida durante o período gestacional, aumentando a chance de infecção de células da barreira placentária (Castanha et al., 2017) e consequente acesso e proliferação do vírus em tecido nervoso do feto (Brown et al., 2019).

Existe também forte evidência de que características genéticas do hospedeiro sejam importantes para determinar o quadro. Caires-Júnior et al. (2018) verificaram através de estudo *in-vitro* que células neurais progenitoras induzidas a partir de amostras de sangue de gêmeos dizigóticos discordantes (isto é, gêmeos dizigóticos, um deles tendo desenvolvido SCZ e o outro não) apresentam resposta diferenciada ao vírus. Células induzidas a partir de amostras do gêmeo afetado apresentam maior suscetibilidade à infecção pelo vírus do que células induzidas a partir de amostras do gêmeo não afetado. A partir de análise de expressão de RNA, os autores verificaram 64 genes expressos diferencialmente entre gêmeos afetados e não afetados, todos relacionados à regionalização e desenvolvimento. Hipotetiza-se que a associação entre a exposição ao vírus e uma certa disposição genética interajam para que essa condição ocorra.

#### **1.4. Manifestações oftalmológicas da SCZ**

Danos na retina resultantes da infecção congênita por ZIKV são prevalentes em pacientes com CZS. As primeiras manifestações oftalmológicas associadas com a síndrome foram descritas por C. V. Ventura, Maia, Bravo-Filho, Góis, & Belfort (2016), que destacam três casos de crianças com microcefalia e calcificações cerebrais supostamente infectadas por ZIKV durante a gestação. Os autores identificaram manchas focais pigmentadas na mácula e perda do reflexo foveal nas três crianças, e uma extensa atrofia coriorretiniana em uma delas, achados similares ao de infecções congênitas TORCH como rubéola e toxoplasmose (Miranda-Filho et al., 2016; Russell-Eggitt & Lightman, 1992). Posteriormente, identificou-se que o nervo óptico também encontra-se comprometido em muitos desses casos, apresentando hipoplasia e palidez (C. V. Ventura, Maia, Ventura, et al., 2016). Estes e uma série de



trabalhos subsequentes que confirmaram e expandiram esses achados estão sumarizados nas Tabelas 1 e 2.

Apesar de danos na retina serem aparentemente mais prováveis em crianças com microcefalia (C. V. Ventura, Maia, Travassos, et al., 2016), eles também podem acontecer em crianças nascidas com perímetro cefálico normal. Ventura, Maia, Dias et al. (C. V. Ventura, Maia, Dias, et al., 2016) reportaram o primeiro caso de uma criança com atrofia coriorretinianas nascida com um perímetro cefálico normal. Posteriormente, foi mostrado que tais casos poderiam ser mais comuns: em uma amostra de 112 crianças com lesões oculares, Zin et al. (2017) encontraram que em 41,7% dos casos as crianças não podiam ser classificadas como tendo microcefalia, e 33,3% não tinham nenhum achado no Sistema Nervoso Central. Dentre as 494 crianças seguidas pelo *US Zika Pregnancy Registry* (USZPR) que realizaram avaliações oftalmológicas, 2% mostraram anormalidades oftalmológicas, apesar de nenhuma outra anormalidade ter sido detectada em exame físico no momento do nascimento (Rice et al., 2018).

Inicialmente, foi hipotetizado que as manifestações oftalmológicas da CZS seriam secundárias às malformações de estruturas cranianas características da microcefalia. Danos oculares são observados em casos de microcefalia com etiologia genética (Moshfeghi, de Miranda, & Costa, 2016), o que reforçaria essa hipótese. A consequente obstrução de vasos sanguíneos retinianos resultante do colapso craniano seria um mecanismo hipotetizado do dano (Soares de Oliveira-Szejnfeld et al., 2016). Entretanto, a alta prevalência de anormalidades retinianas em crianças com CZS sem microcefalia é altamente sugestiva de que a infecção direta de células retinianas pode ser o mecanismo principal por trás das lesões observadas. Fernandez (2017) descreve alguns achados histopatológicos em olhos de fetos de gestações interrompidas que são consistentes com infecção retiniana direta por ZIKV. Esses achados incluem estreitamento da camada de fotorreceptores e da coroide, perda de pigmento do epitélio pigmentar da retina e anormalidades de nervo óptico, todos correlacionados com a presença de antígenos de ZIKV e infiltrados inflamatórios. Tais achados são consistentes com o que é observado em exames de Tomografia de Coerência Óptica de pacientes de CZS: descontinuação das junções dos segmentos internos e externos da camada de fotorreceptores, estreitamento da coroide e da retina, descontinuação da zona elipsoide e amplas escavações através das diferentes camadas retinianas (C. V. Ventura, Ventura, Bravo-Filho, et al., 2016).

Células do epitélio pigmentado da retina e células endoteliais da barreira hemato-retiniana são permeáveis ao ZIKV e constituem alvos da infecção (Roach & Alcendor, 2017).

O receptor AXL e outros receptores homólogos têm sido encontrados em estado de *up-regulation* em células infectadas por ZIKV nestes tecidos (Cugola et al., 2016; Nowakowski et al., 2016; S. Singh & Kumar, 2018), levantando-o como um potencial mecanismo por trás da vulnerabilidade dessas células. Inoculação direta dessas células em modelos utilizando camundongos adultos ou em desenvolvimento produzem atrofia coriorretinianas e hiperpigmentação do epitélio pigmentar retiniano que guardam certa analogia com as manifestações oftalmológicas da CZS (P. K. Singh et al., 2017). Mais de uma via de transmissão tem sido proposta como origem das partículas virais dessas infecções: uma onde o vírus tem acesso direto a partir de vasos sanguíneos da retina via células endoteliais retinianas (Fernandez et al., 2017), e outra onde o vírus é transmitido do sistema nervoso central para a retina (particularmente para as células ganglionares da retina inicialmente) via transporte axonal pelo nervo óptico (de Oliveira Dias et al., 2018; van den Pol et al., 2017).

Danos nas estruturas anteriores do olho, apesar de serem menos frequentemente reportados, são igualmente severos. Paula Freitas et al. (2016), descrevendo os resultados de uma amostra de 29 pacientes com CZS, além de descrever os danos retinianos anteriormente relatados na literatura (em 34,5% dos casos), descreve uma criança com subluxação monocular do cristalino e coloboma binocular da íris. Achados similares foram descritos também, por exemplo, por Zin et al. (2018), que encontraram 4 crianças (2,3%) da amostra com problemas como microftalmia, coloboma de íris e micro-córnea. O processo de infecção atingindo a porção anterior do olho ainda não está totalmente esclarecido, mas uma hipótese proposta é a de que a infecção ocorra em uma idade mais precoce do desenvolvimento pré-natal, quando tais estruturas encontram-se ainda indiferenciadas, sendo parte do neuroectoderma (Fernandez et al., 2017), composto principalmente por células neurais progenitoras (alvos demonstrados da infecção por ZIKV). Antígeno de ZIKV foi identificado em estruturas anteriores do olho como o epitélio pigmentar da íris, esfíncter e músculos dilatadores (Fernandez et al., 2017), reforçando a hipótese de que um processo infeccioso acontece nessas estruturas.

Problemas de motilidade ocular como estrabismo e nistagmo são outra modalidade de sintomas frequentemente descritas em pacientes com CZS. Ao avaliar um grupo de 70 crianças com CZS, Verçosa et al. (2017) encontraram estrabismo em 10 participantes (14% da amostra; 9 foram casos de esotropia e um 1: exotropia). Nistagmo foi observado em 6 crianças (9% da amostra). Em 6 dos 10 casos de estrabismo e 1 dos 6 casos de nistagmo, não foram observados danos característicos da CZS como danos na retina ou nervo óptico. Em

uma amostra de 173 com crianças com CZS confirmada ou suspeita (Zin et al., 2018), exotropia foi identificada em 2 casos (1,3%), e esotropia em 22 (12,7%). Sabe-se que ZIKV pode desencadear processo infeccioso em regiões como o colículo superior em modelos animais (van den Pol et al., 2017), região central para a coordenação dos movimentos oculares, cuja função pode sofrer interferência do processo infeccioso.

Crianças com CZS frequentemente apresentam erros refrativos, e a hipermetropia (problemas para focar estímulos próximos) constitui o problema mais frequentemente encontrado. Em uma amostra de 60 crianças com CZS, L. O. Ventura, Lawrence, et al. (2017) encontraram 39% com hipermetropia e 37% com astigmatismo em um primeiro teste refrativo. Zin et al. (2018) ao avaliar 173 crianças com CZS, encontraram hipermetropia em 125 (72,5%), e miopia em menor proporção (6 pacientes, 3,5% da amostra). Poucos trabalhos têm explorado a origem de tais manifestações, mas é possível supor que infecções em centros neurais que controlam acomodação do cristalino (van den Pol et al., 2017) ou ainda o dano direto às estruturas anteriores do olho (Fernandez et al., 2017) possam interferir com a capacidade refrativa.

1. (Tabela 1) Proporções são descritas em porcentagens, relativas ao total da segunda coluna. Em ocasiões onde apenas uma subamostra foi avaliada utilizando uma técnica específica, o tamanho amostral para o achado em particular é indicado na frente do valor de proporção.

Tabela 1 - Resumo da literatura descrevendo achados oftalmológicos relacionados ao ZIKV.

<b>Trabalho</b>	<b>Amostra</b>	<b>Técnicas</b>	<b>Achados clínicos (proporção da amostra)<sup>1</sup></b>
(C. V. Ventura, Maia, Bravo-Filho, et al., 2016)	3 crianças com CZS	Oftalmoscopia de fundo	Manchas focais na mácula (100%); Atrofia coriorretiniana (33%)
(C. V. Ventura, Maia, Ventura, et al., 2016)	10 crianças com CZS	Oftalmoscopia de fundo	Atrofia coriorretiniana e manchas focais na mácula (20%); Alteração no nervo óptico (45%); Alteração nas estruturas anteriores do olho (20%); Nistagmo (10%)
(C. V. Ventura, Maia, Dias, et al., 2016)	Caso único de SCZ	Oftalmoscopia de fundo	Atrofia coriorretiniana em uma criança sem microcefalia.
(de Paula Freitas et al., 2016)	29 crianças com SCZ	Oftalmoscopia de fundo	Manchas focais na mácula (24%); atrofia coriorretiniana (24%); alterações no nervo óptico (14%); Subluxação da lente e coloboma de íris (3%)
(de Miranda et al., 2016)	3 casos de SCZ	Oftalmoscopia de fundo	Manchas focais na mácula (100%); Atrofia coriorretiniana (66%); Desenvolvimento anormal da vasculatura retiniana (66%)
(Freitas et al., 2017)	Caso único de SCZ	Oftalmoscopia de fundo, avaliação oftalmológica clínica	Glaucoma, Atrofias coriorretinianas e manchas focais e em caso de CZS
(C. V. Ventura, Ventura, Bravo-Filho, et al., 2016)	8 crianças com SCZ	Oftalmoscopia de fundo, Tomografia de coerência óptica	Atrofia coriorretiniana (100%) das crianças com atrofias coriorretinianas e/ou manchas focais; Estreitamento da retina (88%); Descontinuação da zona elipsoide (100%)
(Tsui et al., 2018)	224 pacientes com CZS/microcefalia ou confirmação de infecção durante a gestação	Oftalmoscopia de fundo	Anormalidades no nervo óptico (19,6%); Atrofia coriorretiniana (9,8%); Manchas focais (8,9%); Coloboma (0,9%).
(Zin et al., 2017)	112 pacientes com CZS/microcefalia ou confirmação de infecção durante a gestação	Oftalmoscopia de fundo	Microftalmia (1%); Anormalidades de nervo óptico (17%); Atrofias coriorretinianas (5%); Manchas focais (4%); Nistagmo (25%)

## 1.5. O desenvolvimento visual normal no início da vida

Nos primeiros anos de vida, a função visual é limitada por aspectos de natureza óptica (tais como capacidade de acomodação e propriedades refrativas do meio óptico) e pelo grau de desenvolvimento das estruturas do sistema visual relacionadas ao processamento da imagem e da coordenação dos movimentos oculares. Antes de explorar os trabalhos que demonstram perdas visuais em crianças afetadas pela CZS (Sessão 1.6) será aqui apresentada uma breve revisão de certos aspectos da literatura de desenvolvimento visual infantil, tanto sob o ponto de vista morfofisiológico quanto psicofísico. Tais considerações são pertinentes pois, além da interpretação de perdas visuais precisar ser contextualizada dentro do momento específico de desenvolvimento visual do paciente, existe o potencial de que uma determinada manifestação clínica interfira com o curso normal de desenvolvimento, levando a perdas de natureza ambliópica (ou seja secundárias, por interferir com a estimulação visual adequada no início da vida).

Ao nascimento, as células neurais da retina já se encontram diferenciadas das células neurais progenitoras, mas estão em estado imaturo de desenvolvimento. Os cones – fotorreceptores relacionados à visão fotópica, cromática e com alta resolução espacial – estão esparsamente distribuídos na fóvea e possuem no início da vida um segmento externo menor que na idade adulta. Essas características implicam menor absorção da luz e consequente perda na resolução de imagem em comparação com a imagem representada na retina de um adulto. Durante os primeiros meses de vida, um processo de migração celular da periferia para o centro da retina aos poucos concentra uma quantidade maior de cones na fóvea. A densidade de cones na fóveola passa de 18.921 células/mm<sup>2</sup> no nascimento, para 40.794 células/mm<sup>2</sup> aos quinze meses de idade, e ainda para 112.373 células/mm<sup>2</sup> aos 45 meses de idade. No mesmo período, os segmentos externos dos cones, regiões onde acontece a absorção de luz, aumentam de 3,1 µm de comprimento ao nascimento para 21-24 µm aos 15 meses e depois para 37-32 µm aos 45 meses (Yuodelis & Hendrickson, 1986).

O processo de concentração de cones na retina durante os primeiros anos de vida aumenta a capacidade de amostragem da imagem projetada. A distância entre os centros dos cones, na fóvea, corresponde a 2,3 minutos de arco de ângulo visual no recém-nascido, para 1,27 minutos de arco em uma criança de 15 meses de idade, e de 0,58 minutos de arco na retina de um adulto (Banks & Bennett, 1988). Isso implica um aumento da frequência espacial máxima que pode ser amostrada, que é de 15,1 ciclos por grau no recém-nascido, 27,2 ciclos por grau em uma criança de 15 meses de idade, e de 59,7 ciclos por grau no adulto, limites

máximos que na prática não são atingidos quando outras considerações de natureza óptica e neurológica são levadas em conta (Banks & Bennett, 1988).

Em paralelo ao desenvolvimento da retina, as regiões do sistema nervoso central relacionadas ao processamento da informação visual também estão passando por mudanças igualmente rápidas e profundas. O núcleo geniculado lateral (LGN), região que recebe aferências a partir das células ganglionares da retina, chega a dobrar de tamanho nos primeiros 6 meses de vida, atingindo o volume adulto (Garey & de Courten, 1983). O córtex visual, por sua vez, que recebe aferências do LGN, chega a quadruplicar de volume nos primeiros quatro meses de vida, quando também atinge o volume adulto (Garey & de Courten, 1983; Huttenlocher, de Courten, Garey, & Van der Loos, 1982).

Além do aumento no volume dessas regiões, o grau de conectividade entre as células dessas regiões está passando por rápidas mudanças devido aos processos de sinaptogênese e poda sináptica. O número de sinapses do córtex visual cresce vertiginosamente nos primeiros meses de vida, atinge um pico aos 8 meses de idade, e a partir daí começa a decrescer, processo que continua até aproximadamente os onze anos de idade (Huttenlocher et al., 1982). Tal processo de poda sináptica está relacionado à formação de colunas de dominância ocular no córtex visual e ao consequente estabelecimento de circuitos visuais funcionais (Huttenlocher et al., 1982). É durante este processo de poda sináptica que o lobo occipital e boa parte dos lobos temporal e parietal especializam-se para representar em paralelo diferentes aspectos da cena visual (como orientação, cor e movimento) (Bavelier & Neville, 2002; Essen, Anderson, & Felleman, 1992; Wandell, Dumoulin, & Brewer, 2007).

