



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Obstetrícia e Ginecologia

Teratogenicidade a Zika – um novo síndrome congénito?

Mariana Ramos Martins

Junho'2017



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Obstetrícia e Ginecologia

Teratogenicidade a Zika – um novo síndrome congénito?

Mariana Ramos Martins

Orientado por:

Dr. Rui Marques de Carvalho

Junho'2017

Introdução

A recente epidemia do vírus Zika (ZIKV) cativou a atenção da audiência global, sendo que a 1 de Fevereiro de 2016 a Organização Mundial de Saúde declarou o estado de Emergência de Saúde Pública, de importância internacional, após identificação do aumento do número de casos de microcefalia concomitantes com o aumento do número de casos de infecção pelo ZIKV.

Este vírus foi isolado, pela primeira vez, no macaco Rhesus, no Uganda, em 1947. Posteriormente, reconheceu-se que o microorganismo era transmitido por um vector artrópode do género *Aedes*, entre os quais se destaca o *Aedes aegypti*.

O primeiro caso de infecção pelo ZIKV no humano foi descrito em 1954, no Uganda, sendo que a partir deste ponto se distribuiu pelo continente africano e sudeste asiático, onde os casos se apresentavam assintomáticos ou com clínica ligeira. No entanto, em 2007, um surto na ilha de Yap, na Micronésia, fez com que 75% da população fosse infectada pelo ZIKV. Este manteve-se confinado a uma pequena banda equatorial correspondente a África e Ásia até 2014, quando surgiram os primeiros casos na América do Sul.

No Brasil, verificou-se uma relação temporo-espacial entre o aumento do número de casos de infecção pelo ZIKV e o aumento das anomalias do desenvolvimento neuronal fetal, como a microcefalia. Múltiplos dados indicam uma coesa associação entre a infecção pelo ZIKV durante a gravidez e microcefalia, embora a relação causal exacta ainda esteja por esclarecer.

Como tal, com este trabalho pretende-se estudar o papel da infecção pelo ZIKV durante a gestação: os processos fisiopatológicos na base da infecção do embrião ou feto descritos recentemente, o espectro de anomalias fetais associadas a este microorganismo, o diagnóstico da infecção materna e fetal no período prenatal e neonatal, bem como quais as estratégias de prevenção implantadas.

Palavras-chave: vírus Zika, gravidez, microcefalia, congénito e ecografia.

Abstract

The recent Zika virus (ZIKV) epidemic captured the attention of the global audience, and on February 1, 2016 the World Health Organization declared the State of Public Health Emergency of international importance after identifying the increase in the number of cases of microcephaly concomitant with an increase in the number of cases of ZIKV infection.

This virus was isolated for the first time in the Rhesus monkey in Uganda in 1947. Subsequently, it was recognized that the microorganism was transmitted by an arthropod vector of the genus *Aedes*, among which *Aedes aegypti* stands out.

The first case of ZIKV infection in humans was described in 1954 in Uganda, and from that point it was distributed throughout the continent of Africa and Southeast Asia, where the cases were asymptomatic or with mild clinical signs. However, in 2007, an outbreak on the island of Yap in Micronesia caused 75% of the population to be infected with ZIKV. It remained confined to a small equatorial band corresponding to Africa and Asia until 2014, when the first cases appeared in South America.

In Brazil, there was a spatiotemporal relationship between the increase in the number of cases of ZIKV infection and anomalies of fetal neuronal development, such as microcephaly. Multiple data indicate a close association between ZIKV infection during pregnancy and microcephaly, although the exact causal relationship remains to be clarified.

As such, this work intends to study the role of ZIKV infection during pregnancy: the pathophysiological processes on the basis of embryo or fetus infection, the spectrum of fetal anomalies associated with this microorganism, the diagnosis of maternal infection and fetal period in the prenatal and neonatal period, as well as the prevention strategies implemented.

Key words: Zika virus, pregnancy, microcephaly, congenital and ultrasound.

Metodologia e métodos

Para a elaboração do trabalho final de mestrado pesquisei artigos no PubMed com recurso às seguintes palavras-chave: Zika virus, pregnancy, microcephaly, neurotropism, teratogenicity, congenital, placenta e ultrasound. Com esta pesquisa obtive 73 artigos, aos quais adicionei outros 16 artigos, após consulta das referências bibliográficas. De um total de 89 artigos, utilizei 54 artigos para a fundamentação teórica do trabalho. Excluí 35 artigos uma vez que se debruçavam exhaustivamente sobre aspectos alheios aos objectivos do trabalho ou não apresentavam informação relevante a ser acrescentada para o tema. Consultei a plataforma informática da OMS e CDC.

Este Trabalho Final de Mestrado Integrado em Medicina não foi escrito respeitando o Novo Acordo Ortográfico.

O Trabalho Final exprime a opinião do autor e não da FML.

Índice

Biologia do vírus Zika	6
Epidemiologia	6
Clínica	8
Transmissão	9
Infecção pelo vírus Zika na gravidez e efeitos no feto	10
Fisiopatologia placentária	11
Hipótese da transferência directa ou paraplacentária	11
Hipótese da transferência placentária	12
Neurotropismo	14
Síndrome congénito Zika	16
Sistema neurológico	16
Sistema oftalmológico	16
Sistema musculoesquelético	17
Outras malformações	17
Diagnóstico	18
Diagnóstico materno	18
Diagnóstico fetal	19
Prevenção.....	22
Conclusão	23
Agradecimentos	23
Bibliografia	24

Biologia do vírus Zika

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus membro da família *Flaviviridae*, género *Flavivirus*, que inclui vírus como West Nile, dengue, febre amarela e encefalite japonesa, com os quais podem ocorrer reacções cruzadas nos testes serológicos. Este é um vírus de morfologia icosaédrica e genoma RNA não segmentado de cadeia única e polaridade positiva que codifica uma poliproteína que constitui a arquitectura estrutural do ZIKV.^[1]

Existem duas linhagens do ZIKV, uma africana e outra asiática, distinguíveis por análise genética detalhada da sequência RNA. Pondera-se que a linhagem asiática, com origem na linhagem africana, tenha sido introduzida na Ásia cerca do ano de 1945.^[2]

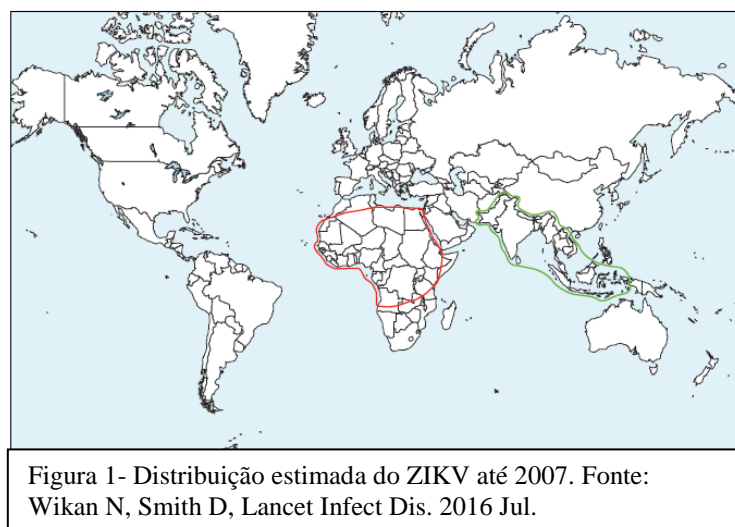
Isolado pela primeira vez, em 1947, no sangue de um macaco Rhesus (*Macaca mulatta*), na floresta Zika, próximo de Entebbe, Uganda.^[3] O vírus foi igualmente isolado de uma população de mosquitos da mesma área, justificando a circulação endémica através de interacções hospedeiro-vector, sendo este último o artrópode de actividade diurna do género *Aedes*.^[4] Destaca-se o *Aedes aegypti*, embora outras espécies do género *Aedes* possam estar associadas à transmissão do ZIKV, tais como o *Aedes africanus*, *Aedes luteocephalus*, *Aedes albopictus*, *Aedes furcifer* e *Aedes vittatus*. O *Aedes* reproduz-se facilmente em escassas quantidades de água e os seus ovos sobrevivem por mais de um ano, mesmo em situações de desidratação, representado assim um caso de especial dificuldade para as agências de controlo de vectores.^[5]

No mesmo período, foram encontrados anticorpos anti-ZIKV nas amostras de sangue de indivíduos residentes na mesma região onde o vírus foi primariamente isolado no macaco Rhesus, sugerindo que o vírus já estava em circulação na população humana. No entanto não havia evidência de doença e a especificidade do teste utilizado não é conhecida e como tal deve ter-se em conta as reacções cruzadas com outros flavivírus.^[4]

