

CRITÉRIOS PARA AVALIAÇÃO DE DANOS EM MODELO EXPERIMENTAL DE MICROCEFALIA ASSOCIADA ÀS SÍNDROMES CONGÊNITAS EM RATOS WISTAR

Daniele Elisa Lopes Machado¹, Henrique José Cavalcanti Bezerra Gouveia², Bárbara Juacy Rodrigues Costa de Santana³, Luana de Moura Monteiro⁴, Ana Elisa Toscano Meneses da Silva Castro⁵.

¹*Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brasil.
danieleelisa88@gmail.com*

²*Programa de Pós-graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brasil.
henriquegouveia.93@hotmail.com*

³*Programa de Pós-graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brasil. barbara.jrcs@gmail.com*

⁴*Programa de Pós-graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brasil. ft.sabrinapereira@gmail.com*

⁵*Departamento de Enfermagem do Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Vitória de Santo Antão-PE, Brasil. aetoscano@hotmail.com*

Resumo: A microcefalia é caracterizada pelo crescimento anormal do crânio e seu critério diagnóstico é realizado pela circunferência frontal occipital da criança. Recentemente, houve um surto de microcefalia em crianças nas Américas. Não há estudos sobre critérios diagnósticos para microcefalia em modelos animais. Neste estudo, investigamos critérios diagnósticos compostos por crescimento somático, características físicas e ontogênese de reflexos em ratos submetidos a um modelo experimental de microcefalia. Para isso, as ratas fêmeas receberam o Busulfan (grupo B) (10 mg/kg/0,5 ml/100 g peso corporal) ou Azeite (grupo C) (0,5 ml / 100 g peso corporal) intraperitonealmente nos dias 12, 13, 14 da gestação (período inicial de desenvolvimento do córtex). Na prole dessas fêmeas foram avaliadas as medidas cranianas, características físicas e maturação dos reflexos do 1º dia (P1) pós-natal ao P21. Todas as medidas de crescimento somático de animais do grupo B foram menores que o grupo C em P1. Houve um atraso na erupção dos incisivos superiores e inferiores, na preensão palmar e na recuperação de decúbito dos filhotes do grupo B em relação ao grupo C. Os animais do grupo B classificados como não-microcefálicos também apresentaram atraso na maturação de características somáticas e reflexos. Esses dados reforçam a necessidade de estabelecer critérios não apenas morfológicos, mas também funcionais na avaliação de danos em modelos experimentais de microcefalia.

Palavras-chave: Crescimento Somático; Ontogênese de reflexos; Características físicas; Rato; Microcefalia.

1. Introdução

A microcefalia no homem e em diversas espécies resulta do déficit de crescimento do cérebro durante a gestação ou mais tarde após o nascimento (WOODS; PARKER, 2013). As causas são genéticas ou ambientais e ocorrem quando o cérebro não se desenvolve de forma adequada ou há uma interrupção do seu desenvolvimento (ABUELO, 2007).

Em humanos, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o critério epidemiológico para diagnóstico da microcefalia é a medida da circunferência cranial fronto-occipital durante a primeira semana de vida (OMS, 2014). Valores dessa circunferência menores que -2 desvios-padrões abaixo da média específica para o sexo e idade gestacional confirmam o diagnóstico (OMS, 2014). As crianças com microcefalia associada às síndromes congênitas podem apresentar retardo mental, paralisia cerebral, epilepsia, transtornos oculares e persistência de reflexos primitivos (ARAGAO et al. 2016; OLIVEIRA et al. 2016; SCHULER et al. 2016; VAN DER LINDEN et al. 2016; ASHWAL et al. 2009). Entretanto, crianças sem a presença de microcefalia também podem apresentar consequências relacionadas aos agentes teratogênicos (FRANÇA et al. 2016; VAN DER LINDEN et al. 2016). Por essa razão, o Ministério da Saúde recomenda a inclusão de novos critérios, como perda de visão, audição e comprometimento ou deficiência de membros para diagnosticar os danos causados por agentes teratogênicos (BRAZIL, 2017a).