Além do desenvolvimento da retina e das vias visuais principais que possibilitam a amostragem e processamento da informação visual, o sistema oculomotor, que permite a orientação da fóvea para aspectos relevantes da cena visual, encontra-se em rápido processo de desenvolvimento no início da vida. Os movimentos oculares dependem criticamente do colículo superior, que recebe aferências tanto diretamente da retina e do tronco encefálico para respostas de natureza reflexa, quanto indiretamente do córtex (mais especificamente do campo visual frontal) para controle do movimento voluntário (Johnson, 1990). Crianças já nascem com a capacidade de fixar em objetos próximos e realizar movimentos básicos de seguimento; entretanto tais movimentos são sacádicos, atrasados relativos ao estímulo, e tendem a se fixar mais na direção da porção temporal do campo visual. Aos três meses de idade, crianças já apresentam melhoras significativas no movimento de seguimento, começam a realizar movimentos antecipatórios, e tendem a fixar com mais facilidade objetos em todas

as porções do campo visual. Aos seis meses de idade, as crianças já apresentam perfil de movimentos oculares próximo de um adulto, principalmente devido ao desenvolvimento de vias funcionais da área do campo visual frontal (localizada no córtex frontal) para o colículo superior (Johnson, 1990).

Os sistemas neurais envolvidos no reflexo de acomodação (que aumenta o potencial refrativo do cristalino para focar objetos próximos ou o diminui o para focar objetos distantes) também encontram-se em intenso processo de desenvolvimento. Crianças nascem naturalmente com -2 dioptrias de hipermetropia (dificuldade de focar objetos próximos) e limitada capacidade de acomodação no primeiro mês de vida, que melhora consideravelmente e atinge níveis adultos já aos quatro meses de idade (Banks, 1980). Tal melhora parece ter por base o desenvolvimento da capacidade de amostragem da retina e do córtex visual, que diminuem a profundidade de foco mínima necessária para desencadear uma resposta acomodativa (Banks, 1980).

O desenvolvimento dos aspectos anatômicos e fisiológicos do sistema visual nos primeiros meses de vida reflete-se em melhoras significativas nas funções visuais verificáveis por técnicas psicofísicas e eletrofisiológicas. A visão espacial (capacidade de detectar e discriminar mudanças de luminância ao longo de alguma dimensão), em particular, está em intenso processo de maturação no início da vida. Essa função é estudada via apresentação de estímulos de teste que variam em alguma propriedade de interesse como frequência espacial, contraste, orientação ou frequência temporal. É comum o uso de ondas simples senoidais ou quadradas que variam em alguma dimensão, enquanto as demais dimensões são mantidas constantes (cf. Figura 1).

Dois dos principais parâmetros de interesse que permitem quantificar de forma geral a qualidade da função visual são o contraste (diferença de luminância entre os picos e vales do padrão relativo à luminância de fundo), e a frequência espacial (quantidade de ciclos de um padrão contida em uma unidade de grau de ângulo visual). A sensibilidade ao contraste, definida como o inverso do limiar de contraste necessário para se detectar um padrão, geralmente apresenta no início da vida um padrão de função passa baixa: para frequências espaciais baixas, a sensibilidade ao contraste é maior, e à medida que a frequência espacial aumenta, a sensibilidade cai. Ao longo dos três primeiros anos de vida, essa função tanto aumenta seu ganho (há um aumento na sensibilidade ao contraste para todas as frequências espaciais) como também aumenta sua banda de frequências (a frequência máxima que é vista

para um mesmo valor de contraste aumenta), adquirindo uma função com perfil passa banda (Banks & Salapatek, 1981).

Ao fixar o nível de contraste e variar a frequência espacial, é possível determinar a acuidade visual (AV) de grades, isto é, o limiar de detecção de um padrão variando em frequência espacial. A acuidade pode ser medida tanto considerando-se a quantidade de ciclos contidos em um grau de ângulo visual (ciclos por grau de ângulo visual, ou cpg), ou considerando-se o logaritmo do tamanho de uma barra do padrão, ou meio ciclo (logMAR, ou o logaritmo na base 10 do tamanho da barra, medido em minutos de arco). Sabe-se que a acuidade visual aumenta de forma rápida nos seis primeiros meses de vida, e após essa idade aumenta de forma mais branda, até atingir níveis próximos da acuidade adulta por volta de quatro a seis anos de idade (Lewis & Maurer, 2005; Mayer & Dobson, 1982; Teller, McDonald, Preston, Sebris, & Dobson, 1986; Salomão & Ventura, 1995). A acuidade visual média de um recém-nascido é de 0,66 cpg, ao passo em que a de uma criança de 6 meses é de 7,44 cpg, e de uma criança de 36 meses é de 17,82 cpg – um aumento relativo de 27 vezes nesse intervalo de tempo (Salomão & Ventura, 1995). Essas estimativas são realizadas a partir da técnica psicofísica do olhar preferencial, na qual um avaliador apresenta padrões de diferentes frequências espaciais para uma criança e observa quais desses padrões são fixados de forma consistente pela criança. Uma técnica alternativa, o potencial visual evocado de varredura (PVEv) (Norcia & Tyler, 1985) - que se baseia na estimacão da atividade do córtex visual quando padrões similares são apresentados a uma frequência temporal fixa – estima limiares menores que os estimados via técnica de olhar preferencial (provavelmente devido a fatores atencionais e motivacionais inerentes ao exame psicofísico), entretanto o padrão de desenvolvimento da acuidade observado é o mesmo nas duas técnicas (Norcia & Tyler, 1985).

O desenvolvimento pleno da função visual é condicionado à estimulação visual adequada no início da vida, que dirige os processos de sinaptogênese e poda sináptica para a formação de campos receptivos que reflitam diferentes aspectos da cena visual. Quaisquer condições clínicas ou ambientais que interfiram com o período sensível do desenvolvimento dirigido por estimulação visual (Lewis & Maurer, 2005), que compreende os primeiros meses de vida, são particularmente perigosas, pois podem levar a perdas irreversíveis de natureza ambliópica. Fatores de risco como estrabismo, anisometropia (disparidade entre as capacidades refrativas dos dois olhos) e privação da estimulação visual (causada por cataratas, por exemplo) são reconhecidos por causarem perdas visuais irreparáveis se não tratados em idade precoce (E. Campos, 1995).



Estudar funções visuais em crianças antes dois anos de idade é particularmente desafiador devido ao limitado repertório comunicativo dos pacientes, que ainda não desenvolveram (ou estão nos estágios iniciais de desenvolverem) a fala, e também por sua limitada capacidade de manter a atenção em tarefas psicofísicas, que tendem a impor altas demandas atencionais por parte da criança. Tal demanda tem sido minimizada através do desenvolvimento de ferramentas clínicas como os Cartões de Acuidade de Teller (TAC), que dependem menos de apresentações repetidas de um mesmo estímulo e dependem mais de um aproveitamento mais completo da informação fornecida pela criança durante o momento de avaliação, permitindo ao avaliador realizar julgamentos subjetivos sobre o comportamento global da criança após apresentação do estímulo (Teller, Dobson, & Mayer, 2005; Teller et al., 1986).

### **1.6. A função visual de crianças com Síndrome Congênita do Zika**

Infecções virais, como por toxoplasmose, citomegalovírus, varicela-zóster, ou rubéola (Russell-Eggitt & Lightman, 1992) e, mais recentemente, por ZIKV (L. O. Ventura, Ventura, et al., 2017), podem representar um insulto sério ao processo de desenvolvimento neural em geral, e ao desenvolvimento do sistema visual em particular. Como esses danos podem interferir com estruturas críticas que sustentam a função visual, é esperado que funções visuais como a AV estejam comprometidas nesses casos.

Quatro estudos até o presente momento discutiram perdas de função visual em crianças com CZS (Tabela 2). Tais estudos têm explorado com maior foco a acuidade visual (AV), que é uma das funções visuais mais comumente avaliadas clinicamente, e um importante índice da função visual de forma geral. Verçosa et al. (2017) descrevem os achados de um grupo de 70 pacientes com SCZ, 18 dos quais (26%) possuíam algum tipo de anormalidade retiniana similar às descritas anteriormente. Nesse estudo, foi possível avaliar 11 crianças (8 delas com anormalidades oculares, 3 sem anormalidades oculares) com um conjunto do TAC, e todas apresentaram acuidade visual abaixo do esperado para a idade. Os valores de acuidade variaram entre 20/270 (1,13 logMAR) a 20/2700 (2,13 logMAR), que representam perdas da ordem de 1 a 5 oitavas quando comparado aos valores normativos. Duas crianças da amostra responderam a um estímulo luminoso, mas não responderam às grades do teste.

Outro estudo (L. O. Ventura, Ventura, et al., 2017) demonstrou que de um grupo de 31 crianças com CZS testadas, 22 (76% de 25 testadas) apresentaram AV binocular abaixo dos valores normativos. Além de testar a acuidade visual, os autores realizaram uma avaliação da

função visual global utilizando um teste para verificação dos marcos de desenvolvimento visual. Os autores encontraram que 97% das crianças falharam em atingir pelo menos um marco do desenvolvimento, como manter contato visual com um adulto ou alcançar um objeto com as mãos. Ao aplicar um teste clínico de sensibilidade ao contraste (Hiding Heydi), eles encontraram que 20 (65%) não responderam a um estímulo com contraste menor que ou igual a 5%.

L. O. Ventura, Lawrence, et al. (2017) descreveram uma amostra de 60 crianças com CZS, onde todas mostraram desempenho abaixo do limite esperado em valores de AV medida com o Lea Grating Test (um teste de acuidade de resolução similar ao TAC) a uma distância de 30 cm. Neste estudo, em que parte significativa da amostra possuía erros refrativos (39% possuía hiperopia, e 37% possuíam astigmatismo), os autores verificaram que uma correção de +3D dioptrias para todas as crianças melhorou o desempenho das crianças no teste, apesar de ainda ficar abaixo dos valores normativos.

Ao testar a capacidade de pacientes de CZS em fixar o olhar em um padrão gradeado de frequência espacial fixa e segui-lo, Zin et al. (2018) encontraram que das 173 crianças testadas, 30% apresentaram dificuldades de segui-lo. A presença de anormalidades oculares tornava uma criança 44 vezes mais provável de ter dificuldades neste teste, a presença de qualquer dano no sistema visual 64 vezes mais provável, e a presença de nistagmo 120 vezes mais provável. É um achado conhecido que a presença de nistagmo pode prejudicar severamente a função visual em função de efeito de borrão de movimento, que impede a estimulação visual estável de forma adequada durante a fase de desenvolvimento da circuitaria visual (Zahidi, Woodhouse, Erichsen, & Dunn, 2017).

Perdas de função visual em função de danos corticais têm sido hipotetizadas em casos em que há perda visual, mas não há perdas oftalmológicas às quais tais perdas podem ser atribuídas. No estudo de Verçosa et al. (2017) três crianças não apresentaram nenhuma anomalia retiniana, e a despeito disso apresentaram valores de acuidade visual abaixo dos valores normativos e estrabismo, resultados que os autores atribuíram a dano cerebral. L. O. Ventura, Lawrence, et al. (2017) encontraram valores de AV abaixo dos valores normativos, mas apenas 42% delas apresentaram danos retinianos ou do nervo óptico que podem explicar tais perdas. A presença de malformações corticais por todo o cérebro, como lisencefalia, afinamento cortical e calcificações (Soares de Oliveira-Szejnfeld et al., 2016) também pode afetar áreas relacionadas ao processamento visual de alto nível. Infecções causadas por ZIKV têm sido demonstradas em estruturas como no núcleo geniculado lateral, nervo óptico e

colículo superior em modelos experimentais (van den Pol et al., 2017), todas regiões envolvidas no processamento visual ou no controle de movimentos oculares, infecções que poderiam explicar as perdas nesses casos.

Tabela 2 - Resumo da literatura descrevendo perdas de função visual em casos de CZS

<b>Trabalho</b>	<b>Amostra</b>	<b>Técnicas</b>	<b>Achados clínicos (proporção da amostra)</b>
(L. O. Ventura, Ventura, et al., 2017)	32 crianças com SCZ	CAT; Sensibilidade ao Contraste; Marcos do desenvolvimento visual.	Prejuízos na AV (N=30, 73%). Prejuízos na SC (N=20, 65%). Prejuízo em marcos do desenvolvimento (N=31, 97%)
(L. O. Ventura, Lawrence, et al., 2017)	60 crianças com SCZ	Retinoscopia dinâmica, avaliação de fundo, Teste de grades de Lea	Hipo-acomodação (N=21, 81%); Estrabismo (42%); Prejuízos na acuidade visual (100%); Alterações de fundo de olho (52%); Uma correção refrativa de +3D para todas as crianças levou a uma melhora na acuidade visual em 62% dos casos (N=60)
(Verçosa et al., 2017)	70 crianças com SCZ	Oftalmoscopia de fundo, TAC	Alterações oculares (27%); Prejuízos na AV (N=11, 100%)
(Zin et al., 2018)	173 crianças com SCZ ou evidência de exposição durante a gestação	Avaliação oftalmológica; Teste de fixar e seguir padrão gradeado	Problemas das estruturas anteriores (2,3%); Alterações de fundo de olho (26%, N=156) Nistagmo (15.6%); Hiperopia (72.5%) Dificuldade para seguir padrão visual (30%)

## 1.6. Justificativa

No início de 2016 foi estabelecido um protocolo no Hospital Universitário da Faculdade de Medicina de Jundiaí (HU-Jundiaí) para acompanhamento prospectivo de crianças nascidas de mães expostas ao ZIKV durante a gestação, a *Coorte Zika Jundiaí*. Jundiaí é uma cidade próxima à região metropolitana de São Paulo, com aproximadamente 400.000 habitantes e Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) relativamente alto. A cidade, assim como o restante do país, enfrentou uma epidemia de ZIKV entre 2015-2016.

Devido à multiplicidade de formas em que a infecção congênita por ZIKV pode afetar a função visual no início da vida, hipotetizamos que um subconjunto de crianças da coorte nascidas de mães expostas ao vírus durante a gestação pudesse apresentar perdas de AV detectáveis por testes psicofísicos como o TAC. Tais perdas poderiam ter como causa tanto

manifestações clínicas mais proeminentes, como danos na retina detectáveis por oftalmoscopia de fundo, quanto manifestações clínicas mais sutis, como danos neurológicos em regiões afetando áreas relacionadas ao processamento visual de alta ordem, motilidade ocular e capacidade acomodativa.

O presente trabalho insere-se como parte de um programa de acompanhamento do desenvolvimento global das crianças dessa coorte expostas ao ZIKV durante a gestação. Além de realizar uma avaliação inicial de AV na primeira data de encaminhamento para a equipe do Laboratório da Visão – IPUSP, as crianças foram encaminhadas para outras três avaliações de seguimento, de acordo com a disponibilidade das mães. Duas questões motivaram a realização de avaliações de seguimento de AV com as crianças da coorte: (1) Seria necessário confirmar os resultados de avaliações anteriores que pudessem indicar perdas de AV, identificando se tais possíveis perdas se mantivessem consistentes com o tempo; e (2) Seria necessário considerar a possibilidade de que perdas visuais inexistentes próximas do nascimento pudessem aparecer apenas em uma idade mais avançada, ou só então serem passíveis de detecção pelo método psicofísico de olhar preferencial. A motivação principal do presente trabalho foi, portanto, documentar de forma mais completa o desenvolvimento visual de crianças expostas ao ZIKV através da realização de medidas repetidas de acuidade visual durante os dois primeiros anos de vida.

## **1.7. Objetivos**

O presente trabalho tem por objetivo principal verificar se existem perdas de AV em pacientes expostos ao ZIKV durante a gestação (incluindo tanto pacientes que apresentam sinais da CZS quanto aqueles que não apresentam), e qual a gravidade destas potenciais perdas.

O trabalho tem ainda os seguintes objetivos específicos:

a) verificar a prevalência de perdas na AV dentro da população de crianças da Coorte Zika Jundiaí expostas ao ZIKV durante a gestação, relacionado os achados ao contexto nacional de incidência de problemas visuais relacionados à CZS;

b) verificar a evolução das perdas visuais identificadas durante os primeiros 30 meses de vida dos pacientes;

c) relacionar as potenciais perdas visuais ao quadro clínico geral da criança, incluindo a microcefalia, danos oftalmológicos (manchas maculares, atrofia coriorretiniana e anormalidades do nervo óptico), e, quando possível, a achados radiológicos (malformações corticais e calcificações).