Epidemiologia

Considera-se que o ZIKV teve origem em África e que a partir deste continente se distribuiu em duas direcções distintas. Com ponto de partida no Uganda (1947), evoluiu para oeste com isolamentos na Nigéria (1971) e na Serra Leoa (1972), tendo também migrado para este, com o isolamento do vírus na Malásia (1969) e noutras ilhas do Pacífico e Ásia.^[6]

O primeiro caso de infecção pelo vírus Zika em humanos foi identificado no Uganda, em 1954.^[7] Nos 50 anos seguintes, o vírus foi descrito como causa de infecção e doença humanas em casos esporádicos, em África e na Ásia, até que em 2007 ocorreu o primeiro surto epidémico na ilha de Yap, uma ilha-estado dos Estados Federados da Micronésia (figura 1). Nesta ilha, registaram-se 49 casos confirmados e outros 59 casos prováveis de infecção pelo ZIKV da linhagem asiática (definidos com critérios serológicos estritos ou detecção de RNA por RT-PCR), durante um período de quatro meses. Num período de três anos, averiguou-se, com base em evidência serológica (imunoglobulina M positiva), que cerca de 73% da população da ilha (num total de 7391 indivíduos) havia sido infectada.^[8]



Em 2013, ocorreu um novo surto epidémico na Polinésia Francesa, em que 294 casos foram confirmados por detecção de RNA do ZIVK (linhagem asiática), num período de 10 semanas. Entre 2013 e 2014, mais de 28 000 casos suspeitos de infecção pelo ZIKV foram reportados na Polinésia Francesa e outras ilhas do Pacífico.^[9]

A chegada do ZIKV ao continente americano foi marcada pela identificação, em 2014, de casos adquiridos localmente na ilha de Páscoa, Chile (indivíduos sem história de viagem para regiões endémicas dentro do período de incubação).^[10] Em Maio de 2015, a infecção pelo ZIKV, no Brasil, foi confirmada laboratorialmente, ficando igualmente estabelecido o primeiro caso de transmissão autóctone neste país (figura 2).^[11] A sequência do RNA viral encontrado era compatível com a linhagem asiática do vírus, a mesma a circular na Polinésia Francesa e ilhas vizinhas.^[12]

Potential Pathways of Global Zika Virus Spread

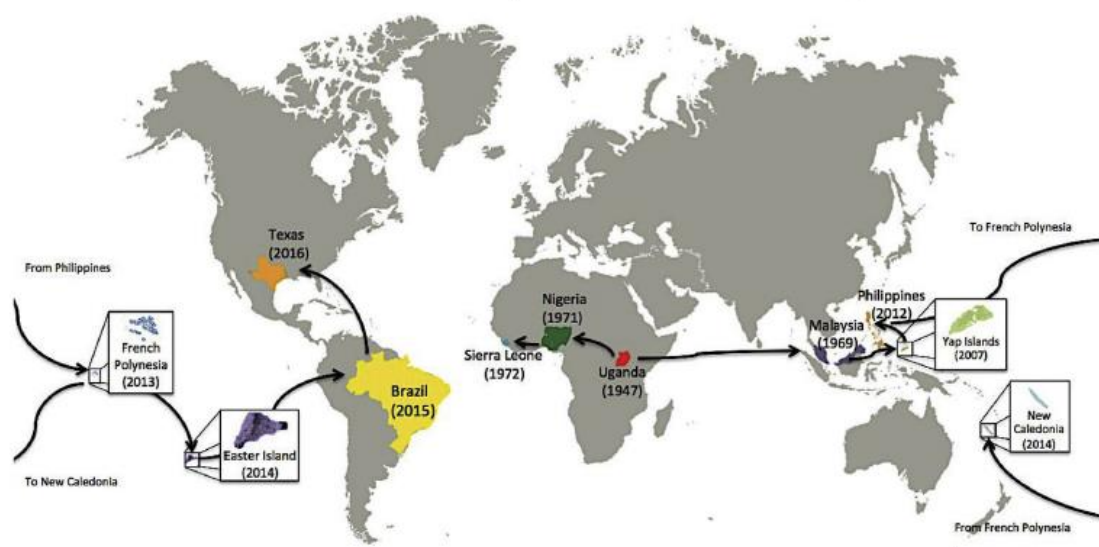


Figura 2 – Padrão de distribuição global do ZIKV e *Aedes aegypti*. Fonte: Chang C et al. J Autoimmun. 2016 Apr.

Actualmente, ainda não é conhecida a verdadeira razão para a emergência mundial de uma doença confinada a uma estreita banda tropical. Faye et al. sugere que a perda do fenómeno de N-glicosilação da proteína de envelope vírica aumenta a infecciosidade das células do mosquito *Aedes*. Como tal, provavelmente, existe uma maior eficiência na transmissão do ZIKV ao humano, via vector, e concomitante mudança no padrão de distribuição geográfica do vírus.^[13]

Clínica

A febre Zika é uma doença exantemática cujos primeiros sintomas ocorrem 3 a 12 dias após a inoculação do vírus no humano. Segundo a definição da OMS, trata-se de um quadro de rash maculopapular ou febre baixa associado a conjuntivite não purulenta, artrite ou artralguas, num sujeito com história de viagem compatível.^[14] Outras possíveis manifestações são: mialgias, cefaleias, edema, prurido, vômitos e dor retro-orbital.^[8]

No entanto, a maioria dos indivíduos apresentam sintomatologia ligeira ou são mesmo assintomáticos (aproximadamente 80%), sendo a doença, na maioria dos casos, auto-limitada com duração de 2 a 7 dias.^[15]

Os casos de doença grave (com necessidade de hospitalização ou resultando em morte) são raros, embora se tenha comprovado um aumento do número de casos de síndrome Guillain-Barré, nas áreas afectadas por epidemias de ZIKV. Numa larga

amostra de pacientes, foram reportados casos de síndrome Guillain-Barré, em média, 6 após a infecção pelo ZIKV, fortalecendo a evidência desta relação causal. O síndrome citado anteriormente é uma polineuropatia desmielinizante inflamatória, que evolui tipicamente após uma infecção bacteriana ou viral, caracterizada por parestesias e diminuição da força muscular, inicialmente nos membros inferiores e com progressão para os membros superiores (paralisia em 4 semanas). O risco aumenta com a idade e evidencia-se uma predileção pelo sexo masculino.^[16]

Laboratorialmente, na infecção pelo ZIKV, evidencia-se leucopénia, trombocitopenia, LDH e GGT aumentadas, bem como elevação dos marcadores inflamatórios como PCR, ferritina e fibrinogénio.

Transmissão

Como já foi referido anteriormente, por definição, a transmissão dos arbovírus envolve um vector artrópode e um hospedeiro vertebrado. Estes vírus mantêm-se endémicos nas regiões tropicais e sub-tropicais, as quais promovem o ciclo de vida dos artrópodes, entre os quais se destaca o *Aedes aegypti*.

No entanto, actualmente, já se encontra documentada a possibilidade de transmissão sexual, transfusional, perinatal e transplacentária (materno-fetal).

A presumptiva transmissão sexual foi reportada por Foy et al. quando foram identificados dois casos de infecção pelo ZIKV em indivíduos, sem história de viagem recente, após estabelecida relação sexual com os respectivos parceiros sexuais, estes com história de viagem recente ao Senegal, no caso 1, e viagem recente à Venezuela, no caso 2.^[17] O isolamento do vírus no sémen 17 dias após o diagnóstico clínico da infecção, suporta a potencial transmissão sexual, bem como a detecção de RNA do ZIKV no sémen 62 dias após o início dos sintomas.^[18]

O ZIKV foi detectado em aproximadamente 3% de doadores de sangue assintomáticos, durante o surto epidémico na Polinésia Francesa, sugerindo uma possível transmissão via sangue e produtos sanguíneos infectados, em processos transfusionais.^[19]

A possibilidade do vírus ser transmitido por via perinatal apresenta um especial interesse. Um estudo de 2014, na Polinésia Francesa, avaliou a presença do ZIKV no soro das mães e recém-nascidos, durante o parto. Em dois casos detectou-se o RNA do vírus até 5 dias após o parto, no soro da mãe, e até 6 dias no soro do recém-nascido. Por

outro lado, o ZIKV foi igualmente detectado no leite materno. Estas evidências necessitam de ser confirmadas em estudos mais extensos, mas estabelecem a possibilidade da transmissão por via perinatal.^[20]

Recentemente, em 2016, no Brasil, o RNA do ZIKV foi detectado no fluido amniótico de gestações cujos os fetos apresentavam microcefalia.^[21]

Actualmente, não existe evidência que suporte transmissão via saliva, urina ou por fluídos respiratórios.