Estudos em modelos experimentais, os quais reproduzem os danos causados pela microcefalia, permitem, dentro dos devidos limites, a extrapolação dos seus resultados para humanos (MINER et al. 2016). Os conhecimentos obtidos com esses modelos podem certamente contribuir para construção de potenciais estratégias terapêuticas, visando minimizar a incapacidade crônica dos indivíduos microcefálicos.

Em animais, assim como em humanos, é possível avaliar de forma não invasiva a presença de danos a partir da realização das medidas murinométricas/antropométricas, características somáticas e ontogênese de reflexos (VAN DER LINDEN et al. 2016; SMART E DOBBING, 1971; FOX, 1965). As medidas e características somáticas permitem diagnosticar a microcefalia e outras anormalidades físicas, enquanto a ontogênese de reflexos é considerada um indicador do desenvolvimento e

maturação do sistema nervoso central (SMART E DOBBING, 1971; FOX, 1965).

Não existem registros de critérios diagnósticos e validação dos mesmos para microcefalia em ratos, bem como dos danos observados quando não existe alteração no perímetro cefálico. Desta forma, o presente estudo pretende determinar critérios não invasivos para avaliar a presença de danos em modelo experimental de microcefalia associada às síndromes congênitas em ratos Wistar.

2. Materiais e métodos

2.1 Animais

Foram utilizadas 15 ninhadas oriundas de 15 ratas virgens albinas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), pesando de 220 – 250 g e com idade de 90-120 dias provenientes do biotério do Centro Acadêmico de Vitória, mantidos a temperatura de 22 + 2°C, ciclo claro-escuro de 12/12 horas (luz às 20h) e livre acesso à água e alimentação.

Após a confirmação da gestação através da técnica de esfregaço vaginal, foram formados aleatoriamente dois grupos de gestantes, com base na indução farmacológica de microcefalia: Controle (C, n=7) e Busulfan (B, n=8). O grupo B recebeu Busulfan (sigma, 10 mg/kg/0,5 ml/100g de peso corporal das ratas), diluído em óleo de oliva via intraperitoneal (i.p.). A dose de 10 mg/kg foi previamente relatada como sendo efetiva para induzir microcefalia (FURUKAWA et al. 2007). O grupo Controle recebeu apenas óleo de oliva (0,5 ml/100 g de peso corporal das ratas, i.p.). As ratas foram submetidas à manipulação farmacológica nos dias 12, 13 e 14 de gestação, fase inicial de desenvolvimento do córtex cerebral (FURUKAWA et al. 2007; DESESSO, 2005). Após o nascimento, as ninhadas foram mantidas com suas respectivas mães até 21 dias de vida pós-natais. Neste dia, os animais foram desmamados e separados (3-4 animais por gaiola).

O presente estudo foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (número do protocolo CEUA 0040/2016). O protocolo de manipulação e bem-estar dos animais segue as orientações da Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais em atividades de ensino ou de pesquisa científica (DBCA), lançada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

2.2 Critérios de reprodutibilidade

Para estabelecer os critérios diagnósticos da microcefalia, os animais foram avaliados diariamente do dia 1 ao dia 21 após o nascimento. Os experimentos foram realizados para avaliar o crescimento somático e maturação do sistema nervoso.

Os animais de ambos os grupos foram avaliados diariamente entre 08:00-12:00h. As medidas murinométricas realizadas foram: Eixo ântero-posterior do crânio-EAPC, Eixo látero-lateral do crânio-ELLC, Eixo longitudinal-EL e Comprimento da cauda-CC (SILVA et al. 2006). As características somáticas foram avaliadas foram: Abertura do pavilhão auditivo (APA), abertura do conduto auditivo (ACA), abertura dos olhos (AO), erupção incisivos superiores (EIS) e inferiores (EII) (SMART; DOBBING, 1971). O peso corporal foi avaliado diariamente em uma balança digital. As respostas reflexas foram avaliadas conforme descrito por Smart e Dobbing (1971) e Fox (1965). O primeiro de uma série de três dias consecutivos em que a resposta esperada apareceu completamente foi considerado o dia da maturação do reflexo. Os seguintes reflexos foram avaliados: preensão palmar-PP, recuperação de decúbito-RD, colocação pelas vibrissas- CV aversão ao precipício-AP, resposta ao susto- RS, queda livre-QL e geotaxia negativa-GN.