## 2. Métodos

### 2.1. Participantes

Participaram do presente estudo mães e crianças acompanhadas pelo projeto Coorte Zika Jundiaí. O protocolo da Coorte Zika Jundiaí previa o recrutamento de dois grupos de mães afetadas pelo ZIKV: (1) Um grupo sintomático, composto por mães que procuraram atenção ambulatorial durante a gestação, apresentaram sintomas consistentes com infecção por ZIKV (como exantemas, febre, artralgia e mialgia), e posteriormente receberam a confirmação da infecção por exame de RT-qPCR ou sorologia; e (2) Um grupo assintomático, que procurou o ambulatório por causas diversas, mas teve também confirmação de exposição ao ZIKV por exame de RT-qPCR. Se alguma mãe alocada no grupo assintomático viesse a apresentar sintomas posteriormente, ela seria realocada para o grupo sintomático. Mães que procuraram o ambulatório e não tiveram confirmação de exposição seguiram no estudo como controles.

Exames de RT-qPCR a partir de amostras de urina e/ou sangue de mães eram realizadas regularmente durante a gestação para verificar a infecção por ZIKV, de acordo com o protocolo descrito por Laciotti et al. (2008; 2016). Testagem sorológica para a presença de anticorpos IgG e IgM contra ZIKV eram também realizadas, e usadas como critério diagnóstico se resultados de RT-qPCR fossem inconclusivos. Amostras das mães para o exame de qRT-PCR foram coletadas na primeira data de encaminhamento ao serviço e então em espaços intervalados de 2-3 meses durante a gestação. Amostras das crianças para o mesmo exame foram também coletadas em um intervalo de 10 dias após o nascimento.

Os pacientes realizaram acompanhamento clínico neonatal por parte da equipe do HU-Jundiaí, tendo suas medidas antropométricas e potenciais manifestações clínicas relacionadas à CZS registradas em uma base de dados. Caso houvesse suspeita de ocorrência de CZS, as crianças eram encaminhadas para exame de Tomografia Computadorizada (CT) e/ou Ressonância Magnética Funcional (MRI). Tanto as crianças expostas e com manifestações clínicas de CZS quanto as crianças expostas e sem manifestações clínicas de CZS foram encaminhadas para avaliação pela equipe do Laboratório da Visão do IP-USP. Tal avaliação compreendeu aspectos oftalmológicos (oftalmoscopia de fundo), psicofísicos (acuidade visual e sensibilidade ao contraste) e do desenvolvimento global da criança (avaliação cognitiva pelas escalas Bayley-III), sendo o foco do presente trabalho apenas o aspecto psicofísico.

Um total de 118 crianças da Coorte Zika Jundiaí realizaram avaliações da AV, cujos resultados apresentados em um trabalho de nosso grupo (Baran et al., em preparação) apontaram para potenciais perdas de acuidade em crianças infectadas. No presente trabalho, são descritos as avaliações de um subconjunto dessas crianças (n=60) cujas mães estavam disponíveis para levar suas crianças para, pelo menos, uma avaliação de seguimento. Devido à disponibilidade das mães para levar suas crianças para avaliação, a idade de encaminhamento variou (Mínimo=1, Máximo=14, Mediana=4 meses) assim como o espaçamento entre as avaliações (Mínimo=1, Máximo=19, Mediana=5 meses). Dentre as 60 crianças na amostra, 25 (42%) completaram as quatro avaliações planejadas, 18 (30%) completaram três avaliações, e 17 (28%) completaram apenas duas avaliações. Tal variabilidade na idade e número total de avaliações repetidas foi considerada na análise através da transformação dos valores de acuidade para escores Z de acordo com os valores normativos, e através do ajuste de um modelo de efeitos mistos nesta escala (ver sessão Análise).

Os pacientes foram subdivididos em três grupos: Um *Grupo Controle* (N=27), um grupo *Exposto ao Zika* (ZE, N=22) e um grupo *Infectado pelo Zika* (ZI, N=11). O grupo controle (N=27) foi composto de crianças nascidas de um subconjunto aleatório das mães registradas na Coorte Zika Jundiaí (N=782). Todas as mães e crianças deste grupo testaram negativo para RT-qPCR, e além disso as crianças apresentaram perímetro cefálico dentro dos valores normativos ao nascimento, e não apresentaram sintomas neurológicos de qualquer etiologia. O grupo controle foi incluído para garantir que as perdas não pudessem ser atribuídas a potenciais diferenças de procedimento e os valores normativos levantados por Salomão & Ventura (1995).

O grupo ZE (N=22) foi composto por crianças cuja confirmação de exposição veio de uma amostra da mãe. Se mães apresentassem pelo menos um resultado positivo no exame de RT-qPCR ou de sorologia dentre todas as avaliações realizadas, e crianças apresentassem um resultado negativo, elas eram alocadas neste grupo. Neste grupo, 19 mães vieram no grupo assintomático, enquanto 3 mães vieram do grupo sintomático. Nenhuma criança neste grupo foi classificada como tendo microcefalia, ou apresentaram achados oftalmológicos ou de neuroimagem.

O grupo ZI (N=11) foi composto por crianças cuja confirmação de exposição veio da criança, ou que apresentassem fortes indícios clínicos de infecção por CZS durante a gestação. Se as crianças apresentassem pelo menos um resultado de qRT-PCR positivo dentro dos dez primeiros dias após o nascimento, crianças eram alocadas neste grupo. Neste grupo, 9 mães

vieram do grupo assintomático, enquanto 1 mãe veio do grupo sintomático. Em 8 casos neste grupo, a confirmação infecção teve por origem amostras de qRT-PCR exclusivamente das crianças, enquanto que em 2 casos, a confirmação de infecção teve por origem amostras tanto da mãe quanto da criança. Em dois casos específicos (crianças 51 e 55 na Tabela 3), a presença de manifestações clínicas foi utilizada como critério classificatório adicional para colocá-las neste grupo. A criança 51 teve confirmação apenas por sorologia IgG para a mãe, e a criança 55 teve confirmação apenas por PCR da mãe. Entretanto, a presença de manifestações clínicas típicas da CZS nestes dois casos permite inferir a ocorrência de processo infeccioso durante a gestação.

No geral, poucas crianças da coorte apresentaram manifestações clínicas da CZS, seguindo um padrão epidemiológico reconhecido no Brasil de relativa baixa incidência no estado de São Paulo e nos estados do Sul do país (Oliveira et al., 2017; Vissoci et al., 2018). Os dois casos supracitados apresentaram, além da microcefalia ao nascimento, pelo menos uma das cinco manifestações clínicas da CZS descritas por Moore et al. (2017), descritas na Tabela 3. Outros quatro casos do grupo ZI (Pacientes 23, 26, 32 e 41, também descritos na Tabela 3) apresentaram microcefalia ao nascimento, mas aos 30 meses de idade apresentaram perímetro cefálico dentro dos valores normativos. Em alguns destes casos, alterações sutis foram identificadas em exame de neuroimagem, mas alterações mais severas como desproporção craniofacial, malformações corticais e calcificações não foram identificadas.

A distinção entre estes três grupos, apesar de permitir identificar crianças infectadas na gestação sem ambiguidade, não elimina a possibilidade que uma criança classificada como ZE seja infectada, pois a amostra (coletada próxima ao tempo de nascimento) pode não conter RNA de ZIKV de uma infecção ocorrendo em uma idade gestacional anterior. Sabe-se que o RNA de ZIKV está presente em amostras de urina apenas por um curto intervalo de tempo de cerca de 15 dias após início da infecção (Gourinat et al., 2015), apesar de que intervalos relativamente mais longos de vários meses terem sido registrados em condições de viremia prolongada durante a gestação (Driggers et al., 2016).

Com exceção das crianças descritas na Tabela 3, os grupos Controle, ZE e ZI não apresentaram diferenças clínicas ou em variáveis antropométricas como o perímetro cefálico ao nascimento. A Tabela 4 apresenta as médias e intervalos de confiança das medidas de perímetro cefálico (expressas em percentis relativos ao padrão Intergrowth) das crianças dos grupos Controle, ZE e ZI, excluindo aqui os casos já apresentados na Tabela 3.

Houve ao todo três pares de gêmeos na amostra (N=6), todos sem manifestações clínicas, que naturalmente foram alocados nos mesmos grupos de acordo com a confirmação da exposição. Crianças nascidas prematuramente (N=9), a grande maioria de idade gestacional entre 35 a 36 semanas ao nascimento, todas sem manifestações clínicas, foram incluídas na amostra, mas tiveram sua idade corrigida para o propósito de comparar sua acuidade aos valores normativos.

O presente trabalho foi realizado com aprovação dos Comitês de Ética da Faculdade de Medicina de Jundiaí (Número de Protocolo 1446577) e do Instituto de Psicologia – USP (Números de Protocolo 67031216.0.00005561 e 68828217.9.0000.5561).



Tabela 3 - Relação dos pacientes do grupo ZI que apresentaram manifestações clínicas consistentes com quadro de CZS.

Identificador do paciente (sexo)	PC <sup>1</sup> ao nascimento (cm / percentil)	Exame de Ultrassom/MRI/CT	Exame oftalmológico
23 (M) <sup>2</sup>	Microcefalia leve (31,0 cm / Percentil 0,59)	Indisponível	Normal AO
26 (M) <sup>2</sup>	Macrocefalia severa (38,0 cm / percentil 99,88)	Dilatação / Ectasia do sistema ventricular	Normal AO
32 (M)	Normal (33,5 cm / percentil 28,74)	Discreta ectasia dos ventrículos laterais	Indisponível
41 (M) <sup>2</sup>	Microcefalia leve (31,5 cm / percentil 3,07)	Indisponível	Normal AO
51 (F) <sup>3</sup>	Microcefalia severa (30,0 cm / percentil 0,07)	Normal	OD: Extensa atrofia coriorretiniana próxima ao complexo papilomacular; OE: atrofia coriorretiniana na região inferior.
55 (F) <sup>3</sup>	Microcefalia severa (29,5 cm / percentil 0,21)	Ventriculomegalia, calcificações periventriculares, lisencefalia, agenesia do corpo caloso	Normal AO

Tabela 4 - Média da medida antropométrica de perímetro cefálico<sup>1</sup> ao nascimento dos pacientes que não apresentaram manifestações clínicas da CZS.

Grupo	PC <sup>1</sup> (Média)	PC (Limite inferior de IC de 95%)	PC (Limite superior de IC de 95%)
Controle	54,73	40,69	68,77
Exposto ao Zika (ZE)	62,64	47,67	77,61
Infectado pelo Zika (ZI)	70,78	35,68	100,0

1. Expresso como percentil (0-100) de acordo com o Padrão Intergrowth, que calcula o perímetro cefálico referente a uma norma que considera idade gestacional e sexo.

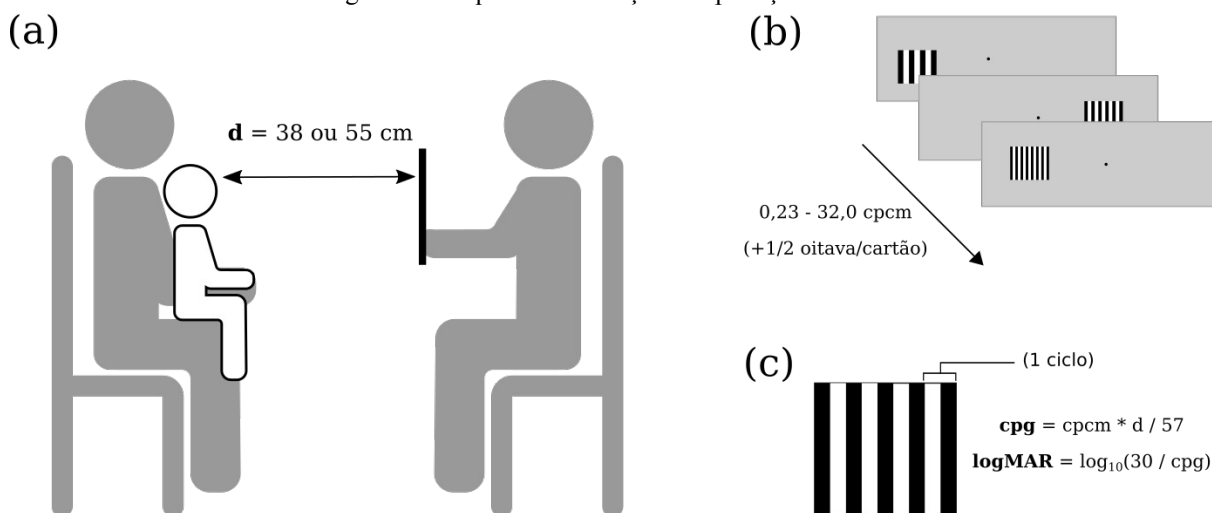
2. Estes 3 pacientes, apesar de apresentarem PC extremo relativo aos valores normativos ao nascimento, apresentaram PC dentro dos valores normativos após 30 meses de idade.

3. Estas 2 pacientes apresentaram PC consistentemente abaixo dos valores normativos até os 30 meses de idade, e além da microcefalia apresentaram pelo menos uma outra manifestação clínica típica da CZS descrita por Moore et al. (2017).

## 2.2. Procedimento

A acuidade binocular foi medida com um conjunto dos Cartões de Acuidade de Teller II (Teller et al., 2005, 1986). O conjunto completo é composto por 16 cartões de 25,5 cm x 55,5 cm, de cor cinza, que contém em um dos lados uma grade preta e branca de alto contraste na forma de listras verticais (Figura 1). A luminância do cinza corresponde à média das luminâncias do preto e do branco. Os cartões contam com uma abertura pequena no centro, para que o avaliador possa verificar a direção do olhar da criança durante o teste. Os cartões possuem grades de diferentes frequências espaciais, a primeira delas de 0,23 cpcm (ciclos por centímetro), e a última 26,0 cpcm. Os cartões intermediários possuem um intervalo de frequência de aproximadamente 1/2 oitava (isto é, a frequência espacial aumenta aproximadamente 50% a cada cartão). A técnica do TAC está sumarizada na Figura 1.

Figura 1 - Esquema da situação de aplicação do TAC.



(a) O avaliador senta de frente para a criança mostrando os cartões a uma distância de 38 cm (para crianças mais novas de 6 meses) ou 55 cm (para crianças mais velhas de 6 meses). (b) A frequência espacial da grade impressa na frente dos cartões varia de 0,23 ciclos por centímetro (cpcm) até 26 cpcm entre os 16 cartões do conjunto, que são espaçados  $\frac{1}{2}$  oitava entre si. (c) O cálculo do valor de acuidade (em logMAR) considera a distância à qual a criança estava do cartão e a frequência espacial das grades. O limiar é determinado como a média das três últimas reversões entre cartões vistos e não vistos.

Durante o momento da avaliação, as crianças permaneceram sentadas junto à mãe e de frente para o avaliador, a uma distância de 38 cm para crianças menores de 6 meses de idade, e a uma distância de 55 cm para crianças com idade maior ou igual a 6 meses. Em seguida, o avaliador começava a apresentar os cartões de acuidade, começando de uma frequência espacial mais baixa, e incrementando o valor de frequência espacial a cada apresentação. O

cartão inicial escolhido ao início da avaliação possuía frequência espacial variando de 0,86 cpcm até 3,2 cpcm de acordo com a idade da criança. O examinador, cego para o lado ao qual a grade está posicionada, realizava uma série de apresentações do mesmo cartão, e então realiza o julgamento sobre qual lado do cartão o padrão está localizado, a partir de pistas no comportamento do bebê, como direção do olhar e orientação da cabeça. Em ocasiões nas quais o bebê pode entender instruções verbais básicas (depois de 24 meses de idade), uma estratégia de olhar preferencial operante foi adotada (Mayer & Dobson, 1982), e era pedido às crianças para que apontassem para o padrão de grade. Quando o examinador estava pronto para realizar um julgamento sobre o lado da grade, ele sinalizava o lado percebido para um segundo examinador posicionado atrás da criança, que confirmava se o lado percebido estava correto ou não. Dois examinadores realizaram o procedimento, revezando-se nos dois papéis.