Infecção pelo vírus Zika na gravidez e efeitos no feto

Tal como foi referido anteriormente, a transmissão materno-fetal do vírus Zika já foi reportada.^{[20][21]} O espectro completo de consequências da infecção congénita pelo ZIKV ainda não é conhecido. No entanto, actualmente considera-se a existência de uma entidade designada de síndrome congénito Zika, do qual se destaca a microcefalia.

A associação putativa entre a infecção pelo ZIKV nas mulheres grávidas e microcefalia da respectiva descendência baseia-se em evidência epidemiológica e laboratorial.

A correlação temporal entre o surto epidémico do vírus Zika (Brasil, 2015) e o aumento do número de casos de microcefalia neonatal levou a uma análise retrospectiva da associação entre o vírus Zika e microcefalia na Polinésia Francesa (surto epidémico de Outubro de 2013 a Abril de 2014). Durante os 23 meses de estudo surgiram 8 casos de microcefalia, dos quais 7 (88%) foram identificados num período de 4 meses (de Março a Julho de 2014). Relativamente a estes casos, de todos os modelos de previsão da datação da microcefalia, o que demonstrou melhores resultados foi o modelo do primeiro trimestre. Neste período da gestação, o risco de microcefalia obtido foi de 95 casos num total de 10 000 correspondendo a um rácio risco de 53.4 (95% CI 6.5 – 1061.2) (*vide* tabela 1). Estes dados apontam assim para a hipótese de que a infecção no primeiro trimestre da gravidez esteja associada a um maior risco de microcefalia.^[22]

	Baseline prevalence of microcephaly per 10 000 neonates	Number of microcephaly cases per 10 000 women infected in the period of risk	Risk ratio (95% CI)	p value*	AICc for model fit†
Trimester 1	2 (0-8)	95 (34-191)	53.4 (6.5-1061.2)	0.0007	0
Trimesters 1 and 2	2 (0-8)	50 (17-101)	26.4 (3.0-352.0)	0.0015	1.37
Trimesters 1, 2, and 3	2 (0-9)	42 (13-86)	20.8 (2.1-424.1)	0.0032	2.73
Trimester 2	4 (0-12)	84 (12-196)	23.2 (1.4-407.8)	0.02	5.76
Trimesters 2 and 3	4 (0-13)	53 (0-135)	11.9 (0-177.5)	0.05	7.67
Trimester 3	10 (3-18)	0 (0-251)	0 (0-49.3)	1.0	11.43
No association	10 (5-18)	7.15

Tabela 1 – Prevalência e risco de microcefalia associada com a infecção a ZIKV para diferentes períodos de risco, na gestação. Fonte: Cauchemez S. et al. Lancet. 2016 May.

Por outro lado, a associação previamente descrita, é também suportada pela identificação do genoma do ZIKV, utilizando RT-PCR, em amostras de fluído amniótico de duas mulheres com fetos microcefálicos^[23]; detecção de genoma do ZIKV no sangue e em amostras de tecido cerebral (associado a importante destruição das estruturas neuronais, na microscopia) de recém-nascido com microcefalia, que morreu 5 minutos após o nascimento^[24]; evidência de um maior número de anomalias fetais, detectadas por ecografia, nas grávidas infectadas por ZIKV comparativamente às não infectadas^[25]

Com a avaliação dos crescentes dados clínicos, patológicos, epidemiológicos e experimentais, o Centers for Disease Control e Prevention (CDC) declarou formalmente, em Abril de 2016, a existência de uma relação causal entre a infecção prenatal pelo vírus Zika e microcefalia ou outras anomalias cerebrais.^[26]

Os dados sobre a infecção pelo ZIKV nas mulheres grávidas são ainda limitados. No entanto, considera-se que as grávidas podem ser infectadas pelo vírus em qualquer um dos três trimestres e que os sintomas apresentados pela grávida são semelhantes aos evidenciados pela restantes população. Por outro lado, não há evidência de que as mulheres grávidas sejam mais susceptíveis à infecção pelo ZIKV ou apresentem uma clínica mais grave. Também não é conhecido se a carga viral, a resposta imune materna, a gravidade clínica ou outros factores aumentam o risco de transmissão materno fetal.^[27]

Fisiopatologia placentária

A placenta actua com uma barreira física e imunológica entre os compartimentos fetal e materno, protegendo o feto em desenvolvimento da transmissão vertical de vírus. No caso da espécie humana, a linha da frente na protecção do feto são os sincitiotrofoblastos, que cobrem a superfície das vilosidades coriônicas e estão em contacto directo com o sangue materno, após estabelecimento do sistema circulatório materno, no término do 1º trimestre. O ZIKV é transmitido verticalmente, embora o mecanismo associado à patologia intrauterina ainda não esteja claramente definido. Actualmente instituíram-se duas hipóteses, que se complementam, a transferência directa ou paraplacentária e a transferência placentária (figura 3).

Hipótese da transferência directa ou paraplacentária

Uma vez que o fluxo de sangue materno para a placenta apenas se inicia às 10 semanas de gestação, supõe-se que a entrada directa do vírus no ambiente intrauterino ocorra via secreções das glândulas uterinas, extravazamento viral por parte de trofoblastos extravilositários no local de implantação, difusão de concentrações virais preconcepcionais contemporânea com a formação das membranas fetais ou infusão vaginal de sémen (relações sexuais após a concepção).^[28]

Esta hipótese é apoiada pela presença de elevada carga viral nas membranas fetais e fluído amniótico concomitante com alterações placentárias mínimas em fetos com elevados títulos virais no cérebro.

Hipótese da transferência placentária

Tabata et al. verificou que tanto a estirpe africana como a estirpe da pandemia actual infectava células epiteliais amnióticas, células progenitoras de trofoblastos, citotrofoblastos e células de Hofbauer. Estas duas últimas linhagens celulares infectadas foram identificadas em amostras de placentas de 1ºtrimestre, sendo que as mesmas expressavam proteínas E e NS3, indicadoras de replicação viral intracelular. No entanto, demonstrou-se que a replicação viral era mais extensa nos macrófagos placentários (células de Hofbauer) e que, uma vez infectados, os citotrofoblastos perdiam a capacidade proliferativa.^[29]

O mecanismo mais consensual, que explica o modo como o ZIKV atravessa a barreira placentária, revela que anticorpos não neutralizantes se ligam ao ZIKV, transportando-o ao longo da espessura da placenta, por mecanismo mediado por

receptor Fc neonatal. O ZIKV alcança os macrófagos placentários, infecta-os e inicia a replicação viral com disseminação pela circulação umbilical e atingimento fetal.^[30]

Este estudo revelou também a expressão consistente de TIM1 por parte das células localizadas na interface útero-placentária (decídua basal e parietal, vilosidades coriônicas e membranas corioamnióticas envolventes do feto). Considera-se que o TIM1, membro das imunoglobulinas das células T, com papel na regulação da imunidade adaptativa e inata bem como na sobrevivência celular, seja um potencial co-factor na infecção das células placentárias pelo ZIKV. Este último fenómeno foi inibido pela duramicina, um péptido cíclico que se liga especificamente à fosfatidiletanolamina no envelope viral, impedindo assim a ligação do ZIKV ao seu co-factor, o TIM1. Como tal, no futuro, a duramicina poderá vir a ter utilidade enquanto agente antiviral com aplicação clínica na infecção congénita por ZIKV.^[29]

Outro estudo documentou que os sinciciotrofblastos são resistentes à infecção pelo ZIKV, devido à secreção de interferões tipo III, particularmente IFN λ 1, pelas mesmas células. Assim, IFN λ 1 exerce uma função de protecção face à infecção celular pelo ZIKV, de forma autócrina e parácrina, e como tal o vírus terá de evadir os mecanismos de sinalização dos interferões para atingir o compartimento fetal.^[31]

Em consequência da acção antiviral do sistema imunitário (acima descrito), em termos patológicos, as lesões da placenta estão frequentemente ausentes e são reportadas predominantemente nas infecções maternas de 1º trimestre.^[32] Quando presentes, as alterações histológicas são ligeiras e não específicas, identificando-se uma inflamação placentária crónica com hiperplasia difusa das células de Hofbauer, imaturidade vilositária, fibrose do estroma e hipervascularização.^[33]

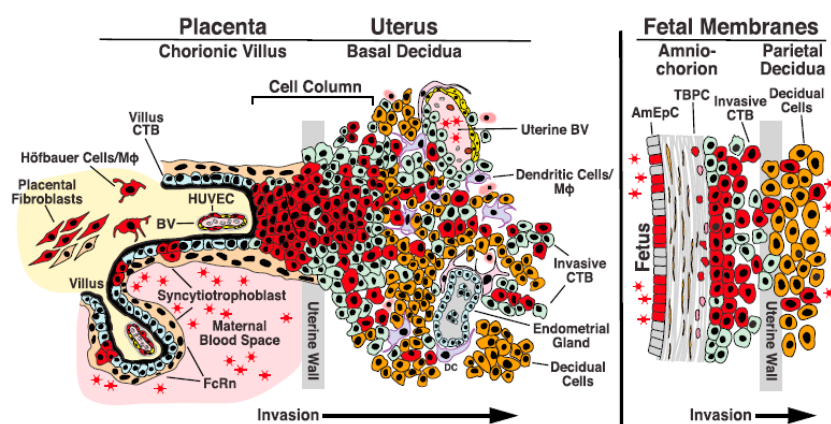


Figura 3 – Modelo da interface útero-placentária com as possíveis vias de transmissão e tipo de célula infectados pelo ZIKV. Fonte: Tabata T et al. Cell Host Microbe. 2016 Aug.