Após a obtenção dos dados durante os primeiros 21 dias de vida, os animais do grupo B foram classificados como menor (<) ou maior (>) quando comparados ao grupo C no P1 com relação à presença de microcefalia, avaliado a partir dos eixos do crânio. O ponto de corte para avaliação da presença de microcefalia foi a média menos o desvio-padrão do grupo C no primeiro dia de vida para as medidas murinométricas. Os animais foram classificados como microcefálicos quando apresentaram redução de pelo menos um dos dois eixos do crânio avaliados (EAPC e ELLC). Após a classificação dos animais em microcefálicos ou não, os animais do grupo B microcefálicos ou não foram classificados quanto à presença de danos, ou seja, atraso na maturação das características somáticas e ontogênese de reflexos, a partir de uma nova classificação como menor (<) ou maior (>). O ponto de corte utilizado foi a mediana do grupo C. Desta forma, para um animal apresentar microcefalia ele deve apresentar valor em milímetros menor (<) quando comparado ao grupo C, já para apontar atraso em alguma característica ou reflexo ele deve apresentar valor de dia de maturação maior (>) quando comparado ao grupo C.

2.3 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada por meio do programa estatístico GraphPad Prism. A normalidade foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. O teste T de Student foi realizado para o crescimento somático e os dados são expressos como médias \pm DP. O teste de Mann Whitney foi realizado para maturação de características físicas e ontogênese de reflexos e os dados são apresentados como mediana e valores mínimos e máximos. Significância estatística foi definida como $P < 0,05$ em todos os casos.

3. Resultados

3.1. Resultados dos parâmetros avaliados

No primeiro dia de vida, a média \pm DP das medidas murinométricas em milímetros dos animais do grupo C foram: 16,46 \pm 1,41 (EAPC), 10,67 \pm 0,59 (ELLC), 51,46 \pm 3,06 (EL) e 17,36 \pm 2,90 (CC). Nos animais do grupo B, os valores (mm) foram de 13,85 \pm 0,93 (EAPC), 9,56 \pm 0,76 (ELLC), 48,43 \pm 3,07 (EL) e 15,44 \pm 1,73 (CC). Todos os parâmetros avaliados apresentaram diferença significativa ($p < 0,0001$) (Figura 1).