O segundo examinador, posicionado fora do campo visual da criança, informava ao primeiro se sua escolha do lado do padrão estava correta ou não. Caso estivesse, o primeiro avaliador aumentava a frequência espacial da apresentação seguinte, e caso não estivesse, o avaliador diminuía a frequência espacial, em um procedimento psicofísico de escada. O intervalo regular entre as apresentações durante o procedimento é de um cartão (meia oitava). Se no começo de um exame o examinador suspeitasse que qualquer cartão poderia estar muito acima do limiar da criança, optava-se por diminuir a frequência espacial em uma oitava inteira (dois cartões). O critério para finalizar um exame era o término de, pelo menos, três reversões, isto é, passagem de um cartão de uma dada frequência espacial para um cartão de frequência espacial mais alta, ou vice-versa. O limiar de acuidade visual era então estimado como a média geométrica das três últimas reversões. Considerando a distância da criança para o cartão apresentado, os valores eram convertidos de cpcm para logMAR utilizando a regra de conversão reproduzida no painel (c) da Figura 1.

### **2.3. Análise de dados**

Os valores de acuidade foram comparados com as normas estabelecidas por Salomão & Ventura (1995) para verificar possíveis desvios da trajetória esperada de desenvolvimento visual. Para modelar estes desvios de forma relativa aos valores normativos, os valores de acuidade foram expressos de forma relativa à média esperada para a idade e normalizados de acordo com desvio-padrão esperado para a idade (ou seja, foram transformados em escores Z) de acordo com a expressão:

$$z_{it} = \frac{m_t - y_{it}}{\sigma_t} \quad (1)$$

Onde  $z_{it}$  é a acuidade (em escores Z) do indivíduo identificado pelo índice  $i$  aos  $t$  meses de idade,  $m_t$  é a média de AV esperada para a idade  $t$  (em logMAR), extraída da Tabela 1 de Salomão & Ventura (1995),  $y_{it}$  é a acuidade medida no exame, expressa em logMAR, e  $\sigma_t$  é o desvio-padrão esperado para a idade  $t$ , calculado como metade do intervalo entre  $m_t$  e o limite de tolerância inferior, também extraído da Tabela 1 de Salomão & Ventura (1995).

Um paciente pode ser classificado como tendo perda de acuidade visual caso apresente acuidade visual pelo menos meia oitava (um cartão, ou 0,15 logMAR) abaixo dos valores normativos de forma consistente (ou seja, em duas ou mais avaliações) ou caso apresente acuidade visual uma oitava (dois cartões, ou 0,3 logMAR) abaixo dos valores normativos em uma única avaliação (Teller et al., 2005). Na presente escala, perdas de acuidade visual podem então ser definidas como valores que se apresentem consistentemente abaixo de -2 escores Z, e valores de acuidade consistentes com os valores normativos são aqueles situados em uma faixa entre -2 e 2 escores Z, independente da idade da criança.

Para explorar a possibilidade que o valor médio de AV dos grupos de crianças expostas ao ZIKV (ZE ou ZI) poderia ser mais baixo que os valores esperados na ausência de dano retiniano ou outros sintomas de CZS, um modelo linear foi ajustado considerando confirmação de exposição ao ZIKV (através de uma amostra da mãe ou criança) como uma variável explanatória e a acuidade (convertida para escores Z) como uma variável dependente. Para levar em conta correlações entre as medidas repetidas de um mesmo paciente, um modelo de efeitos mistos (Laird & Ware, 1982) foi utilizado. Nesta formulação, a AV média de cada indivíduo entre as diferentes avaliações é expressa de forma aninhada sobre a média geral do grupo, definida pelo status de exposição ao ZIKV (ou seja, Controle, ZE ou ZI). Os resultados de tal modelo são reportados como a estimativa de máxima verossimilhança e os respectivos intervalos de confiança de 95% das médias estimadas para cada grupo. O pacote R lme4 foi utilizado para estimação dos coeficientes (Bates, Mächler, Bolker, & Walker, 2015).

O modelo completo pode ser expresso como:

$$y_{it} = x_0\beta_0 + x_1\beta_1 + x_2\beta_2 + b_i + \epsilon_{it} \quad (2)$$

Onde:

$y_{it}$  É a acuidade prevista para o indivíduo  $i$  no momento de avaliação  $t$  ;

$x_j$  É a variável indicadora de pertencimento do indivíduo  $i$  ao grupo  $j$  ;

$\beta_0$  É a acuidade média do grupo controle;

$\beta_1$  É a acuidade média do grupo ZE e;

$\beta_2$  É a acuidade média do grupo ZI;

$b_i \sim N(0, \sigma_b I)$  É um coeficiente de efeitos aleatórios, cuja média é zero e cuja realização captura o desvio do indivíduo  $i$  relativo à média de seu grupo;

$\epsilon_{it} \sim N(0, \sigma_{it})$  É o erro residual que captura o desvio da avaliação realizada no momento  $t$  relativo à média do indivíduo  $i$  .

A formulação de modelos mistos permite capturar correlações entre as medidas repetidas de um mesmo participante adicionando um parâmetro de posição específico para cada participante ( $b_i$ ), condicionado ao qual as amostras podem ser consideradas como independentemente distribuídas. Relativo a modelos separados em dois passos (isto é, ajustar regressões individuais para cada participante e então realizar uma regressão nestes valores), a abordagem de efeitos mistos é demonstravelmente mais eficiente, apresentando convergência mais rápida para as estimativas dos coeficientes fixos e menor erro nas estimativas (Efron & Morris, 1977; Laird & Ware, 1982).

Além de reportar as estimativas de máxima verossimilhança e os intervalos de confiança das médias de cada grupo, foi realizada a comparação do poder explanatório das variáveis indicadoras do grupo (ZE e ZI) utilizando o teste de razão de verossimilhança. Tal teste foi contruído a partir da comparação do modelo expresso pela Equação 2 com o modelo nulo expresso abaixo, que ignora as variáveis indicadoras de grupo:

$$y_{it} = \beta_0 + b_i + \epsilon_{it} \quad (3)$$

Onde  $\beta_0$  é a acuidade média global, e as demais variáveis são as mesmas da Equação 2. A estatística da razão de verossimilhança foi considerada significativa ao atender o critério de ser maior que o limite de tolerância de falsos positivos, fixado no valor usual de  $\alpha=0.05$  (teste de hipótese unilateral tomando por base a distribuição Chi-quadrado seguida pela estatística).

Duas crianças (pacientes 51 e 55 citadas anteriormente) apresentaram sintomatologia mais grave, muito diversa do restante do grupo ZI, portanto foram excluídas do modelo. Como a prevalência desses casos foi pequena na Coorte Zika Jundiaí, a condição clínica e AV dessas duas pacientes foram reportadas e discutidas individualmente, ao invés de serem incorporadas ao modelo como uma variável explanatória adicional.

### 3. Resultados

#### 3.1. Acuidade dos pacientes dos grupos Controle, ZE ou ZI livres de sintomas ou com sintomas sutis

A Figura 2 mostra as trajetórias de desenvolvimento para as crianças do grupo Controle (Painel superior) e dos grupos ZE e ZI (Painel inferior). As crianças que não apresentaram nenhum sintoma clínico que pudesse ser relacionado à CZS estão representadas graficamente por pontos e linhas claros, e as crianças que apresentaram sintomas clínicos estão representadas por pontos e linhas escuros e identificadas com seus respectivos identificadores (Tabela 3). Os valores são representados contra uma faixa cinza-claro que representa os valores normativos de acuidade visual levantados por Salomão & Ventura (1995). Os valores de acuidade para os três grupos estão também representados graficamente nas Figuras 3 e 4, onde foram expressos em escala de escore Z (Equação 1) e também separados por momento da avaliação. Os mesmos valores normativos estão representados nesta figura por uma faixa cinza-claro, que naturalmente cobre o intervalo de -2 a 2 escores Z.

Crianças no Grupo Controle, em geral, apresentaram AV consistente com os valores normativos. Três avaliações isoladas no grupo controle resultaram em medidas de AV um pouco abaixo do limite inferior (menores que meia-oitava, equivalente a um cartão do conjunto). Como estas AVs abaixo das normas não foram confirmadas em avaliações posteriores, não é possível afirmar que essas crianças estejam com AV abaixo do esperado. Estas pequenas discrepâncias em avaliações isoladas são provavelmente devidas a condições de testagem não-ideais. O Grupo Controle apresentou como um todo AV média de -0.142 escores Z (IC = [-0,438, 0,152]) (Tabela 5 e Figura 5), em concordância com os valores normativos levantados por Salomão & Ventura (1995).

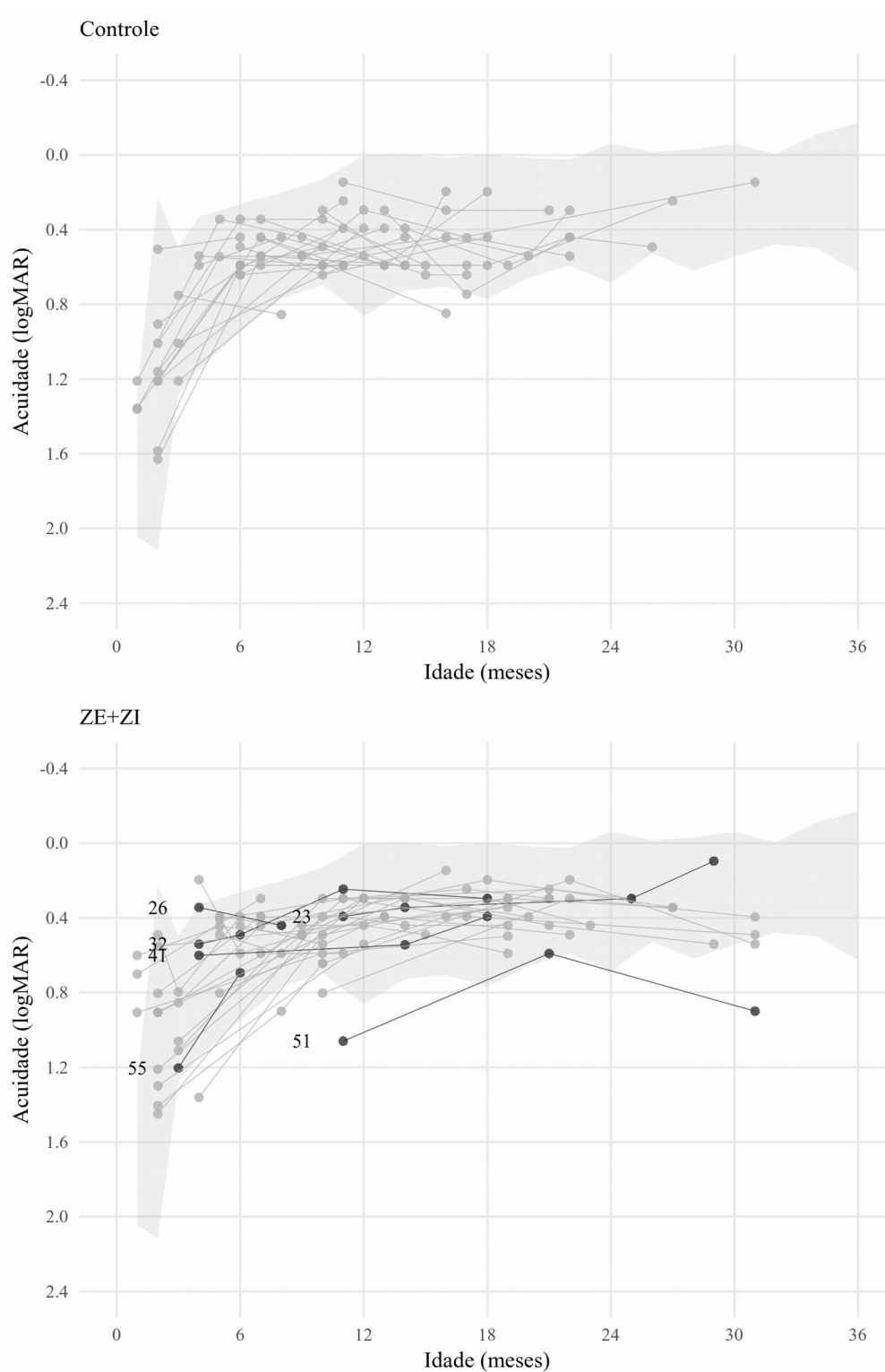
O painel inferior da Figura 2 e a Figura 3 mostram o curso de desenvolvimento de crianças dos grupos ZE e ZI. As crianças que apresentaram qualquer manifestação clínica de CZS estão representadas pelos identificadores da Tabela 3. A AV média do grupo ZE foi de 0,135 escores Z (IC = [-0,181, 0,453]) e do grupo ZI de 0,401 (IC = [-0,122, 0,924]), valores que, assim como do Grupo Controle, estão de acordo com os valores normativos (Tabela 5 e Figura 5). Em três crianças do grupo ZE, foram identificadas avaliações isoladas cujos valores medidos estavam do limite esperado. Duas dessas avaliações representaram diferenças menores que uma oitava que não se confirmaram em avaliações posteriores, não sendo

portanto evidência suficiente de perda de AV. Tais perdas, assim como as encontradas no grupo controle, podem ser atribuídas a condições não-ideais de avaliação. Em um caso, foi identificada uma perda maior que uma oitava (dois cartões), e em uma terceira avaliação foi encontrado um valor de AV limítrofe. Será necessário continuar seguindo o desenvolvimento visual dessa criança a longo prazo; entretanto a ausência de outros prejuízos clínicos e da confirmação de infecção da criança tornam desafiadora a possibilidade de atribuir tais perdas à infecção por ZIKV. Dentre as crianças do grupo ZI que não mostraram sintomas clínicos, não houveram avaliações abaixo dos limites de tolerância para a idade.

Foi realizado um teste de razão de verossimilhança comparando o modelo completo que considera a situação de exposição como variável preditora (Equação 2) a um modelo nulo que não a considera (Equação 3). O resultado de tal teste sugere que o grupo ao qual a criança pertence (Controle, ZE ou ZI) não pode ser considerado como variável relevante para prever o desempenho médio da AV expressa em escores  $Z$  ( $\chi^2=1.77$ ;  $DF=2$ ;  $p=0.413$ ). O teste, entretanto, exclui os dois casos que apresentaram sintomatologia mais severa, e que não puderam ser incluídos no modelo por ocorrerem em quantidade pequena na amostra. Estes dois casos são descritos na sessão seguinte.



Figura 2 - Trajetórias de desenvolvimento da AV dos três grupos.



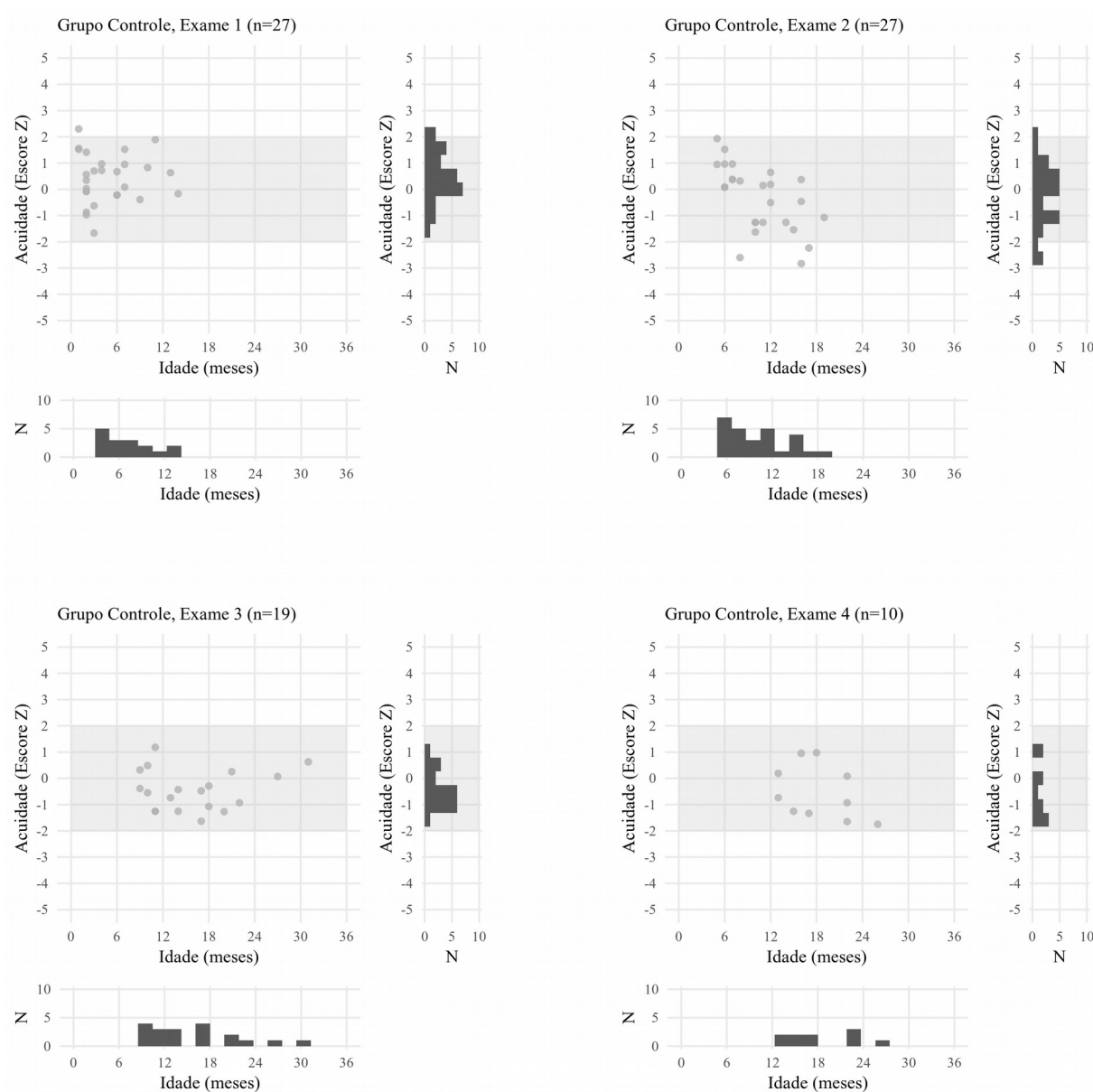
O painel superior apresenta as trajetórias do grupo Controle, e o painel inferior apresenta as trajetórias dos grupos ZE e ZI, com destaque para as crianças do grupo ZI que apresentaram sintomas clínicos de CZS (marcadas com os identificadores da Tabela 3).