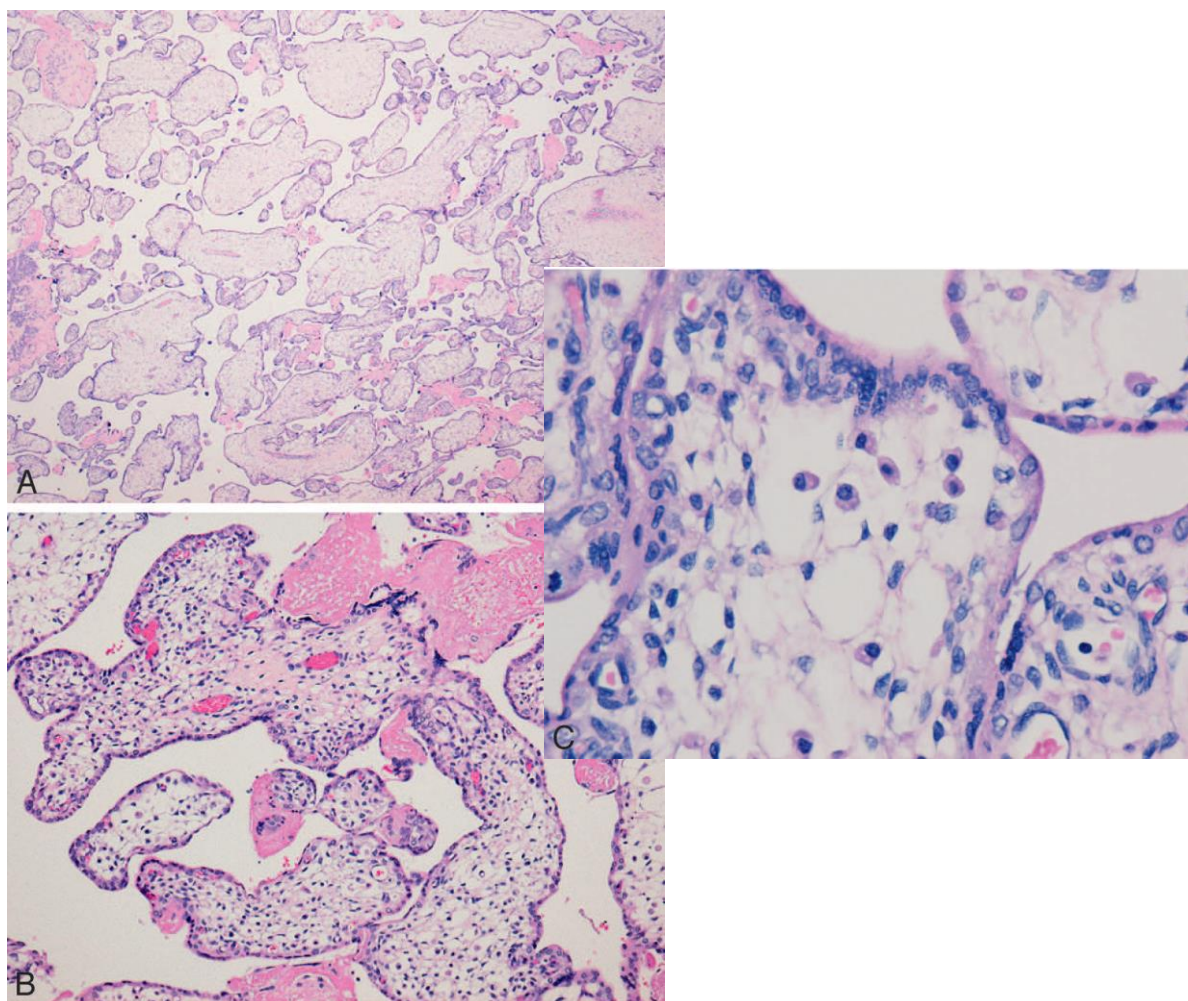


Figura 4 – Placenta com vilosidades coriônicas hidrópicas aumentadas. Estroma hiper celular resultante da proliferação das células de Hofbauer; deposição de fibrina. Fonte: Rosenberg AZ et al. Arch Pathol Lab Med. 2017 Jan.

Neurotropismo

Estudos *in vitro* e animais demonstram o neurotropismo do ZIKV. O mecanismo de infecção viral envolve a interação entre a glicoproteína E viral e receptores de superfície das células neuronais, como DC-SIGN, Tyro3 e destaque para o AXL. O ZIKV replica-se nas células neuronais progenitoras humanas *in vitro* e em células estaminais humanas em culturas que simulam estruturas cerebrais (neurosferas e organoides cerebrais).^[34] A infecção resulta em alterações morfológicas e arquitetônicas nas estruturas neuronais primitivas semelhantes às que são identificadas nos cérebros dos neonatos microcefálicos associados a infecção congênita por ZIKV, tais como adelgaçamento cortical com apoptose/necrose neuronal, calcificações corticais e subcorticais (figura 5), rarefação periventricular e dilatação ventricular.^{[35][24]}

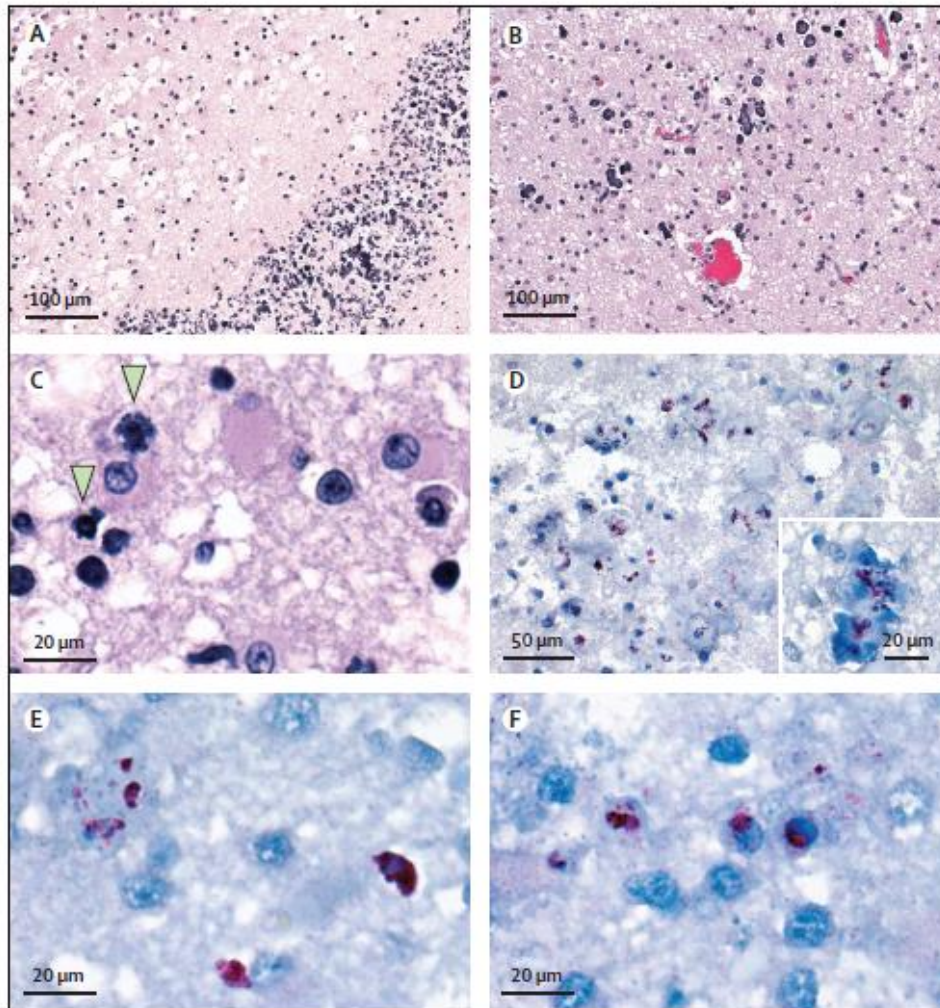


Figura 5 – Características neuropatológicas da infecção a ZIKV em neonato do sexo feminino que faleceu 2 meses após o nascimento (gestação: 38 semanas). A: Banda subcortical com padrão de células neuronais degenerativas associadas a calcificações. B: Calcificações distribuídos a nível cortical. C: Células neuronais corticais em apoptose. D: Antígenos virais Zika identificados por imunohistoquímica; em ampliação, calcificação. E: Ampliação de células neuronais degenretivas. F: Coloração perinuclear de células da glia por imunohistoquímica. Fonte: Martines RB et al. Lancet. 2016 Aug.