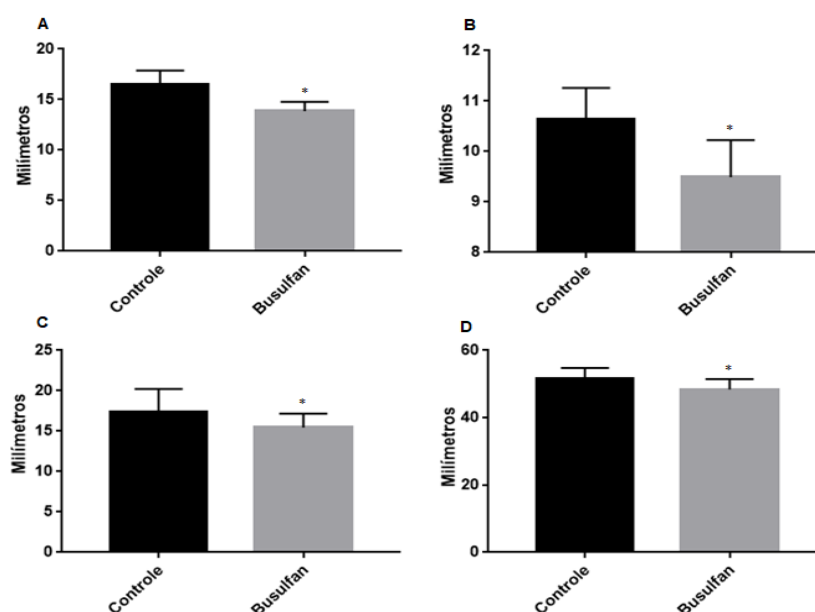


Figura 1. (A) Eixo ântero-posterior, (B) Eixo látero-lateral, (C) Eixo longitudinal e (D) Comprimento da cauda. Valores representam média \pm desvio-padrão. Diferenças significantes entre o grupo Controle e Busulfan foram determinadas a partir do Teste T não pareado, $p < 0,05$. *Diferente do grupo C ($p < 0,0001$ [A, B, C e D]).

Durante o período de lactação (P1 ao P21), os animais de cada grupo foram analisados em termos de desenvolvimento das características somáticas e ontogênese de reflexos. Os filhotes de mães tratadas com o Busulfan apresentaram retardo na erupção dos incisivos superiores e inferiores, além de retardo no desaparecimento da preensão palmar e na maturação da recuperação de decúbito (Tabela 2).

Tabela 2. Desenvolvimento das características somáticas e ontogênese de reflexos.

	Controle (n=35)		Busulfan (n=56)	
	Mediana	Máximo-Mínimo	Mediana	Máximo-Mínimo
Características somáticas				
Abertura do pavilhão auditivo	3 (35)	2-8	4 (56)	3-8
Abertura do conduto auditivo	14 (35)	11-16	13 (56)	13-14
Erupção dos incisivos superiores	11 (35)	9-5	11 (56)	10-15*
Erupção dos incisivos inferiores	10 (35)	8-12	11 (56)	7-15*
Abertura ocular	15 (35)	12-16	15 (56)	13-18
Ontogênese de reflexos				
Preensão palmar	6 (35)	4-9	7 (56)	4-13*
Recuperação de decúbito	4 (35)	2-8	5 (56)	2-8*
Colocação pelas vibrissas	8 (35)	4-12	8 (56)	2-11
Aversão ao precipício	7 (35)	3-14	7,5 (56)	3-13
Resposta ao susto	14 (35)	12-16	13 (56)	13-14
Queda livre	14 (35)	14-17	14 (56)	13-17
Geotaxia negativa	15 (35)	13-18	15 (56)	10-17 *

P<0.05 quando comparado com o grupo Controle. Teste Mann-Whitney.

3.2. Incidência de microcefalia

A presença de microcefalia foi constatada em 63 animais do grupo B. Apenas 3 animais não foram classificados como microcefálicos.

3.3. Avaliação da presença de danos em animais não-microcefálicos do grupo Busulfan

Os animais que não foram classificados como microcefálicos apresentaram retardo na erupção dos incisivos superiores e inferiores, na abertura ocular, na recuperação de decúbito, na colocação pelas vibrissas, na queda livre e na geotaxia negativa. A tabela 3 apresenta os resultados dos 3 animais não-microcefálicos.

Tabela 3. Presença de danos em animais não-microcefálicos.

	EIS	EII	AO	RD	CV	QL	GN
Animal 1	x	x		x	x	x	x
Animal 2		x			x	x	x
Animal 3		x	x	x		x	x

Erupção dos incisivos superiores e inferiores (EIS e EII), abertura ocular (AO), recuperação de decúbito (RD), colocação pelas vibrissas (CV), queda livre (QL) geotaxia negativa (GN). “x” significa atraso na maturação das características somáticas ou ontogênese de reflexos quando comparado ao grupo C.

3.4. Parâmetros selecionados para avaliação da presença de danos

Após a avaliação da presença de danos nos animais do grupo B microcefálicos ou não, os parâmetros que apresentaram atraso na maturação foram selecionados para avaliar a presença de prejuízos no desenvolvimento em animais microcefálicos ou não-microcefálicos (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros selecionados para a avaliação da presença de prejuízos no desenvolvimento de ratos expostos a indutor farmacológico de microcefalia.