### 3.2. Acuidade dos pacientes do grupo ZI com sintomas graves

As duas crianças da amostra que apresentaram, além da microcefalia ao nascimento, sintomas neurológicos ou oftalmológicos mais característicos da CZS, as pacientes 51 e 55, estão com suas trajetórias de desenvolvimento identificadas por estes números nas Figuras 2 (em logMAR) e 4 (em escores Z). A paciente 51, única criança da amostra que apresentou atrofia coriorretinianas similares às anteriormente identificadas na literatura (C. V. Ventura, Maia, Ventura, et al., 2016) apresentou valores de VA de 1,0 logMAR aos 11 meses de idade (-4,6 escores Z); de 0,6 logMAR aos 21 meses de idade (-1,58 escores Z) e de 0,9 logMAR (-4,4 escores Z) aos 31 meses de idade. Tais perdas podem ser consideradas significativas considerando a orientação da metodologia do TAC, que sugere definir perdas visuais como pelo menos meia oitava (um cartão) consistentemente abaixo dos limites inferiores (Teller et al., 2005). Os valores medidos por esta criança estiveram pelo menos uma oitava (dois cartões) abaixo desse limite na primeira e última avaliações.

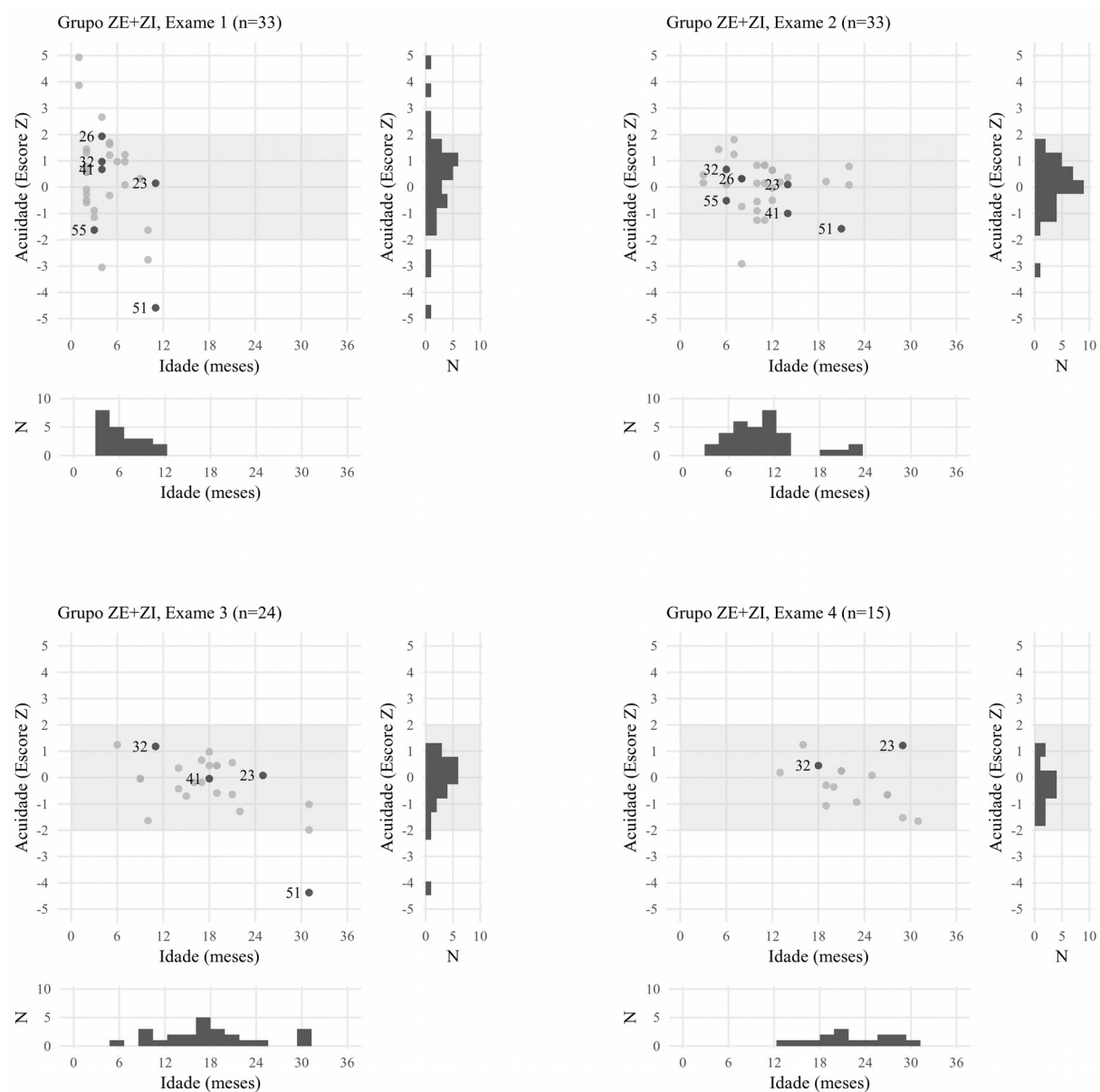
A paciente 55, apesar de não ter apresentado manifestações oftalmológicas, nasceu com microcefalia severa (persistente até os 30 meses de idade, assim como a paciente 51), e possui malformações corticais e calcificações identificadas em exames de tomografia computadorizada. Em avaliações de seguimento, foi identificado que a criança apresenta e está sendo tratada para convulsões, que é um sintoma presente em alguns casos de CZS. Esta criança apresentou acuidade de 1.2 logMAR na primeira avaliação aos 3 meses de idade (-1.6 escores Z) e de 0.7 logMAR na segunda avaliação aos 6 meses de idade (-0.5 escores Z). Apesar de estar dentro dos valores normativos, portanto não podendo ser caracterizada como tendo perdas de AV, a avaliação realizada na primeira ocasião se mostrou em valor limítrofe, estando abaixo do 10º percentil dentro das avaliações realizadas em toda a amostra da coorte Zika Jundiáí. A criança não esteve disponível para realizar avaliações de seguimento a longo prazo após o primeiro ano de idade para confirmar se seu desempenho se manteve dentro dos valores normativos.

Figura 3 - AV do Grupo Controle, normalizada e separada por momento da avaliação.



Os limites de normalidade (Figura 2) estão aqui também re-expressos na mesma escala, que por definição cobrem o intervalo de -2 a +2.

Figura 4 - AV dos Grupos ZE e ZI, normalizada e separada por momento da avaliação.



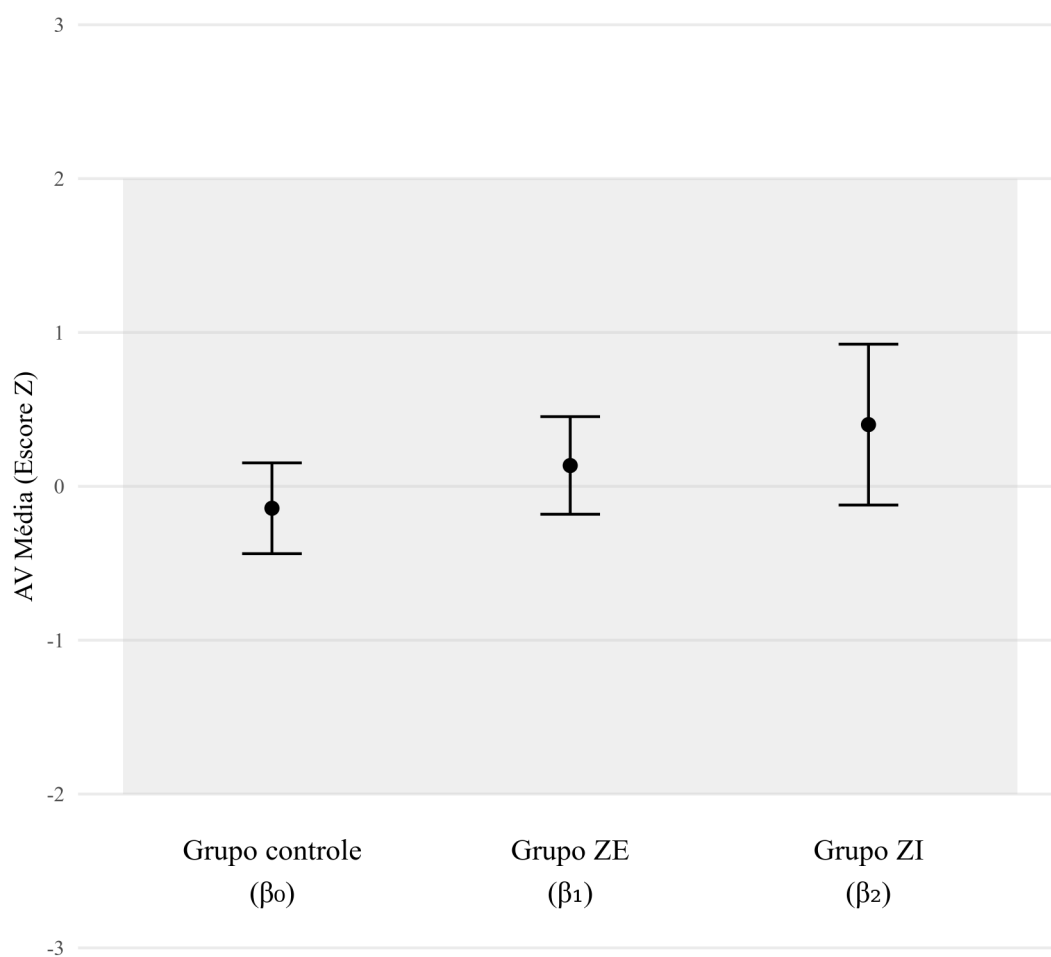
As crianças da amostra que apresentaram sintomas clínicos de CZS estão também aqui destacadas em cores mais escuras e com seus identificadores da Tabela 3.

Tabela 5 - AV média (expressa em escores Z) dos três grupos.

<b>Coefficiente<sup>1</sup></b>	<b>AV (Média)</b>	<b>AV (Limite inferior de IC de 95%)</b>	<b>AV (Limite superior de IC de 95%)</b>
Controle ( $\beta_0$ )	-0,142	-0,438	0,152
Grupo ZE ( $\beta_1$ )	0,135	-0,181	0,453
Grupo ZI ( $\beta_2$ )	0,401	-0,122	0,924

1. Estimados de acordo com o modelo expresso na Equação 2.

Figura 5 - AV média dos três grupos.



A AV está expressa como a estimativa pontual de máxima verossimilhança e acompanhadas dos intervalos de confiança (cf. Tabela 5). Os limites de normalidade (Figura 2) estão aqui também expressados na mesma escala. Nenhum dos coeficientes diferiu significativamente do valor 0 de linha de base, sugerindo ausência de efeitos do ZIKV sobre a AV do grupo como um todo.

## 4. Discussão

### 4.1. Resultados da avaliação de AV e sua relação com manifestações clínicas potencialmente ligadas à CZS

Os mecanismos pelos quais a infecção congênita por ZIKV pode interferir com a função visual em crianças que apresentam quadro de CZS são vários: (a) Infecção direta de células retinianas, levando conseqüentemente à formação de manchas focais pigmentadas na mácula e atrofia coriorretinianas; (b) Malformações das estruturas anteriores do olho, levando a manifestações como microftalmia e coloboma da íris; (c) Prejuízos refrativos (principalmente a hipermetropia) devido a reduzida capacidade acomodativa ou dano em estruturas centrais relacionadas a acomodação; (d) Problemas de motilidade ocular, resultantes da infecção de centros neurais que levam ao controle dos movimentos oculares, ou (e) prejuízos diretos nas estruturas do sistema nervoso central relacionadas à visão.

Uma pequena proporção de crianças infectadas por ZIKV durante a gestação pode desenvolver CZS e apresentar sintomas sutis a ponto de não serem detectáveis por exame físico após o nascimento (Rice et al., 2018). Como a prevalência de tais casos é desconhecida, no presente trabalho realizamos o exame de AV de crianças da Coorte Zika Jundiáí cujas mães estiveram disponíveis para levar suas crianças para pelo menos uma avaliação de seguimento. A AV dos grupos Controle, ZE e ZI esteve, no geral, dentro dos limites de normalidade para o TAC, com exceção (potencial) de uma criança do grupo ZE que não apresentou sintomas clínicos, e de duas crianças do grupo ZI que apresentaram sintomas clínicos considerados graves. Como discutido anteriormente, a interpretação da possibilidade de atribuir as perdas desta única paciente do grupo ZE à infecção por ZIKV é desafiadora, pois a única evidência de infecção é o exame de RT-PCR positivo da mãe. O monitoramento da função visual desta criança enquanto ela entra em idade pré-escolar e a realização de diagnóstico diferencial podem ajudar a esclarecer esta questão.

Duas crianças do grupo ZI foram identificadas com microcefalia severa ao nascimento (pacientes 51 e 55), que persistiu pelo menos até os 30 meses de idade. Além disso, essas crianças apresentaram achados de neuroimagem e oftalmológicos característicos de quadro de CZS. A presença de atrofia coriorretinianas binoculares na paciente 51 é muito provavelmente a razão principal por trás das perdas de altas magnitudes identificadas para este caso. Tais perdas, da ordem de uma oitava (dois cartões) foram da mesma ordem de

magnitude que alguns casos similares previamente descritos na literatura (Verçosa et al., 2017). A realização de múltiplas avaliações com esta criança ofereceu ainda a oportunidade de avaliar o quanto estas perdas se mantiveram estáveis com o tempo. Foi identificada alta variabilidade entre as avaliações 1 e 2 e entre as avaliações 2 e 3, próxima de 1 oitava, que é o limite máximo descrito para situações de reteste do TAC (Harvey, Dobson, Tung, Quinn, & Hardy, 1999). Tal alta variabilidade pode ter sido função da influência de fatores atencionais e motivacionais durante a avaliação. Apesar dessa variabilidade, não foi constatado um aumento no valor medido a ponto de situar esta criança dentro dos limites de normalidade. Em todas as avaliações com esta criança, o valor de AV medido esteve sempre abaixo do 10º percentil quando comparado com todas as avaliações realizadas para a amostra, o que pode sugerir prejuízos a longo prazo no desenvolvimento da função visual.