A relevância da infecção no primeiro e início do segundo trimestres, no contexto do síndrome congénito Zika, prende-se com uma maior susceptibilidade das células neuronais progenitoras *in vitro*. Neurónios maduros *in vitro*, fetos humanos com maior idade gestacional e adultos parecem ser mais resistentes à infecção neuronal, o que sugere que a maturação neuronal confere resistência à infecção pelo vírus. A neuropatologia traduz-se num mecanismo de atraso do crescimento neuronal, em oposição a um processo de colapso de estruturas neuronais pré-formadas.^[36]

Síndrome congénito Zika (SCZ)

Embora a microcefalia seja o aspecto mais discutido no contexto da infecção pelo ZIKV na gravidez, um espectro em expansão de malformações fetais, em diferentes sistemas orgânicos, tem sido descrito. As anomalias neste síndrome são semelhantes às encontradas nas infecções pelos microorganismos do grupo TORCH (toxoplasmose, rubéola, CMV, HSV).^[37]

Sistema neurológico

A microcefalia é uma condição em que o perímetro cefálico se encontra abaixo do percentil 3 para a idade gestacional e sexo. Esta condição tem sido associada com o recente surto do vírus Zika. Devido a esta associação, o Centers for Disease Control and Prevention (CDC), o American Congress of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) e a Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM) sugeriram a realização de ecografia prenatal em mulheres que haviam sido infectadas ou potencialmente expostas. O diagnóstico ecográfico prenatal de microcefalia é por vezes complexo. Como tal os critérios ultrassonográficos para o diagnóstico da microcefalia, face a exposição ao ZIKV, foram revistos. As actuais recomendações são:

1. Com o perímetro cefálico (PC) > 2 desvios-padrão abaixo da média, deve ser feita uma avaliação cuidada da anatomia intracraniana. Se esta for normal, recomenda-se nova ecografia em 3-4 semanas.
2. Microcefalia fetal isolada é definida por $PC \geq 3$ desvios-padrão abaixo da média, para a idade gestacional. Quando $PC \geq 5$ desvios-padrão é diagnosticada microcefalia patológica. Deve ser feito exame neuroecográfico detalhado.^[38]

Os recém-nascidos apresentaram-se com quadro de hipertonia com hiperreflexia ou hipotonia. Outras malformações neurológicas já foram identificadas no contexto deste síndrome. Estas são expostas e discutidas no capítulo de diagnóstico fetal.

Sistema oftalmológico

Um estudo, que incluía 29 neonatos com microcefalia e presumível infecção por ZIKV, revelou que mais de 1/3 dos recém-nascidos tinha anomalias oftalmológicas.^[39]

De igual modo, é demonstrado, num outro estudo com 40 recém-nascidos microcefálicos e provável infecção congénita pelo ZIKV, alterações da retina e nervo óptico em 55% das crianças.^[40]

O espectro de anomalias oculares no SCZ engloba maculopatias com perda do reflexo foveal, como a atrofia macular corioretiniana com um anel hiperpigmentado que se assemelha à maculopatia torpedo ou a atrofia corioretiniana circunscrita; anomalias do nervo óptico (hipoplasia ou profundidade aumentada do dico óptico); microcórnea, microftalmia, retinopatia hemorrágica e pigmentar, anomalias do desenvolvimento vascular como tortuosidade ou a ausência vascular, coloboma, subluxação da lente, cataratas e displasia retiniana.^[41]

Sistema musculoesquelético

A actual prevalência das malformações incluídas nesta categoria, nos neonatos de grávidas infectadas durante a gestação, não é conhecida. Contudo estas são frequentemente descritas no contexto do SCZ. Schwartz constatou variadas malformações craniofaciais (craniosinostoses), anomalias dos membros com múltiplas contracturas articulares e artrogripose. Verificou-se um subdesenvolvimento dos músculos esqueléticos (amioplasia) com substituição por tecido adiposo e displasia acetabular.^[42]

Pondera-se que estas malformações não sejam resultado directo do efeito citopático do ZIKV, mas sim resultado das lesões neuronais induzidas pelo vírus. A infecção intrauterina numa fase inicial da gestação leva a diminuição da mobilidade fetal, a qual é uma causa conhecida de artrogripose, acinesia fetal e malformações associadas (figura 6).^[35]

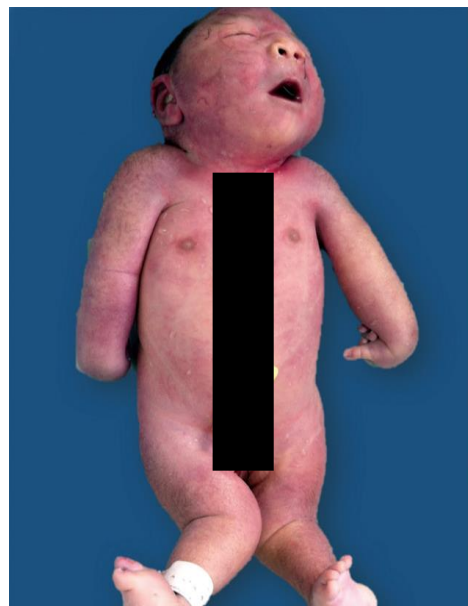


Figura 6 - Neonato com 36 semanas de gestação com malformações craniofaciais e características de acinesia fetal (artrogripose). Fonte: Martines RB et al. Lancet. 2016 Aug

Outras malformações

As anomalias adicionais no contexto do SCZ incluem: hipospádias coronais, criptorquidia e hipoplasia pulmonar. Outras malformações nos sistemas cardíaco e digestivo já foram reportadas, todavia ainda não foram exaustivamente descritas pelos especialistas. A restrição do crescimento fetal – uma das observações mais comuns - e a existência de artéria umbilical única também já foram reconhecidas na infecção congénita pelo ZIKV.^[37]

Diagnóstico

Diagnóstico materno

O impacto em termos de saúde pública da infecção pelo ZIKV reflecte a necessidade de um teste diagnóstico rápido e específico. No entanto, os actuais meios de diagnóstico da infecção são limitados e têm sido utilizados essencialmente em indivíduos sintomáticos.

As mais recentes guidelines do CDC revelam que também as grávidas assintomáticas em risco devem ser testadas. Neste grupo incluem-se grávidas que viajaram para áreas com transmissão activa do ZIKV e aquelas que mantiveram relações sexuais com parceiro com provável exposição ao vírus ou que apresenta clínica sugestiva da infecção.^[43]

O período da virémia pode estender-se por 3 a 11 dias após o início dos sintomas. Como tal, recomenda-se que o diagnóstico definitivo, com identificação do RNA do vírus por RT-PCR, seja feita até 7 dias após o início dos sintomas maternos. Para além do sangue podem ser utilizadas outras amostras de fluídos orgânicos como o sémen, o leite materno e a saliva.^[44]

A urina pode ser útil nos casos de apresentação clínica tardia uma vez que o vírus permanece até 7 dias a mais neste meio relativamente ao soro.^[45]

Os títulos de anticorpos anti-ZIKV IgG e IgM podem ser obtidos. No entanto, estes são altamente susceptíveis a reacções cruzadas devida à proximidade antigénica do ZIKV com outros flavivírus. Como consequência existe um elevado número de resultados falsos positivos, que justificam a inviabilidade actual deste teste serológico como meio de diagnóstico.^[43]

O teste de neutralização por redução de placas (PRNT) permite medir anticorpos neutralizantes específicos de vírus de modo a diferenciar entre reacção cruzada de anticorpos em infecções primárias de flavivírus ou infecção secundária por flavivírus. Actualmente, o PRNT é usado para confirmar o diagnóstico de infecção por ZIKV nos doentes com suspeita da infecção e resultado negativo no RT-PCR. No entanto, os anticorpos neutralizantes ainda podem desencadear reactividade cruzada em pessoas anteriormente infectadas por outros flavivírus ou que foram vacinados contra a febre amarela e encefalite japonesa. De acordo com as directrizes do CDC, de Maio de 2016, um resultado do PRNT com títulos superiores a 10 deve ser interpretado como positivo para infecção pelo flavivírus específico.^[46]