Características somáticas	Ontogênese de reflexos
Erupção dos incisivos superiores	Preensão palmar
Erupção dos incisivos inferiores	Recuperação de decúbito
Abertura ocular	Colocação pelas vibrissas
	Queda livre
	Geotaxia negativa

4. Discussão

No presente estudo, avaliamos duas populações de ratos, uma primeira proveniente de ratas controles, sem intervenção farmacológica, e uma segunda oriunda de ratas que passaram pela intervenção de um agente farmacológico indutor de microcefalia. Com o objetivo de validarmos um critério diagnóstico de danos com ou sem a presença de microcefalia, avaliamos um conjunto de parâmetros, tais como medidas murinométricas, ontogênese de reflexos e características somáticas. As avaliações foram realizadas durante os primeiros 21

dias de idade, de modo a acompanharmos o desenvolvimento e maturação do sistema nervoso.

Das medidas murinométricas avaliadas, ressaltamos a redução no EAPC e no ELLC. Tais características são indicativas de redução da circunferência cranial fronto-occipital, considerada o critério para o diagnóstico da microcefalia em humanos (OMS, 2014). A redução da circunferência cranial frontal-occipital é um indicativo de más-formações no encéfalo, onde são frequentes a redução da massa encefálica, hipoplasia de áreas corticais e corpo caloso, bem como desproporcionalidades entre as áreas encefálicas (HUANG et al. 2016b; BARCHOVICH; PEACOCK, 1998). Entretanto, vale salientar que 3 ratos da população estudada não apresentaram redução dos eixos cranianos, recebendo o diagnóstico de não microcefálicos mas com a presença de danos. Tal observação remete aos casos em humanos, que embora o encéfalo apresente má formações características de microcefalia, as dimensões da cabeça estão acima do valor limite determinado (VAN DER LINDEN et al. 2016). Assim, aparentemente saudáveis, esses indivíduos apresentam deficiências cognitivas e motoras semelhantes a indivíduos portadores de microcefalia (VAN DER LINDEN et al. 2016). Similarmente, nossos ratos sem redução do EAPC ou ELLC, apresentaram parâmetros indicativos de subdesenvolvimento somático e imaturidade do SNC.

Visto que a redução da circunferência cranial fronto-occipital indica más-formações encefálicas e distúrbios motores, não é de se surpreender o retardo na perda da PP e do aparecimento da RD na população estudada. A ontogênese de reflexos, por envolver uma sequência simultânea de eventos e participação de várias regiões do SNC, é considerada um indicador do desenvolvimento e maturação do mesmo (SMART; DOBBING, 1971; FOX, 1965). O reflexo de PP é mediado por motoneurônios da medula espinal (FUTAGI et al. 2012), levando-nos a sugerir que lesões nesta estrutura possa resultar no retardo da perda do reflexo de PP. Quanto aos reflexos de QL e RD, eles exigem a coordenação dos membros e equilíbrio, e são adquiridos com o amadurecimento do SNC (CASSYDI et al. 1994). Tais reflexos envolvem várias estruturas do SNC, dentre elas, o cerebelo e também a medula espinhal (CASSYDI et al. 1994). O retardo no aparecimento da RD e QL sugere que os animais microcefálicos ou não microcefálicos possam apresentar cerebelo desproporcionalmente pequeno como documentado em humanos (BARCHOVICH; PEACOCK, 1998). O reflexo de GN refere-se a uma resposta orientadora expressa em oposição às pistas dos vetores gravitacionais, dessa forma, ela é considerada para o diagnóstico da função vestibular e/ou proprioceptiva

(MOTZ; ALBERTS, 2005). Diante do exposto, os reflexos citados no nosso critério diagnóstico englobam reflexos inatos, como a PP, e adquiridos, como a QL e a RD, o que nos fornece um excelente indicativo do desenvolvimento e maturação do SNC, já que envolvem diferentes áreas do SNC.