A paciente 55 não apresentou danos oftalmológicos, mas apresentou malformações corticais globais e presença de calcificações. O grau com que tais problemas estruturais podem afetar a função visual desta paciente, entretanto, não está tão claro. O valor de AV medido para esta paciente esteve dentro dos valores normativos nas duas ocasiões em que foi avaliada, portanto não podem ser tomados como evidência de perdas visuais. Este resultado contrasta, por exemplo, com três casos reportados por Verçosa et al. (2017) nos quais crianças com CZS não possuíam danos retinianos, mas possuíam outras manifestações da CZS, e registraram valores de AV abaixo dos limites de normalidade. Apesar da aparente normalidade no desenvolvimento da função visual desta criança, na primeira avaliação, o valor esteve abaixo do 10º percentil entre todas as avaliações realizadas. Acompanhamento do desenvolvimento visual dessa criança a longo prazo é necessário para garantir que sua AV esteja de fato dentro dos valores normativos, e quaisquer intervenções oftalmológicas que venham a se mostrar necessárias sejam realizadas.

Duas crianças do grupo ZI foram identificadas como tendo microcefalia leve ao nascimento, mas valores de perímetro cefálico normal aos 30 meses de idade (pacientes 23 e 41). Uma foi identificada como tendo macrocefalia ao nascimento, mas valores de perímetro cefálico normal aos 30 meses de idade (paciente 26), e em outra criança foi identificada uma sutil alteração em exame de tomografia computadorizada, apesar de o perímetro cefálico estar dentro dos valores normativos ao nascimento. Essas crianças registraram valores de AV dentro dos valores normativos em todas as ocasiões em que foram avaliadas. O perfil dessas crianças em muito difere dos casos de CZS previamente reportados (C. A. Moore et al., 2017; van der Linden et al., 2016), não apresentando evidências de malformações que atingissem as

estruturas centrais para processamento da informação visual, e nem evidências de danos oftalmológicos, o que pode explicar os valores de AV dentro da normalidade.

A pequena amostra de crianças afetadas pela CZS na Coorte Zika Jundiaí reflete a baixa incidência geral de casos de CZS em São Paulo e em estados da região Sul (Oliveira et al., 2017; Vissoci et al., 2018), apesar de a epidemia de ZIKV ter ocorrido em todo o país (Ministério da Saúde, 2018a, 2018b). Nesta pequena amostra, pudemos identificar com certeza, dentre os fatores causadores de perdas visuais, apenas a presença de atrofia coriorretiniana em uma criança. A presença de malformações atingindo regiões centrais relacionadas ao processamento da informação visual ainda permanece como uma hipótese para o outro caso identificado.

Um número de diferentes hipóteses podem ser levantadas sobre os fatores por trás da relativamente baixa prevalência de sintomas de CZS e consequentes perdas visuais na amostra estudada quando comparada, por exemplo, aos altos números de casos identificados na Região Nordeste (de Paula Freitas et al., 2016; C. V. Ventura, Maia, Ventura, et al., 2016) ou mesmo no Rio de Janeiro (Zin et al., 2018). Estes fatores podem envolver, por exemplo, diferenças nas condições de saneamento que podem propiciar a proliferação do vetor transmissor; diferenças devido a fatores de vulnerabilidade no hospedeiro que sejam compartilhados em larga escala pelas duas populações, seja de origem genética (Caires-Júnior et al., 2018) ou imunológica (Dejnirattisai et al., 2016); ou mesmo diferenças genéticas do agente viral presente em maior proporção em cada região (Zhang et al., 2017).

## **4.2. Limitações**

A principal limitação do presente trabalho é a reduzida amostra de crianças clinicamente afetadas (N=2), o que implica em capacidade limitada de realizar inferências sobre os possíveis resultados de acuidade de crianças que apresentaram achados neurológicos e oftalmológicos. Mesmo estudos que trabalharam com uma amostra maior de crianças com CZS encontraram valores de AV extremamente variados, resultado da sintomatologia heterogênea da CZS (Verçosa et al., 2017). Apesar de ser possível agrupar crianças apresentando uma manifestação específica (por exemplo, atrofia coriorretiniana) estas tendem a apresentá-la de forma singular, dificultando a realização de desenhos experimentais cujo objetivo é a busca de efeitos detectáveis em grupos de pacientes. Como a principal proposta do presente estudo é a de avaliar potenciais perdas de forma prospectiva, buscando detectar a prevalência (e natureza) das perdas visuais dentro da população da Coorte Zika



Jundiaí, cujo critério de encaminhamento foi apenas ter apresentado evidência de infecção por ZIKV durante a gestação, tal limitação não se aplica de forma geral, mas apenas ao objetivo específico (c) proposto anteriormente.

Além da limitação de tamanho amostral, outra limitação que pode ser apontada se deve à aplicabilidade da metodologia de olhar preferencial às duas crianças da amostra com problemas neurológicos. Em crianças sem sintomas clínicos, a precisão das estimativas de AV realizadas com o TAC permanece de 0.5 a 1 oitava quando se comparam avaliações com uma mesma criança em diferentes ocasiões (Teller et al., 2005). Em situações em que as crianças possuem achados neurológicos, como dois casos de CZS em nossa amostra, tal precisão pode ser mais desafiadora de atingir em função da dificuldade da criança de manter a atenção na tarefa, de colaborar com a situação de testagem, ou mesmo da presença de disfunções oculomotoras como estrabismo e nistagmo. Apesar de existirem diretrizes sobre como proceder nestas situações e haver consenso de que o TAC é aplicável nesses casos (Teller et al., 2005; Trueb, Evans, Hammel, Bartholomew, & Dobson, 1992), seu uso não tem sido tão amplamente validado quanto na situação de crianças livres de manifestações neurológicas. Nestas situações, técnicas como o Potencial Visual Evocado de Varredura (Norcia & Tyler, 1985) podem demonstrar maior capacidade de separar a AV de outras variáveis que podem interferir com o exame, como capacidade de manter atenção sustentada na tarefa ou presença de disfunções oculomotoras.

### **4.3. Direções futuras de pesquisa**

A literatura tem apontado de forma reiterada para um quadro da CZS caracterizado por sintomatologia extremamente diversa tanto do ponto de vista morfológico quanto funcional (Aragao et al., 2016, 2016; C. A. Moore et al., 2017; Soares de Oliveira-Szejnfeld et al., 2016), observação que também é aplicável ao domínio da função visual (L. O. Ventura, Ventura, et al., 2017; Verçosa et al., 2017; Zin et al., 2018). Tal quadro precisa se refletir nos desenhos experimentais para se estudar a condição. Estudos de caso que focuem em estudar de forma detalhada casos específicos têm portanto grande potencial para complementar estudos de grupo como o presente trabalho, principalmente do ponto de vista da precisão das informações clínicas. No presente trabalho, foi possível agrupar crianças em dois grupos principais (ZE e ZI) e realizar procedimentos de inferência sobre os valores de AV médios desses grupos, devido à suposição básica de que esses grupos compartilhem de uma característica em comum, que é a ausência de sintomas clínicos severos. Tal abordagem pode não ser aplicável quando um número maior de casos de CZS é considerado, pois os fatores

determinantes das perdas de AV podem ser vários e existir em vários graus, e o desempenho médio pode não refletir acuradamente o quadro clínico de cada paciente. Dada essa consideração, uma proposta de continuidade do presente estudo é a de avaliar de forma mais detalhada as duas crianças para as quais perdas visuais foram identificadas.

Além da AV, a avaliação da sensibilidade ao contraste pode indicar de forma mais completa a qualidade da função visual em quadros clínicos. Em certos quadros de ambliopia, por exemplo, as perdas são melhor caracterizadas como reduzida sensibilidade ao contraste em bandas de frequência específicas (E. Campos, 1995; Hess R. F., Bradley Allan, Piotrowski L., & Campbell Fergus William, 1983). Além disso, perdas no processamento visual de alta ordem podem ser avaliadas utilizando diferentes parâmetros em testes de acuidade empregando otótipos (E. Campos, 1995), ou mesmo em testes de hiperacuidade (Levi & Klein, 1982). Na medida em que a população afetada por CZS atinja idades nas quais tais exames sejam aplicáveis, sua realização pode oferecer uma melhor compreensão do padrão de perdas visuais relacionadas a essa síndrome e, mais importante, pode oferecer um prognóstico mais preciso das limitações e potencialidades das diferentes manifestações clínicas da síndrome, que podem exigir manejo clínico individualizado.

Um refinamento metodológico já apontado na Sessão 4.2 é o emprego de técnicas de eletrofisiologia visual (Norcia & Tyler, 1985) com esta população. Os limares calculados pela técnica de PVE dizem respeito à capacidade do paciente de resolver padrões até o nível do córtex visual primário, sendo quaisquer prejuízos no limiar calculado por esta técnica diretamente atribuíveis a fatores como capacidade de refração, amostragem da imagem na retina e organização dos campos receptivos no córtex visual. A técnica de PVE leva a estimativas de AV mais altas que as técnicas de olhar preferencial em crianças sem manifestações clínicas (Dobson & Teller, 1978), refletindo em parte características da estimulação utilizada, e em parte a menor exigência de circuitos neurais relacionados à capacidade de realizar respostas coordenadas à estimulação visual (exigidas no teste psicofísico). O tamanho da diferença dos valores estimados pelas duas técnicas em crianças com manifestações neurológicas, como as presentes na CZS, ainda não foi extensivamente explorado, mas pode ser usado como um indicador do grau de prejuízo no desenvolvimento do córtex cerebral e componentes do sistema oculomotor e de acomodação. Estudos que se proponham a avaliar essa diferença podem ser úteis, por exemplo, para informar em que medida a função visual é limitada por aspectos comportamentais que possam ser alvo de intervenção.

O objetivo para a avaliação da AV e de outras funções visuais básicas em contexto clínico é oferecer informação relevante para o diagnóstico, acompanhamento, tratamento e consequente melhoria da qualidade de vida dos pacientes afetados. Nesse sentido, a avaliação de limiares sensoriais da AV e das demais funções visuais precisa ser complementada com medidas funcionais, que objetivem prever em que medida as potenciais perdas identificadas por métodos psicofísicos impactam a vida do paciente. No contexto da oftalmopediatria, uma série de ferramentas têm sido desenvolvidas para tal propósito (Brandão et al., 2017). Ventura et al. (2017), por exemplo, utilizaram o *Parents and Their Infants with Visual Impairments* (PAIVI) de forma complementar à avaliação da AV em casos de CZS, encontrando que todas os 31 pacientes testados demonstraram perdas em pelo menos um domínio testado, como capacidade de manter contato visual com um adulto, responder a um estímulo de sorriso social, ou reconhecer expressões faciais. O uso dessas ferramentas, além de ser fundamental em contexto clínico para seguimento da evolução do quadro clínico, pode ser valioso em um contexto de pesquisa, pois se feito de forma complementar à avaliação psicofísica, oferece a oportunidade de melhor separar aspectos do desempenho do paciente que são devidos a limitações de natureza psicofísica e aspectos do desempenho que possam ser devidos a limitações de aspectos de alta ordem do processamento da informação visual.

## 5. Conclusão

No presente trabalho, documentamos o desenvolvimento da AV de crianças expostas ao ZIKV durante a gestação que não apresentaram sintomas clínicos característicos da CZS, notando que a acuidade estava se desenvolvendo dentro dos parâmetros esperados para estas crianças. Em três crianças com microcefalia ou macrocefalia, que também apresentaram manifestações detectáveis em exames de neuroimagem, a AV também estava dentro das normas, apesar de ter apresentado um valor limítrofe em uma primeira avaliação (paciente 59). Em uma paciente (55) com atrofia coriorretinianas binoculares (uma manifestação de CZS comumente reportada) perda da ordem de 0.3 logMAR foi encontrada, de acordo com valores relatados em estudos prévios (Verçosa et al., 2017).

A incidência de casos de infecção por ZIKV e, conseqüentemente, de crianças afetadas pela CZS diminuiu no país a partir de 2017 (Ministério da Saúde, 2018a, 2018b), mas o desafio de lidar com o desenvolvimento a longo prazo das crianças com CZS nascidas na epidemia de 2015-2016 permanece, assim como a possibilidade do surgimento de novos casos (em regiões ainda não afetadas) que necessitem de triagem e acompanhamento clínico individualizado. No presente trabalho, demonstramos perdas de acuidade visual em uma criança (Paciente 55) nascida em uma região com perfil epidemiológico diverso do que havia sido descrito previamente na literatura, o que sugere que regiões ainda não afetadas pela síndrome precisem estar preparadas para o manejo clínico desses casos.

A realização de triagem oftalmológica para crianças com CZS tem sido recomendada para todas as crianças com confirmação de exposição ao ZIKV, já que alterações podem ocorrer mesmo na ausência de sintomas neurológicos como a microcefalia (Zin et al., 2017). Nós reiteramos a importância de tal triagem, já que na nossa amostra a ocorrência de danos retinianos foi altamente preditiva de perdas de AV severas (maior que uma oitava). Como a CZS pode se manifestar em diferentes graus de severidade, a ausência de microcefalia não deve precluir crianças de uma ampla avaliação oftalmológica. O exame de AV e, quando possível, de outras funções visuais como da sensibilidade ao contraste, visão de cores e acuidade de reconhecimento, devem inserir-se como complementares ao exame oftalmológico para oferecer quadro completo das limitações e potencialidades da função visual em crianças com CZS.

Baseado na literatura e nos achados do presente trabalho, podemos apontar três contextos nos quais a avaliação da AV pelo método do TAC pode contribuir com o manejo clínico na CZS: (a) Integrar programas de triagem oftalmológica neonatal após identificação da CZS; (b) Integrar uma abordagem global de avaliação da função visual (englobando sensibilidade ao contraste) e (c) Fornecer informações sobre o progresso de intervenções clínicas. Apontamos duas ressalvas sobre este uso: (1) Os resultados precisam ser considerados sempre no contexto clínico mais amplo da criança, triangulando dados da avaliação oftalmológica e neurológica sempre que possível; e (2) Os resultados precisam ser considerados apenas como um índice global, que pode não refletir informações só detectáveis em uma exame visual global que considera outras funções visuais e o impacto das perdas na funcionalidade diária da criança.

Apontamos ainda as seguintes direções de pesquisas futuras que consideramos essenciais para a melhor compreensão da relação entre a infecção congênita por ZIKV e a função visual: (a) Definição mais completa do quadro da CZS, e contextualização das perdas de AV sempre dentro do quadro clínico global da criança; (b) Refinamento das metodologias de avaliação, mais especificamente integrando medidas eletrofisiológicas às medidas psicofísicas; (c) Ampliação da quantidade de funções visuais testadas, agregando aspectos como sensibilidade ao contraste e acuidade de reconhecimento; e (4) contextualização das potenciais perdas visuais às demandas do ambiente da criança, relacionando-as a medidas de visão funcional e cognitivas. Na medida em que os pacientes da CZS atinjam idades nas quais uma gama maior de funções visuais sejam testáveis, tais pesquisas podem tornar-se valiosas para uma melhor compreensão do quadro de CZS a longo prazo.