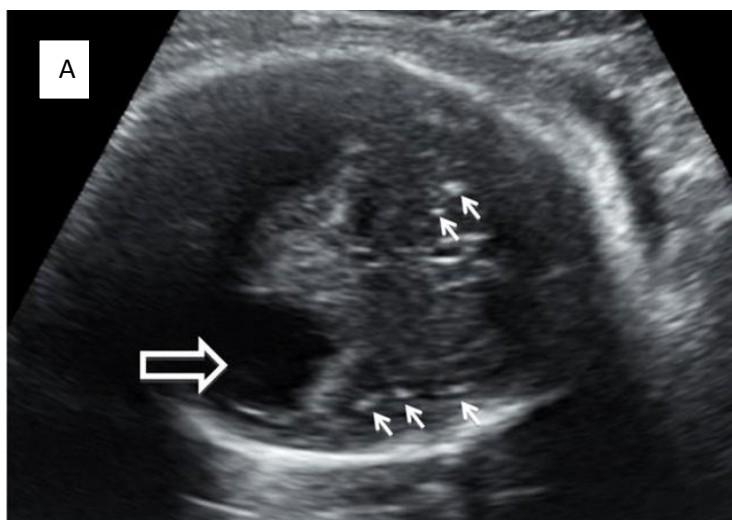
Diagnóstico fetal

a) Ecografia obstétrica

O achado mais frequente é a microcefalia. Todavia, recém-nascidos com anomalias cerebrais graves causadas pela infecção congênita pelo ZIKV podem apresentar um perímetro cefálico normal. O desenvolvimento da microcefalia depende do período gestacional em que ocorre a infecção pelo ZIKV. Tal como já foi exposto anteriormente, a infecção no primeiro e início do segundo trimestres está mais frequentemente associada com microcefalia por consequente infecção das células neuronais progenitoras e aumento dos processos de apoptose neuronal. [22]

<u>Anomalias na ecografia obstétrica</u> ^[47] ^[48]
Ventriculomegalia uni ou bilateral que poderá estar associada a pseudoquistos subependimais circundando os cornos occipitais
Calcificações parenquimatosas e periventriculares
Atrofia cortical
Agenesia/hipoplasia do corpo caloso, com ou sem quistos interhemisféricos
<i>Cavum septum pellucidum</i> ausente
Hipoplasia vermiana ou cerebelosa generalizada
Cisterna magna aumentada
Hipoplasia do tecido neuronal do troco cerebral
Anomalias oculares como microftalmia, calcificações intraoculares e cataratas
Pé boto (nos casos estudados foi sempre identificado como sendo unilateral)
Oligohidrâmnios

Tabela 2 – Principais malformações congênitas objectivadas na ecografia obstétrica.



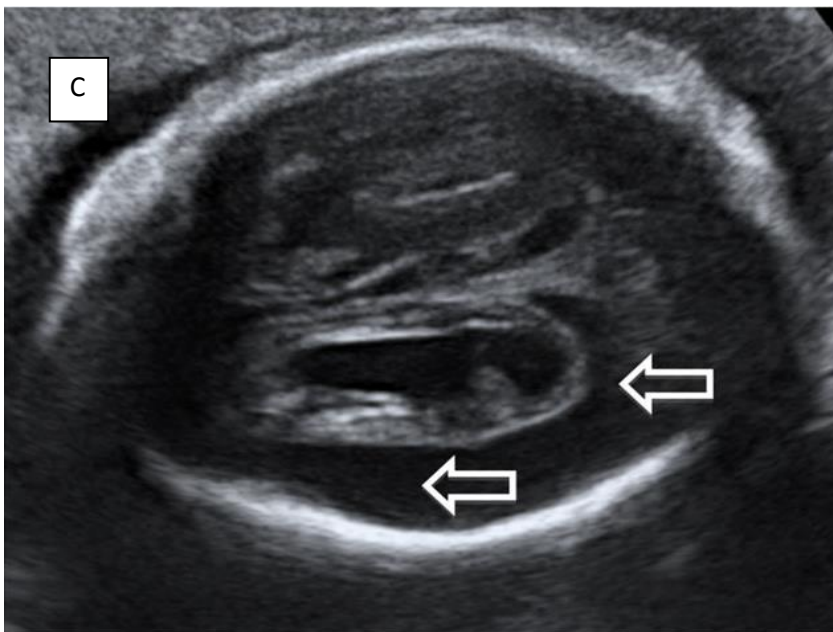
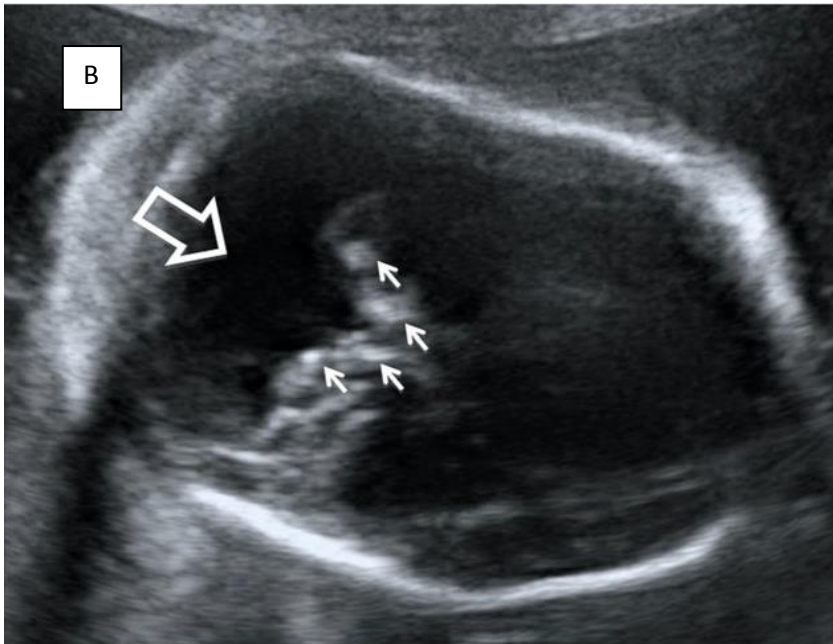


Figura 7 – Caso A (feto com 37 semanas): Ventriculomegália (seta maior) associada a calcificações parenquimatosas e periventriculares (setas pequenas). Caso B (feto com 22 semanas): Mega cisterna magna (seta maior) com focos de calcificação dos hemisférios cerebelosos (setas menores) associados a agenésia vermiana e cerebelosa generalizada. Caso C (feto com 28 semanas): Atrofia cortical e hiperecogenicidade parenquimatosa com aumento do espaço subaracnoideu (setas maiores). Fonte: Costa Carvalho et al. Prenat Diagn. 2016 Sep.

b) RM crânio-encefálica prenatal

Tal como na ecografia fetal, a RM crânio-encefálica prenatal revela microcefalia, ventriculomegalia acompanhada de pseudoquistos subependimais que circundam os cornos occipitais dos ventrículos laterais, agenésia/hipoplasia do corpo caloso, *cavum septum pellucidum* ausente e hipoplasia vermiana ou cerebelosa generalizada (figura 8). Por outro lado, este exame de diagnóstico permitiu detectar outras anomalias do desenvolvimento cortical como uma polimicrogiria extensa, displasia opercular e paquigiria, bem como evidenciar necrosa laminar cortical e determinar mais detalhadamente as malformações do tronco cerebral^[49].