No tocante ao desenvolvimento somático, dentre as características avaliadas, observamos que os retardos na EII e EIS foram os parâmetro mais relevantes na população de indivíduos nascidos de ratas que foram tratadas com o Busulfan. De fato, alterações na mandíbula são comuns em indivíduos que são portadores de anormalidade no crânio (HUANG et al. 2016a). Isso pode ocorrer especialmente com a microcefalia, onde as alterações craniofaciais afetam também a mandíbula, refletindo malformações como disostose (HUANG et al. 2016a) e redução da abertura mandibular (LEAL et al. 2017). Embora não tenhamos avaliado a morfologia da mandíbula em nossos animais, não descartamos a possibilidade de que o retardo na erupção decorra de más-formações na mandíbula. É importante ainda destacar o retardo na abertura ocular, tendo em vista que crianças com microcefalia tendem a apresentar anormalidades no nervo óptico e lesões maculares (DE PAULA FREITAS et al. 2016).

De um modo geral, observamos que dentro de uma mesma ninhada nascida de mãe tratada com Busulfan, nem todos os ratos foram diagnosticados com microcefalia. Nesta população, 95% dos ratos apresentaram microcefalia. Nas ninhadas controles, todos os indivíduos foram enquadrados como não microcefálicos. Essa diferença entre os indivíduos de uma mesma ninhada já é esperada, especialmente quando a microcefalia é consequência de um agente teratogênico. O desenvolvimento dos filhotes durante a gestação e após o nascimento pode ser influenciado pelo número de irmãos e pela fisiologia materna (HAIG, 1993; VOM-SAAL, 1989). A competição por recursos limitados é considerada um dos principais mecanismos responsáveis por moldar as diferenças entre os filhotes da mesma ninhada (HAIG, 1993; VOM-SAAL, 1989). Além disso, o recente episódio de inúmeros casos de microcefalia de origem teratogênica por infecção com Zika vírus, revelou que numa gestação gemelar é possível que a microcefalia esteja presente em apenas um dos fetos (BRAZIL, 2017b).

5. Conclusões

Diante do exposto, propomos um critério diagnóstico cujos parâmetros considerados como relevantes para a avaliação de ratos microcefálicos ou não, encontram similaridades em muitas características observadas em humanos. Ressaltamos que os parâmetros inclusos no critério diagnóstico pertencem aos três métodos indicadores de desenvolvimento, englobando tanto as medidas murinométricas, características somáticas e ontogênese de reflexos, permitindo a avaliação tanto do desenvolvimento somático, como maturação do SNC. Assim sendo, o critério diagnóstico proposto por nós assegura uma avaliação mais abrangente que apenas características anatômicas e macroscópicas, pois considera também características funcionais. Este método pode ser utilizado para diagnóstico de microcefalia e danos sem a presença de microcefalia em ratos, em diversos modelos experimentais de microcefalia.

Referências

ABUELO, D. Microcephalysyndromes. *SeminPediatrNeurol*, v. 14, n. 3, p. 118-27, 2007.

ARAGAO, M. D. F. V.; VAN DER LINDEN, V.; BRAINER-LIMA, A. M., et al. Clinical features and neuroimaging (CT and MRI) findings in presumed Zika virus related congenital infection and microcephaly: retrospective case series study. *BMJ*, 353: i1901, 2016.

ASHWAL, S. et al. Practice parameter: Evaluation of the child with microcephaly (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology*, v. 73, n. 11, p. 887-97, 2009.

BARCHOVICH, A. J.; PEACOCK, W. Sublobar dysplasia: a new malformation of cortical development. *Neurology*, v. 50, n. 5, p. 1383-7, 1998.

BENTO-SANTOS, A. et al. Critérios para escolha da amostra em experimentos com ratos Wistar. *Resbcal*, v. 1, n. 1, p. 121-129, 2012.

BRAZIL. Integrated guidelines for surveillance and health care in the context of the Public Health Emergency of National Concern (PHEIC): procedures for monitoring changes in growth and development from gestation to early childhood, related to Zika vírus infection and other infectious diseases within the operational capacity of the SUS. Brasília, DF, 2017.a

BRAZIL. Zika vírus in Brazil: the SUS response. Brasília, 2017.b

CASSIDY, G. et al. The development of sensorimotor reflexes in the Brazilian opossum *Monodelphis domestica*. *Brain Behav Evol*, v. 43, n. 4-5, p. 244-53, 1994.