## Referências

- Aragao, M. de F. V., Linden, V. van der, Brainer-Lima, A. M., Coeli, R. R., Rocha, M. A., Silva, P. S. da, ... Valenca, M. M. (2016). Clinical features and neuroimaging (CT and MRI) findings in presumed Zika virus related congenital infection and microcephaly: retrospective case series study. *BMJ*, *353*, i1901. <https://doi.org/10.1136/bmj.i1901>
- Araujo, L. M., Ferreira, M. L. B., Nascimento, O. J., Araujo, L. M., Ferreira, M. L. B., & Nascimento, O. J. (2016). Guillain-Barré syndrome associated with the Zika virus outbreak in Brazil. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, *74*(3), 253–255. <https://doi.org/10.1590/0004-282X20160035>
- Banks, M. S. (1980). The Development of Visual Accommodation during Early Infancy. *Child Development*, *51*(3), 646–666. <https://doi.org/10.2307/1129450>
- Banks, M. S., & Bennett, P. J. (1988). Optical and photoreceptor immaturities limit the spatial and chromatic vision of human neonates. *JOSA A*, *5*(12), 2059–2079. <https://doi.org/10.1364/JOSAA.5.002059>
- Banks, M. S., & Salapatek, P. (1981). Infant pattern vision: A new approach based on the contrast sensitivity function. *Journal of Experimental Child Psychology*, *31*(1), 1–45. [https://doi.org/10.1016/0022-0965\(81\)90002-3](https://doi.org/10.1016/0022-0965(81)90002-3)
- Baran, L. C. P., Costa, M. F., Vidal, K. S., Damico, F. M., Barboni, M. T. S., Lima, D. S., ... Ventura, D. F. ((In press)). Alterations in Visual Acuity and Visual Development in infants from one to twenty-four months old either exposed to or infected by Zika Virus (ZIKV) during gestation, with and without microcephaly. *Journal of American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus*.
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, *67*(1), 1–48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Bavelier, D., & Neville, H. J. (2002). Cross-modal plasticity: where and how? *Nature Reviews Neuroscience*, *3*(6), 443–452. <https://doi.org/10.1038/nrn848>

- Blohm, G. M., Lednicky, J. A., Márquez, M., White, S. K., Loeb, J. C., Pacheco, C. A., ... Paniz-Mondolfi, A. E. (2018). Evidence for Mother-to-Child Transmission of Zika Virus Through Breast Milk. *Clinical Infectious Diseases*, *66*(7), 1120–1121. <https://doi.org/10.1093/cid/cix968>
- Brandão, A. de O., Andrade, G. M. Q., Vasconcelos, G. C., Rossi, L. D. de F., Saliba, G. R., Brandão, A. de O., ... Saliba, G. R. (2017). Instruments for evaluation of functionality in children with low vision: a literature review. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, *80*(1), 59–63. <https://doi.org/10.5935/0004-2749.20170016>
- Brasil, P., Sequeira, P. C., Freitas, A. D., Zogbi, H. E., Calvet, G. A., Souza, R. V. de, ... Solomon, T. (2016). Guillain-Barré syndrome associated with Zika virus infection. *The Lancet*, *387*(10026), 1482. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30058-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30058-7)
- Brown, J. A., Singh, G., Acklin, J. A., Lee, S., Duehr, J. E., Chokola, A. N., ... Lim, J. K. (2019). Dengue Virus Immunity Increases Zika Virus-Induced Damage during Pregnancy. *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.01.005>
- Caires-Júnior, L. C., Goulart, E., Melo, U. S., Araujo, B. H. S., Alvizi, L., Soares-Schanoski, A., ... Zatz, M. (2018). Discordant congenital Zika syndrome twins show differential in vitro viral susceptibility of neural progenitor cells. *Nature Communications*, *9*(1), 475. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02790-9>
- Calvet, G., Aguiar, R. S., Melo, A. S. O., Sampaio, S. A., de Filippis, I., Fabri, A., ... de Filippis, A. M. B. (2016). Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *The Lancet Infectious Diseases*, *16*(6), 653–660. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00095-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00095-5)
- Campos, E. (1995). Amblyopia. *Survey of Ophthalmology*, *40*(1), 23–39. [https://doi.org/10.1016/S0039-6257\(95\)80044-1](https://doi.org/10.1016/S0039-6257(95)80044-1)
- Campos, G. S., Bandeira, A. C., & Sardi, S. I. (2015). Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, *21*(10), 1885–6. <https://doi.org/10.3201/eid2110.150847>

- Cao-Lormeau, V.-M., Roche, C., Teissier, A., Robin, E., Berry, A.-L., Mallet, H.-P., ... Musso, D. (2014). Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerging Infectious Diseases*, 20(6), 1085–1086. <https://doi.org/10.3201/eid2006.140138>
- Castanha, P. M. S., Nascimento, E. J. M., Braga, C., Cordeiro, M. T., de Carvalho, O. V., de Mendonça, L. R., ... Marques, E. T. A. (2017). Dengue Virus–Specific Antibodies Enhance Brazilian Zika Virus Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 215(5), 781–785. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw638>
- Chambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R., & Rice, C. M. (1990). Flavivirus Genome Organization, Expression, and Replication. *Annual Review of Microbiology*, 44(1), 649–688. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.44.100190.003245>
- Chan, J. F. W., Choi, G. K. Y., Yip, C. C. Y., Cheng, V. C. C., & Yuen, K.-Y. (2016). Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease. *Journal of Infection*, 72(5), 507–524. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2016.02.011>
- Colt, S., Garcia-Casal, M. N., Peña-Rosas, J. P., Finkelstein, J. L., Rayco-Solon, P., Prinzo, Z. C. W., & Mehta, S. (2017). Transmission of Zika virus through breast milk and other breastfeeding-related bodily-fluids: A systematic review. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(4), e0005528. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005528>
- Cugola, F. R., Fernandes, I. R., Russo, F. B., Freitas, B. C., Dias, J. L. M., Guimarães, K. P., ... Beltrão-Braga, P. C. B. (2016). The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*, 534(7606), 267–71. <https://doi.org/10.1038/nature18296>
- Dang, J., Tiwari, S. K., Lichinchi, G., Qin, Y., Patil, V. S., Eroshkin, A. M., & Rana, T. M. (2016). Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. *Cell Stem Cell*, 19(2), 258–265. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.04.014>
- de Miranda, H. A., Costa, M. C., Frazão, M. A. M., Simão, N., Franchischini, S., & Moshfeghi, D. M. (2016). Expanded Spectrum of Congenital Ocular Findings in



Microcephaly with Presumed Zika Infection. *Ophthalmology*, 123(8), 1788–1794.  
<https://doi.org/10.1016/J.OPHTHA.2016.05.001>

de Oliveira Dias, J. R., Ventura, C. V., de Paula Freitas, B., Prazeres, J., Ventura, L. O., Bravo-Filho, V., ... Maia, M. (2018). Zika and the Eye: Pieces of a Puzzle. *Progress in Retinal and Eye Research*, 66, 85–106.  
<https://doi.org/10.1016/J.PRETEYERES.2018.04.004>

de Paula Freitas, B., de Oliveira Dias, J. R., Prazeres, J., Sacramento, G. A., Ko, A. I., Maia, M., & Belfort, R. (2016). Ocular Findings in Infants With Microcephaly Associated With Presumed Zika Virus Congenital Infection in Salvador, Brazil. *JAMA Ophthalmology*, 134(5), 529. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2016.0267>

Dejnirattisai, W., Supasa, P., Wongwiwat, W., Rouvinski, A., Barba-Spaeth, G., Duangchinda, T., ... Screaton, G. R. (2016). Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. *Nature Immunology*, 17(9), 1102–1108. <https://doi.org/10.1038/ni.3515>

Dick, G. W. A., Kitchen, S. F., & Haddock, A. J. (1952). Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 46(5), 509–520. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4)

Dobson, V., & Teller, D. Y. (1978). Visual acuity in human infants: A review and comparison of behavioral and electrophysiological studies. *Vision Research*, 18(11), 1469–1483. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(78\)90001-9](https://doi.org/10.1016/0042-6989(78)90001-9)

Driggers, R. W., Ho, C.-Y., Korhonen, E. M., Kuivanen, S., Jääskeläinen, A. J., Smura, T., ... Vapalahti, O. (2016). Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. *New England Journal of Medicine*, 374(22), 2142–2151. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1601824>

Duffy, M. R., Chen, T.-H., Hancock, W. T., Powers, A. M., Kool, J. L., Lanciotti, R. S., ... Hayes, E. B. (2009). Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *New England Journal of Medicine*, 360(24), 2536–2543. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0805715>

- Efron, B., & Morris, C. (1977). Stein's Paradox in Statistics. *Scientific American*, 236(5), 119–127. Retrieved from JSTOR.
- Essen, D. V., Anderson, C. H., & Felleman, D. J. (1992). Information processing in the primate visual system: an integrated systems perspective. *Science*, 255(5043), 419–423. <https://doi.org/10.1126/science.1734518>
- Fagbami, A. H. (1979). Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. *Journal of Hygiene*, 83(02), 213–219. <https://doi.org/10.1017/S0022172400025997>
- Faye, O., Freire, C. C. M., Iamarino, A., Faye, O., de Oliveira, J. V. C., Diallo, M., ... Sall, A. A. (2014). Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(1), e2636. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002636>
- Fernandez, M. P., Parra Saad, E., Ospina Martinez, M., Corchuelo, S., Mercado Reyes, M., Herrera, M. J., ... Dubovy, S. R. (2017). Ocular Histopathologic Features of Congenital Zika Syndrome. *JAMA Ophthalmology*, 135(11), 1163. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2017.3595>
- Filipe, A. R., Martins, C. M. V., & Rocha, H. (1973). Laboratory infection with Zika virus after vaccination against yellow fever. *Archiv Für Die Gesamte Virusforschung*, 43(4), 315–319. <https://doi.org/10.1007/BF01556147>
- França, G. V. A., Schuler-Faccini, L., Oliveira, W. K., Henriques, C. M. P., Carmo, E. H., Pedi, V. D., ... Victora, C. G. (2016). Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. *The Lancet*, 388(10047), 891–897. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30902-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30902-3)
- Freitas, B. de P., Ko, A. I., Khouri, R., Mayoral, M., Henriques, D. F., Maia, M., & Belfort, R. (2017). Glaucoma and Congenital Zika Syndrome. *Ophthalmology*, 124(3), 407–408. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2016.10.004>

- Garcez, P. P., Loiola, E. C., Madeiro da Costa, R., Higa, L. M., Trindade, P., Delvecchio, R., ... Rehen, S. K. (2016). Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science*, *352*(6287), 816–818. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6116>
- Garey, L. J., & de Courten, C. (1983). Structural development of the lateral geniculate nucleus and visual cortex in monkey and man. *Behavioural Brain Research*, *10*(1), 3–13. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(83\)90145-6](https://doi.org/10.1016/0166-4328(83)90145-6)
- Gourinat, A.-C., O'Connor, O., Calvez, E., Goarant, C., & Dupont-Rouzeyrol, M. (2015). Detection of Zika virus in urine. *Emerging Infectious Diseases*, *21*(1), 84–6. <https://doi.org/10.3201/eid2101.140894>
- Gubler, D. J., Vasilakis, N., & Musso, D. (2017). History and Emergence of Zika Virus. *The Journal of Infectious Diseases*, *216*(suppl\_10), S860–S867. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix451>
- Haddow, A. D., Schuh, A. J., Yasuda, C. Y., Kasper, M. R., Heang, V., Huy, R., ... Weaver, S. C. (2012). Genetic Characterization of Zika Virus Strains: Geographic Expansion of the Asian Lineage. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *6*(2), e1477. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001477>
- Haddow, A. J., Williams, M. C., Woodall, J. P., Simpson, D. I. H., & Goma, L. K. H. (1964). Twelve isolations of Zika virus from *Aedes* (*Stegomyia*) *africanus* (Theobald) taken in and above a Uganda forest. *Bulletin of the World Health Organization*, *31*(1), 57–69.
- Harvey, E. M., Dobson, V., Tung, B., Quinn, G. E., & Hardy, R. J. (1999). Interobserver agreement for grating acuity and letter acuity assessment in 1- to 5.5-year-olds with severe retinopathy of prematurity. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *40*(7), 1565–1576. Retrieved from Scopus.
- Hastings, A. K., Yockey, L. J., Jagger, B. W., Hwang, J., Uraki, R., Gaitsch, H. F., ... Iwasaki, A. (2017). TAM Receptors Are Not Required for Zika Virus Infection in Mice. *Cell Reports*, *19*(3), 558–568. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2017.03.058>
- Hayes, E. B. (2009). Zika virus outside Africa. *Emerging Infectious Diseases*, *15*(9), 1347–50. <https://doi.org/10.3201/eid1509.090442>

- Hennessey, M. (2016). Zika Virus Spreads to New Areas — Region of the Americas, May 2015–January 2016. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 65. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6503e1er>
- Hess R. F., Bradley Allan, Piotrowski L., & Campbell Fergus William. (1983). Contrast-coding in amblyopia. I. Differences in the neural basis of human amblyopia. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 217(1208), 309–330. <https://doi.org/10.1098/rspb.1983.0012>
- Hills, S. L. (2016). Transmission of Zika Virus Through Sexual Contact with Travelers to Areas of Ongoing Transmission — Continental United States, 2016. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 65. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6508e2er>
- Huttenlocher, P. R., de Courten, C., Garey, L. J., & Van der Loos, H. (1982). Synaptogenesis in human visual cortex--evidence for synapse elimination during normal development. *Neuroscience Letters*, 33(3), 247–252.
- Jaenisch, T., Rosenberger, K. D., Brito, C., Brady, O., Brasil, P., & Marques, E. T. (2017). Risk of microcephaly after Zika virus infection in Brazil, 2015 to 2016. *Bulletin of the World Health Organization*, 95(3), 191–198. <https://doi.org/10.2471/BLT.16.178608>
- Johansson, M. A., Mier-y-Teran-Romero, L., Reefhuis, J., Gilboa, S. M., & Hills, S. L. (2016). Zika and the Risk of Microcephaly. *New England Journal of Medicine*, 375(1), 1–4. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1605367>
- Johnson, M. H. (1990). Cortical Maturation and the Development of Visual Attention in Early Infancy. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 2(2), 81–95. <https://doi.org/10.1162/jocn.1990.2.2.81>
- Kuno, G., & Chang, G.-J. J. (2007). Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Archives of Virology*, 152(4), 687–696. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0903-z>
- Laird, N. M., & Ware, J. H. (1982). Random-Effects Models for Longitudinal Data. *Biometrics*, 38(4), 963–974. <https://doi.org/10.2307/2529876>

- Lanciotti, R. S., Kosoy, O. L., Laven, J. J., Velez, J. O., Lambert, A. J., Johnson, A. J., ... Duffy, M. R. (2008). Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging Infectious Diseases*, *14*(8), 1232–9. <https://doi.org/10.3201/eid1408.080287>
- Lanciotti, R. S., Lambert, A. J., Holodniy, M., Saavedra, S., & Signor, L. del C. C. (2016). Phylogeny of Zika Virus in Western Hemisphere, 2015. *Emerging Infectious Diseases*, *22*(5), 933–935. <https://doi.org/10.3201/eid2205.160065>
- Larocca, R. A., Abbink, P., Peron, J. P. S., de A. Zanotto, P. M., Iampietro, M. J., Badamchi-Zadeh, A., ... Barouch, D. H. (2016). Vaccine protection against Zika virus from Brazil. *Nature*, *536*(7617), 474–478. <https://doi.org/10.1038/nature18952>
- Leal, M. C. (2016). Hearing Loss in Infants with Microcephaly and Evidence of Congenital Zika Virus Infection — Brazil, November 2015–May 2016. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, *65*. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6534e3>
- Levi, D. M., & Klein, S. (1982). Hyperacuity and amblyopia. *Nature*, *298*(5871), 268. <https://doi.org/10.1038/298268a0>
- Lewis, T. L., & Maurer, D. (2005). Multiple sensitive periods in human visual development: Evidence from visually deprived children. *Developmental Psychobiology*, *46*(3), 163–183. <https://doi.org/10.1002/dev.20055>
- Li, C., Xu, D., Ye, Q., Hong, S., Jiang, Y., Liu, X., ... Xu, Z. (2016). Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. *Cell Stem Cell*, *19*(1), 120–6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.04.017>
- Lopes Moreira, M. E., Nielsen-Saines, K., Brasil, P., Kerin, T., Damasceno, L., Pone, M., ... Cherry, J. D. (2018). Neurodevelopment in Infants Exposed to Zika Virus In Utero. *New England Journal of Medicine*, *379*(24), 2377–2379. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1800098>
- MacNamara, F. N. (1954). 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*, 48(2), 139–145. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(54\)90006-1](https://doi.org/10.1016/0035-9203(54)90006-1)

Mahalingam, S., Teixeira, M. M., & Halstead, S. B. (2017). Zika enhancement: a reality check. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(7), 686–688. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30340-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30340-7)

Marchette, N. J., Garcia, R., & Rudnick, A. (1969). Isolation of Zika Virus from *Aedes Aegypti* Mosquitoes in Malaysia\*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 18(3), 411–415. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1969.18.411>

Martina, B. E. E., Koraka, P., & Osterhaus, A. D. M. E. (2009). Dengue Virus Pathogenesis: an Integrated View. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4), 564–581. <https://doi.org/10.1128/CMR.00035-09>

Martines, R. B., Bhatnagar, J., de Oliveira Ramos, A. M., Davi, H. P. F., Iglezias, S. D., Kanamura, C. T., ... Zaki, S. R. (2016). Pathology of congenital Zika syndrome in Brazil: a case series. *The Lancet*, 388(10047), 898–904. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30883-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30883-2)

Mayer, D. L., & Dobson, V. (1982). Visual acuity development in infants and young children, as assessed by operant preferential looking. *Vision Research*, 22(9), 1141–1151. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(82\)90079-7](https://doi.org/10.1016/0042-6989(82)90079-7)

Ministério da Saúde. (2018a). *Boletim epidemiológico - Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 49 de 2018*. 49.