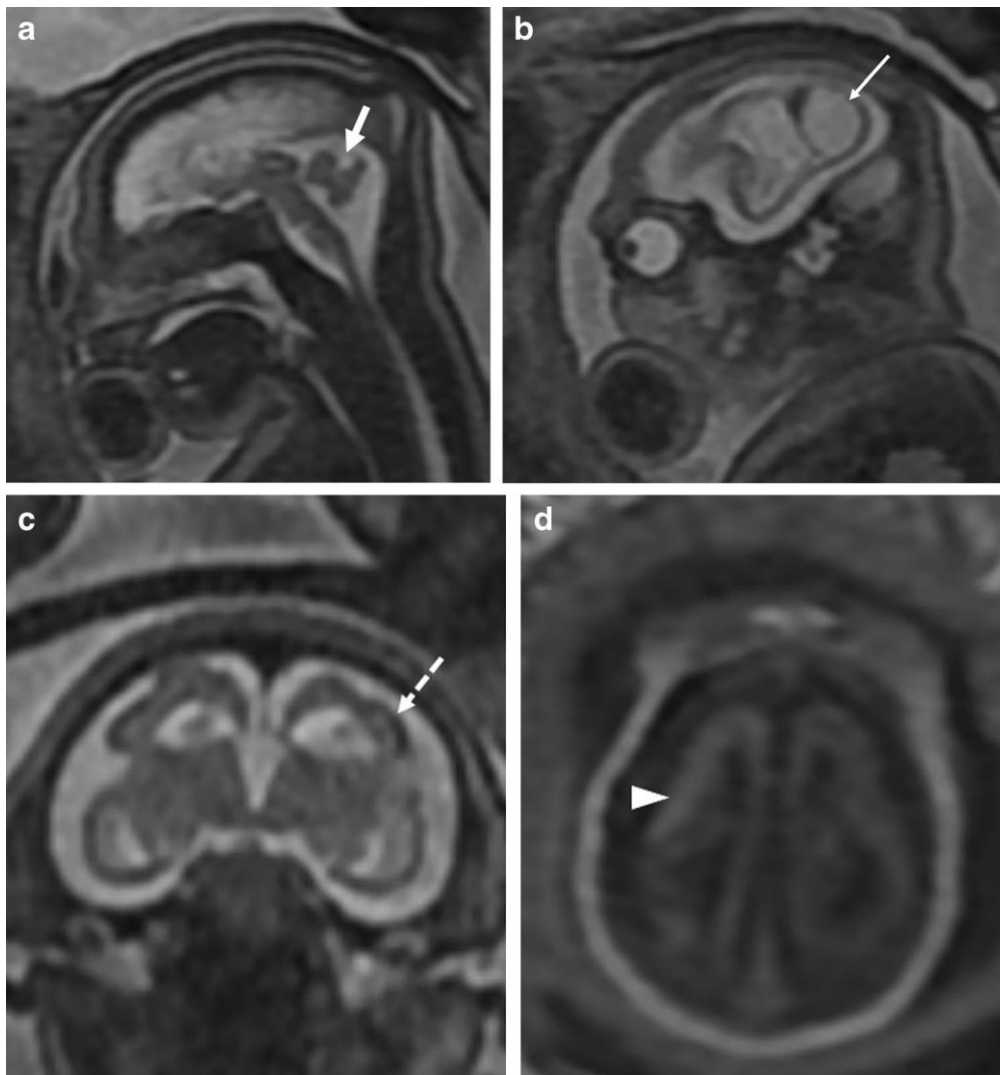


Figura 8 – RM crânio-encefálica de feto com 28 semanas de gestação (a, b – T2, sagital; c - T2, coronal; d – T1, axial). Vérnis de pequenas dimensões e morfologia alterada (a). Dilatação de ambos os ventrículos laterais com evidência de pseudoquistos subependimais occipitais (seta em b). Corpo caloso e *cavum septum pellucidum* não visíveis. Córtex irregular atrofiado (c) que sugere polimicrogiria. Áreas corticais hipertintensas em T1 (d) e hipointensas em T2 (c) consistentes com calcificações. Fonte: Guillemette-Artur P et al. *Pediatr Radiol*. 2016 Jun.

c) TC e RM crânio-encefálicas no período neonatal

Para além da microcefalia, identificada na maioria dos neonatos, observam-se calcificações intraparenquimatosas, com localização predominante na junção entre o córtex e a substância branca (região subcortical), dos lobos frontal e parietal. Ao contrário da ecografia fetal em que se descreveram calcificações periventriculares, a TC e principalmente a RM crânio-encefálicas vieram esclarecer a localização exacta das mesmas devido a melhor visualização do parênquima cortical atrofiado e definição superior dos limites cortico-subcorticais e periventriculares.^[50] Outras localizações menos frequentes para as calcificações são os núcleos da base e o tálamo; estas são essencialmente punctiformes com distribuição em banda.

A ventriculomegalia pode envolver todo o sistema ventricular, mas em 40% dos casos esta afecta os ventrículos laterais com dilatação importante dos cornos occipitais.^[51]

A atrofia cortical acompanha-se de malformações do desenvolvimento cortical como a paquigiria, a agiria, a microgiria e a polimicrogiria, predominantes no lobo frontal. Por outro lado são também reportadas anomalias com a lissencefalia e esquizefalia.

A hipodensidade da substância branca observada na TC foi estudada com recurso a RM e concluiu-se tratar-se um processo de mielinização atrasada.

Outros achados foram: hipoplasia cerebelosa e do tronco cerebral, cisterna magna alargada, hipoplasia/agenesia do corpo caloso, plexo coróide aumentado e septos intraventriculares.^{[52][53]}

Prevenção

Na ausência de medidas terapêuticas antivirais e profiláticas (vacina) específicas, torna-se imperativo instituir outras medidas de ordem ambiental (controlo químico do artrópode e evitar ambientes que promovam o crescimento dos mosquitos *Aedes*) e individual. Neste último grupo inclui-se utilização de roupa adequada com cobertura de todo o perímetro da pele, repelentes seguros durante a gestação (DEET, picaridina, IR3535) e permanecer em habitações com ar condicionado.

As mulheres devem ser avisadas para evitar ficar grávidas quando em viagem e nos 28 dias seguintes, após o regresso da área endémica do ZIKV.^{[54][55]}

Conclusão

O ZIKV surgiu recentemente como uma ameaça global para as grávidas e existem, actualmente, dados que suportam, com forte evidência, a relação entre a infecção pelo ZIKV e um variado espectro de malformações congénitas significativas, o síndrome congénito Zika. Dentro deste síndrome, destacam-se as malformações do sistema neurológico, como a microcefalia, correlacionadas com o documentado neutropismo do vírus e consequentes alterações morfológicas e arquitectónicas nas estruturas neuronais primitivas. Esta maior susceptibilidade das células neuronais primitivas determina a importância temporal da infecção a ZIKV no primeiro trimestre da gestação, durante o desenvolvimento embrionário. No entanto, as grávidas podem ser infectadas em qualquer um dos trimestres e muitas das anomalias encontradas são partilhadas com as encontradas nas infecções congénitas pelos microorganismos do grupo TORCH (toxoplasmose, rubéola, CMV, HSV).

A relevância destas alterações congénitas e as substanciais consequências a longo prazo associadas fazem com que se torne imperativo a instituição de medidas de saúde pública adequadas e eficazes. Do mesmo modo, devem ser estruturados programas de investigação terapêutica e vacinas essenciais para limitar e prevenir um impacto major, por parte do vírus, na saúde, economia e sociedade. A actual epidemia por ZIKV vem relembrar que estamos expostos a múltiplos microorganismos infecciosos que representam uma ameaça à saúde humana.

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao Dr. Rui Marques Carvalho por ter aceite ser meu tutor, por me ter demonstrado desde do início o quão maravilhoso e diverso é o mundo da Obstetrícia e pelo apoio e entusiasmo transmitido durante a elaboração desta tese de mestrado.

Agradeço também à Dra. Fernanda Vilela, médica interna do 3ºano de formação específica em Ginecologia e Obstetrícia no Hospital de Faro, por ter sido a primeira pessoa a introduzir-me ao mundo da Obstetrícia, partilhando comigo os seus conhecimentos, experiências e um bom número de partos.

À minha família: mãe, pai, Manel, por serem o meu apoio incansável e porto de abrigo.

Aos meus grandes amigos, por me incentivarem a dar sempre o melhor de mim e alegrarem o meu dia-a-dia com a sua presença na minha vida.

Bibliografia

1. Wikan N, Smith DR. Zika virus: history of a newly emerging arbovirus. *Lancet Infect Dis*. 2016 Jul;16(7):e119-26.
2. Haddow AD, Schun AJ, Yasuda CY, Kasper MR, Heading V, Huy R, et al. Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS Negl. Trop. Dis* 2012;6(2):e1477.
3. Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1952 Sep;46(5):509-20.
4. Chang C, Ortiz K, Ansari A, Gershwin ME. The Zika outbreak of the 21st century. *J Autoimmun*. 2016 Apr;68:1-13.
5. Paixão ES, Barreto F, Teixeira MG, et al. History, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Zika: A Systematic Review. *Am J Public Health*. 2016 Apr;106(4):606-12.
6. Marchette NJ, Garcia R, Rudnick A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitos in Malaysia. *Am J Trop Med Hyg*. 1969 May;18(3):411-5.
7. Macnamara FN. Zika virus: a report of three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1954 Mar;48(2):139-45.
8. Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med*. 2009 Jun 11;360(24):2536-43.
9. Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, et al. Zika virus, French Polynesia, South Pacific. *Emerg Infect Dis*. 2014 Jun; 20:1085-86.
10. Tognarelli J, Ulloa, S, Villagra E, et al. A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. *Arch Virol*. 2016 Mar;161(3):665-8.
11. Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika virus outbreak in Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2015 Oct; 21(10):1885-6.
12. Musso D. Zika virus transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2015 Oct; 21(10):1887.
13. Faye O, Freire CC, Iamarino A, de Oliveira JV, Diallo M, et al. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20th century. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2014 Jan 9;8(1):e2636.