DE PAULA FREITAS, B. et al. Ocular Findings in Infants With Microcephaly Associated With Presumed ZikaVirus Congenital Infection in Salvador, Brazil. *JAMA Ophthalmol*, 2016.

DESESSO, J. M. Comparative features of vertebrate embryology. In: *Developmental and reproductive toxicology. A practical approach*. 2nd ed. Hood R.D. (ed). Taylor & Francis, p. 147-197, 2005.

FOX, W. M. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Anim Behav*, v. 13, n. 2, p. 234-41, 1965.

FRANÇA, G. V. et al. Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. *Lancet*, v. 388, n. 10047, p. 891-7, 2016.

FURUKAWA, S. et al. Microencephaly and microphthalmia in rat fetuses by busulfan. *Histol Histopathol*, v. 22, n. 4, p. 389-97, 2007.

FUTAGI, Y.; TORIBE, Y.; SUZUKI, Y. The grasp reflex and moro reflex in infants: hierarchy of primitive reflex responses. *Int J Pediatr*, v. 2012, p. 191562, 2012.

HAIG, D. Genetic conflicts in human pregnancy. *Q. Rev. Biol.*, v. 68, n. 4, p. 495-532, 1993.

HAZIN, A. N. et al. Computed Tomographic Findings in Microcephaly Associated with Zika Virus. *N Engl J Med*, v. 374, n. 22, p. 2193-5, 2016.

HUANG, L. et al. Mandibulofacial Dysostosis with Microcephaly: Mutation and Database Update. *Hum Mutat*, v. 37, n. 2, p. 148-54, 2016a.

HUANG, W. C. et al. Zika virus infection during the period of maximal brain growth causes microcephaly and corticospinal neuron apoptosis in wild type mice. *Sci Rep*, v. 6, p. 34793, 2016b.

LEAL, M. C. et al. Characteristics of Dysphagia in Infants with Microcephaly Caused by Congenital Zika Virus Infection, Brazil, 2015. *Emerg Infect Dis*, v. 23, n. 8, p. 1253-1259, 2017.

MINER, J. J. et al. Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. *Cell*, v. 165, n. 5, p. 1081-91, 2016.

MOTZ, B. A.; ALBERTS, J. R. The validity and utility of geotaxis in young rodents. *Neurotoxicol Teratol*, v. 27, n. 4, p. 529-33, 2005.

OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELOS, P. F. C. Microcefalia e vírus zika. *J. Pediatr*, v. 92, n. 2, 2016.

SCHULER-FACCINI, L. et al. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly - Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, v. 65, n. 3, p. 59-62, 2016.

SILVA, H. J. et al. Malnutrition and Somatic Development: Application of Protocol of Mensuration to Evaluation of Indicators of Wistar Rats. *Int. J. Morphol.*, v. 24, n. 3, p. 469-474, 2006.

SMART, J. L.; DOBBING, J. Vulnerability of developing brain. II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. *Brain Res*, v. 28, n. 1, p. 85-95, 1971.

VAN DER LINDEN, V. et al. Description of 13 Infants Born During October 2015-January 2016 With Congenital Zika Virus Infection Without Microcephaly at Birth - Brazil. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, v. 65, n. 47, p. 1343-1348, 2016.

VOM-SAAL, F. S. Sexual differentiation in litter-bearing mammals: influence of sex of adjacent fetuses in utero. *J. Anim. Sci.*, v. 67, n. 7, p. 1824-40, 1989.

WHO/CDC/ICBDSR. Birth defects surveillance: a manual for programme managers. Geneva: World Health Organization; 2014.

WOODS, C. G.; PARKER, A. Investigating microcephaly. *Arch. Dis. Child*. v. 98, n. 9, p. 707-13, 2013.