Ministério da Saúde. (2018b). *Boletim epidemiológico - Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a Semana Epidemiológica 45 de 2018*. 49.

Miranda-Filho, D. de B., Martelli, C. M. T., Ximenes, R. A. de A., Araújo, T. V. B., Rocha, M. A. W., Ramos, R. C. F., ... Rodrigues, L. C. (2016). Initial Description of the Presumed Congenital Zika Syndrome. *American Journal of Public Health*, 106(4), 598–600. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2016.303115>

- Mlakar, J., Korva, M., Tul, N., Popović, M., Poljšak-Prijatelj, M., Mraz, J., ... Avšič Županc, T. (2016). Zika Virus Associated with Microcephaly. *New England Journal of Medicine*, *374*(10), 951–958. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1600651>
- Moore, C. A., Staples, J. E., Dobyns, W. B., Pessoa, A., Ventura, C. V., Fonseca, E. B. da, ... Rasmussen, S. A. (2017). Characterizing the Pattern of Anomalies in Congenital Zika Syndrome for Pediatric Clinicians. *JAMA Pediatrics*, *171*(3), 288–295. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2016.3982>
- Moore, D. L., Causey, O. R., Carey, D. E., Reddy, S., Cooke, A. R., Akinkugbe, F. M., ... Kemp, G. E. (1975). Arthropod-borne viral infections of man in Nigeria, 1964–1970. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, *69*(1), 49–64. <https://doi.org/10.1080/00034983.1975.11686983>
- Moshfeghi, D. M., de Miranda, H. A., & Costa, M. C. (2016). Zika Virus, Microcephaly, and Ocular Findings. *JAMA Ophthalmology*, *134*(8), 945. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2016.1303>
- Moura da Silva, A. A., Ganz, J. S. S., Sousa, P. da S., Doriqui, M. J. R., Ribeiro, M. R. C., Branco, M. D. R. F. C., ... Soares de Britto E Alves, M. T. S. (2016). Early Growth and Neurologic Outcomes of Infants with Probable Congenital Zika Virus Syndrome. *Emerging Infectious Diseases*, *22*(11), 1953–1956. <https://doi.org/10.3201/eid2211.160956>
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*, *3*(1), 13–22. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1067>
- Musso, D., Nhan, T., Robin, E., Roche, C., Bierlaire, D., Zisou, K., ... Broult, J. (2014). Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Eurosurveillance*, *19*(14), 20761. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.14.20761>

- Musso, Didier, Roche, C., Robin, E., Nhan, T., Teissier, A., & Cao-Lormeau, V.-M. (2015). Potential Sexual Transmission of Zika Virus. *Emerging Infectious Diseases*, 21(2), 359–361. <https://doi.org/10.3201/eid2102.141363>
- Mysorekar, I. U., & Diamond, M. S. (2016). Modeling Zika Virus Infection in Pregnancy. *New England Journal of Medicine*, 375(5), 481–484. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr1605445>
- Norcia, A. M., & Tyler, C. W. (1985). Spatial frequency sweep VEP: Visual acuity during the first year of life. *Vision Research*, 25(10), 1399–1408. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(85\)90217-2](https://doi.org/10.1016/0042-6989(85)90217-2)
- Nowakowski, T. J., Pollen, A. A., Di Lullo, E., Sandoval-Espinosa, C., Bershteyn, M., & Kriegstein, A. R. (2016). Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 18(5), 591–596. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2016.03.012>
- Oehler, E., Watrin, L., Larre, P., Leparç-Goffart, I., Lastère, S., Valour, F., ... Ghawche, F. (2014). Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report, French Polynesia, December 2013. *Eurosurveillance*, 19(9), 20720. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.9.20720>
- Oliveira, W. K. de, França, G. V. A. de, Carmo, E. H., Duncan, B. B., Kuchenbecker, R. de S., & Schmidt, M. I. (2017). Infection-related microcephaly after the 2015 and 2016 Zika virus outbreaks in Brazil: a surveillance-based analysis. *The Lancet*, 390(10097), 861–870. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31368-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31368-5)
- Oliveira Melo, A. S., Malinger, G., Ximenes, R., Szejnfeld, P. O., Alves Sampaio, S., & Bispo de Filippis, A. M. (2016). Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 47(1), 6–7. <https://doi.org/10.1002/uog.15831>
- Olson, J. G., Ksiazek, T. G., Suhandiman, & Triwibowo. (1981). Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(3), 389–393. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(81\)90100-0](https://doi.org/10.1016/0035-9203(81)90100-0)



- Petersen, L. R., Jamieson, D. J., Powers, A. M., & Honein, M. A. (2016). Zika Virus. *New England Journal of Medicine*, 374(16), 1552–1563. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1602113>
- Pond, W. L. (1963). Arthropod-borne virus antibodies in sera from residents of South-East Asia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 57(5), 364–371. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(63\)90100-7](https://doi.org/10.1016/0035-9203(63)90100-7)
- Priyamvada, L., Quicke, K. M., Hudson, W. H., Onlamoon, N., Sewatanon, J., Edupuganti, S., ... Wrammert, J. (2016). Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(28), 7852–7857. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607931113>
- Rice, M. E., Galang, R. R., Roth, N. M., Ellington, S. R., Moore, C. A., Valencia-Prado, M., ... Honein, M. A. (2018). Vital Signs: Zika-Associated Birth Defects and Neurodevelopmental Abnormalities Possibly Associated with Congenital Zika Virus Infection — U.S. Territories and Freely Associated States, 2018. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 67(31), 858–867. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6731e1>
- Richard, A. S., Shim, B.-S., Kwon, Y.-C., Zhang, R., Otsuka, Y., Schmitt, K., ... Choe, H. (2017). AXL-dependent infection of human fetal endothelial cells distinguishes Zika virus from other pathogenic flaviviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(8), 2024–2029. <https://doi.org/10.1073/pnas.1620558114>
- Roach, T., & Alcendor, D. J. (2017). Zika virus infection of cellular components of the blood-retinal barriers: implications for viral associated congenital ocular disease. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1), 43. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0824-7>
- Rossi, S. L., Ebel, G. D., Shan, C., Shi, P.-Y., & Vasilakis, N. (2018). Did Zika Virus Mutate to Cause Severe Outbreaks? *Trends in Microbiology*, 26(10), 877–885. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.007>

- Russell-Eggitt, I., & Lightman, S. (1992). Intrauterine infection and the eye. *Eye*, 6(2), 205–210. <https://doi.org/10.1038/eye.1992.40>
- Safronetz, D., Sloan, A., Stein, D. R., Mendoza, E., Barairo, N., Ranadheera, C., ... Drebot, M. (2017). Evaluation of 5 Commercially Available Zika Virus Immunoassays. *Emerging Infectious Diseases*, 23(9), 1577–1580. <https://doi.org/10.3201/eid2309.162043>
- Salomão, S. R., & Ventura, D. F. (1995). Large sample population age norms for visual acuities obtained with Vistech-Teller Acuity Cards. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 36(3), 657–70.
- Salvador, F. S., & Fujita, D. M. (2016). Entry routes for Zika virus in Brazil after 2014 world cup: New possibilities. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 14(1), 49–51. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2015.10.004>
- Schuler-Faccini, L. (2016). Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly — Brazil, 2015. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 65. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6503e2>
- Simpson, D. I. H. (1964). Zika virus infection in man. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 58(4), 335–338. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(64\)90200-7](https://doi.org/10.1016/0035-9203(64)90200-7)
- Singh, P. K., Guest, J.-M., Kanwar, M., Boss, J., Gao, N., Juzych, M. S., ... Kumar, A. (2017). Zika virus infects cells lining the blood-retinal barrier and causes chorioretinal atrophy in mouse eyes. *JCI Insight*, 2(4), e92340. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.92340>
- Singh, S., & Kumar, A. (2018). Ocular Manifestations of Emerging Flaviviruses and the Blood-Retinal Barrier. *Viruses*, 10(10), 530. <https://doi.org/10.3390/v10100530>
- Sips, G. J., Wilschut, J., & Smit, J. M. (2012). Neuroinvasive flavivirus infections. *Reviews in Medical Virology*, 22(2), 69–87. <https://doi.org/10.1002/rmv.712>
- Smithburn, K. C., Kerr, J. A., & Gatne, P. B. (1954). Neutralizing Antibodies Against Certain Viruses in the Sera of Residents of India. *The Journal of Immunology*, 72(4), 248–257.

- Smithburn, K. C., Taylor, R. M., Rizk, F., & Kader, A. (1954). Immunity to Certain Arthropod-Borne Viruses Among Indigenous Residents of Egypt. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 3(1), 9–18. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1954.3.9>
- Soares de Oliveira-Szejnfeld, P., Levine, D., Melo, A. S. de O., Amorim, M. M. R., Batista, A. G. M., Chimelli, L., ... Tovar-Moll, F. (2016). Congenital Brain Abnormalities and Zika Virus: What the Radiologist Can Expect to See Prenatally and Postnatally. *Radiology*, 281(1), 203–218. <https://doi.org/10.1148/radiol.2016161584>
- Tang, H., Hammack, C., Ogden, S. C., Wen, Z., Qian, X., Li, Y., ... Ming, G. (2016). Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell*, 18(5), 587–590. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.02.016>
- Teller, D. Y., Dobson, V., & Mayer, L. D. (2005). *Teller Acuity Cards II Handbook*.
- Teller, D. Y., McDonald, M. A., Preston, K., Sebris, S. L., & Dobson, V. (1986). Assessment of Visual Acuity in Infants and Children; the Acuity Card Procedure. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 28(6), 779–789. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.1986.tb03932.x>
- Trueb, L., Evans, J., Hammel, A., Bartholomew, P., & Dobson, V. (1992). Assessing Visual Acuity of Visually Impaired Children Using the Teller Acuity Card Procedure. *American Orthoptic Journal*, 42(1), 149–154. <https://doi.org/10.1080/0065955X.1992.11981911>
- Tsui, I., Moreira, M. E. L., Rossetto, J. D., Vasconcelos, Z., Gaw, S. L., Neves, L. M., ... Zin, A. A. (2018). Eye Findings in Infants With Suspected or Confirmed Antenatal Zika Virus Exposure. *Pediatrics*, 142(4), e20181104. <https://doi.org/10.1542/peds.2018-1104>
- van den Pol, A. N., Mao, G., Yang, Y., Ornaghi, S., & Davis, J. N. (2017). Zika Virus Targeting in the Developing Brain. *The Journal of Neuroscience*, 37(8), 2161–2175. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3124-16.2017>

- van der Linden, V., Pessoa, A., Dobyns, W., Barkovich, A. J., Júnior, H. van der L., Filho, E. L. R., ... Moore, C. A. (2016). Description of 13 Infants Born During October 2015–January 2016 With Congenital Zika Virus Infection Without Microcephaly at Birth — Brazil. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, *65*(47), 1343–1348. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6547e2>
- Ventura, C. V., Maia, M., Bravo-Filho, V., Góis, A. L., & Belfort, R. (2016). Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. *Lancet (London, England)*, *387*(10015), 228. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00006-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00006-4)
- Ventura, C. V., Maia, M., Dias, N., Ventura, L. O., & Belfort, R. (2016). Zika: neurological and ocular findings in infant without microcephaly. *The Lancet*, *387*(10037), 2502. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30776-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30776-0)
- Ventura, C. V., Maia, M., Travassos, S. B., Martins, T. T., Patriota, F., Nunes, M. E., ... Belfort, R. (2016). Risk Factors Associated With the Ophthalmoscopic Findings Identified in Infants With Presumed Zika Virus Congenital Infection. *JAMA Ophthalmology*, *134*(8), 912. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2016.1784>
- Ventura, C. V., Maia, M., Ventura, B. V., Linden, V. V. D., Araújo, E. B., Ramos, R. C., ... Ventura, L. O. (2016). Ophthalmological findings in infants with microcephaly and presumable intra-uterus Zika virus infection. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, *79*(1), 1–3. <https://doi.org/10.5935/0004-2749.20160002>
- Ventura, C. V., Ventura, L. O., Bravo-Filho, V., Martins, T. T., Berrocal, A. M., Gois, A. L., ... Maia, M. (2016). Optical Coherence Tomography of Retinal Lesions in Infants With Congenital Zika Syndrome. *JAMA Ophthalmology*, *134*(12), 1420. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2016.4283>
- Ventura, L. O., Lawrence, L., Ventura, C. V., Dutton, G. N., Marinho, P., Ferro, P. F., ... Hyvärinen, L. (2017). Response to correction of refractive errors and hypoaccommodation in children with congenital Zika syndrome. *Journal of American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus*, *21*(6), 480–484.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaapos.2017.07.206>

- Ventura, L. O., Ventura, C. V., Lawrence, L., van der Linden, V., van der Linden, A., Gois, A. L., ... Miller, M. T. (2017). Visual impairment in children with congenital Zika syndrome. *Journal of American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus*, *21*(4), 295–299.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jaapos.2017.04.003>
- Verçosa, I., Carneiro, P., Verçosa, R., Girão, R., Ribeiro, E. M., Pessoa, A., ... Tartarella, M. B. (2017). The visual system in infants with microcephaly related to presumed congenital Zika syndrome. *Journal of American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus*, *21*(4), 300–304.e1. <https://doi.org/10.1016/J.JAAPOS.2017.05.024>
- Victora, C. G., Schuler-Faccini, L., Matijasevich, A., Ribeiro, E., Pessoa, A., & Barros, F. C. (2016). Microcephaly in Brazil: how to interpret reported numbers? *The Lancet*, *387*(10019), 621–624. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00273-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00273-7)
- Vissoci, J. R. N., Rocha, T. A. H., Silva, N. C. da, Queiroz, R. C. de S., Thomaz, E. B. A. F., Amaral, P. V. M., ... Staton, C. (2018). Zika virus infection and microcephaly: Evidence regarding geospatial associations. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *12*(4), e0006392. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006392>
- Wandell, B. A., Dumoulin, S. O., & Brewer, A. A. (2007). Visual Field Maps in Human Cortex. *Neuron*, *56*(2), 366–383. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.10.012>
- Winkelmann, E. R., Luo, H., & Wang, T. (2016). West Nile Virus Infection in the Central Nervous System. *FL1000Research*, *5*. <https://doi.org/10.12688/fl1000research.7404.1>
- Yuan, L., Huang, X.-Y., Liu, Z.-Y., Zhang, F., Zhu, X.-L., Yu, J.-Y., ... Qin, C.-F. (2017). A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. *Science*, *358*(6365), 933–936. <https://doi.org/10.1126/science.aam7120>
- Yuodelis, C., & Hendrickson, A. (1986). A qualitative and quantitative analysis of the human fovea during development. *Vision Research*, *26*(6), 847–855. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(86\)90143-4](https://doi.org/10.1016/0042-6989(86)90143-4)

- Zahidi, A. A., Woodhouse, J. M., Erichsen, J. T., & Dunn, M. J. (2017). Infantile nystagmus: an optometrist's perspective. *Clinical Optometry*, 9, 123–131. <https://doi.org/10.2147/OPTO.S126214>
- Zanluca, C., de Melo, V. C. A., Mosimann, A. L. P., dos Santos, G. I. V., dos Santos, C. N. D., Luz, K., ... Luz, K. (2015). First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(4), 569–572. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150192>
- Zhang, F., Wang, H.-J., Wang, Q., Liu, Z.-Y., Yuan, L., Huang, X.-Y., ... Xu, Z. (2017). American Strain of Zika Virus Causes More Severe Microcephaly Than an Old Asian Strain in Neonatal Mice. *EBioMedicine*, 25, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.10.019>
- Zin, A. A., Tsui, I., Rossetto, J. D., Gaw, S. L., Neves, L. M., Zin, O. A., ... Lopes Moreira, M. E. (2018). Visual function in infants with antenatal Zika virus exposure. *Journal of American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus*, 22(6), 452-456.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaapos.2018.07.352>
- Zin, A. A., Tsui, I., Rossetto, J., Vasconcelos, Z., Adachi, K., Valderramos, S., ... Moreira, M. E. L. (2017). Screening Criteria for Ophthalmic Manifestations of Congenital Zika Virus Infection. *JAMA Pediatrics*, 171(9), 847–854. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2017.1474>