14. Pan American Health Organization/World Health Organization (PAHO/WHO). Provisional remarks on Zika virus infection in pregnant women: document for health care professionals. PAHO/ WHO 2016; 2016:1–22.
15. Zika virus: clinical evaluation and disease, Centers for Disease Control and Prevention. Page last reviewed and updated: November 18, 2016.
16. Cao- Lormeau VM, Blake A, Mons S, Làstere S, Roche C, Vanhomwegen J, et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet* 2016 Apr 9;387(10027):1531-9.
17. Foy BD, Kobylinski KC, Chilson Foy JL, Blitvich BJ, Travassos da Rosa A, Haddow AD, et al. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. *Emerg. Infect. Dis.* 2011 May;17(5):880-2.
18. Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau VM. Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis.* 2015 Feb;21(2):359-61.
19. Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K, et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro Surveill.* 2014;19(15).
20. Besnard M, Lastere S, Teissier A, Cao-Lormeau V, Musso D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 to February 2014. *Euro Surveill.* 2014 Apr 3;19(13).
21. Calvet G, Aguiar RS, Melo ASO, et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcefaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis* 2016 Jun;16(6):653-60.
22. Cauchemez S, Bernard M, Bompard P, et al. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-2015: a retrospective study. *Lancet.* 2016 May 21;387(10033):2125-32.
23. Oliveira Melo AS, Mallinger G, Ximenes R, Szejnfeld PO, Alves Sampaio S, Bispo de Fillipis AM. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly:tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016 Jan;47(1):6-7.
24. Mlakar J, Korva M, Tul N, et al. Zika virus associated with microcephaly. *N Engl J Med.* 2016 Mar 10;374(10):951-8.
25. Brasil P Jr, Pereira JP Jr, Moreira ME, et al. Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med.* 2016 Dec 15;375(24):2321-2334.

26. Rasmussen SA, Jamieson DJ, Honein MA, Petersen LR. Zika virus and birth defects – reviewing the evidence for causality. *N Engl J Med.* 2016 May 19;374(20):1981-7.
27. Meaney-Delman D., Rasmussen SA, Staples JE, Oduyebo T, Elligton SR, Petersen EE, Fischer M., Jamieson DJ. Zika Virus and Pregnancy – what Obstetric Health Care Providers Need to Know. *Obstet Gynecol.* 2016 Apr;127(4):642-8.
28. Adibi JJ, Marques Jr ET, Cartus A, Beiji RH. Teratogenic effects of the Zika virus and the role of the placenta. *Lancet* 2016 Apr 9;387(10027):1587-90.
29. Tabata T, Pettitt M, Puerta-Guardo H, et al. Zika virus targets different primary human placental cells, suggesting two routes for vertical transmission. *Cell Host Microbe.* 2016 Aug 10;20(2):155-66.
30. Quicke, KM, Bowen JR, Johnson EL, et al. Zika virus infects human placental macrophages, *Cell Host Microbe.* 2016 Jul 13;20(1):83-90.
31. Bayer A, Lennemann NJ, Ouyang Y, et al. Type III Interferons Produced by Human Placental Trophoblasts Confer Protection against Zika Virus Infection, *Cell Host Microbe.* 2016 May 11;19(5):705-12.
32. Ritter JM, Martines RB, Zaki SR. Zika Virus: Pathology From the Pandemic. *Arch Pathol Lab Med.* 2017 Jan;141(1):49-59.
33. Rosenberg AZ, Yu W, Hill DA, et al. Placental Pathology of Zika Virus: Viral Infection of the Placenta Induces Villous Stromal Macrophage (Hofbauer Cell) Proliferation and Hyperplasia. *Arch Pathol Lab Med.* 2017 Jan;141(1):43-48.
34. Garcez PP, Loiola EC, Madeiro da Costa R, et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science* 2016 May 13;352(6287):816-818.
35. Martines RB, Bhatnagar J, de Oliveira Ramos AM, et al. Pathology of congenital Zika syndrome in Brazil: a case series. *Lancet.* 2016 Aug 27;388(10047):898-904.
36. Tang H, Hammack C, Ogden SC, et al. Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. *Cell Stem Cell.* 2016 May 5;18(5):587-590.
37. Alvarado MG, Schwartz DA. Zika Virus Infection in Pregnancy, Microcephaly, and Maternal and Fetal Health – What We Think, What We Know, and What We Think We Know. *Arch Patol Lab Med.* 2017 Jan;141(1):26-32.

38. Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM) Publications Committee. Ultrasound screening for fetal microcephaly following Zika virus exposure. *Am J Obstet Gynecol*. 2016 Jun;214(6):B2-4.
39. de Paula Freitas B, de Oliveira Dias JR, Prazeres J, et al. Ocular findings in infants with microcephaly associated with presumed Zika virus congenital infection in Salvador, Brazil. *JAMA Ophthalmology*. 2016 Feb 9.
40. Ventura C, Maia M, Travassos SB, et al. Risk factors associated with the ophthalmoscopic findings identified in infants with presumed Zika virus congenital infection. *JAMA Ophthalmology*. 2016 Aug 1;134(8):912-8.
41. Ventura CV, Maia M, Ventura BV, et al. Ophthalmological findings in infants with microcephaly and presumable intra-uterus Zika virus infection. *Arq Bras Oftalmol*. 2016 Feb;79(1):1-3.
42. Schwartz DA. Autopsy and Postmortem Studies Are Concordant: Pathology of Zika Virus Infection in Neonates and Infants With Microcephaly Following Transplacental Transmission. *Arch Pathol Lab Med*. 2017 Jan;141(1):68-72.
43. Oduyebo T, Petersen EE, Rasmussen SA, et al. Update: Interim Guidelines for Health Care Providers Caring for Pregnant Women and Women of Reproductive Age With Possible Zika Virus Exposure – United States, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016 Feb 12;65(5):122-7.
44. Balm MN, Lee CK, Lee HK, Chiu L, Koay ES, Tang JW. A diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika virus. *J Med Virol*. 2012 Sep;84(9):1501-5.
45. Gourinat AC, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M. Detection of Zika virus in urine. *Emerg Infect Dis*. 2015 Jan;21(1):84-6.
46. Rabe IB, Staples JE, Villanueva J, et al. Interim Guidance for Interpretation of Zika Virus Antibody Test Results. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016 Jun 3;65(21):543-6.
47. Franca GV, Schuler-Faccini L, Oliveira WK, et al. Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 live births with complete investigation. *Lancet*. 2016 Aug 27;388(10047):891-7.
48. Costa Carvalho FH, Melo Cordeiro K, Borges Peixoto A, et al. Associated ultrasonographic findings in fetuses with microcephaly because of suspected Zika virus (ZIKV) infection during pregnancy. *Prenat Diagn*. 2016 Sep;36(9):882-887.

49. Guillemette-Artur P, Besnard M, Eyrolle-Guignot D, et al. Prenatal brain MRI of fetuses with Zika virus infection. *Pediatr Radiol*. 2016 Jun;46(7):1032-9.
50. de Fatima Vasco Aragao M, van der Linden V, Brainer-Lima AM, et al. Clinical features and neuroimaging (CT and MRI) findings in presumed Zika virus related congenital infection and microcephaly: retrospective case series study. *BMJ*. 2016 Apr 13;353:i1901.
51. Cavalheiro S, Lopez A, Serra S, Da Cunha A, da Costa MD, Moron A, Lederman HM. Microencephaly and Zika virus: neonatal neuroradiological aspects. *Childs Nerv Syst*. 2016 Jun;32(6):1057-60.
52. Hazin NA, Poretti A, Turchi Martelli CM, et al. Computed Tomographic Findings in Microcephaly Associated with Zika Virus. *N Engl J Med*. 2016 Jun 2;374(22):2193-5.
53. Baptista T, Quaghebeur G, Alarcon A. Neuroimaging findings on babies with microencephaly and presumed congenital Zika virus infection. *BMJ*. 2016 Apr 15;353:i2194.
54. Lissauer DM, Smit E, Kilby MD. Zika virus and pregnancy. *BJOG* 2016 Jul; 123(8):1258-1263.
55. Dogan AC, Wayne S, Bauer S, et al. The Zika virus and pregnancy: evidence, management and prevention. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2017 Feb;30(4):386-396.