

LEONARDO DE FREITAS SILVA

**Caracterização inovadora da morfologia da
cabeça de bebês nascidos com o vírus zika: uma
inovação metodológica para amplas aplicações
clínicas**

Araçatuba – São Paulo

2020

LEONARDO DE FREITAS SILVA

**Caracterização inovadora da morfologia da
cabeça de bebês nascidos com o vírus zika: uma
inovação metodológica para amplas aplicações
clínicas**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do
Campus de Araçatuba – Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, para
obtenção do Título de DOUTOR EM ODONTOLOGIA
(Área de concentração em Cirurgia e Traumatologia
Bucocomaxilofacial).

Orientador: Prof. Adj. Idelmo Rangel Garcia
Júnior

Araçatuba – São Paulo

2020

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S586r Silva, Leonardo de Freitas.
Caracterização inovadora da morfologia da cabeça de bebês nascidos com o vírus zika : uma inovação metodológica para amplas aplicações clínicas / Leonardo de Freitas Silva. - Araçatuba, 2020
118 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Idelmo Rangel Garcia Júnior

1. Zika virus 2. Microcefalia 3. Face 4. Tomografia
I. T.

Black D7
CDD 617.64

DEDICATÓRIA

Eu dedico esta conquista às pessoas responsáveis pelo que sou hoje como pessoa e cidadão. Aqueles que suportaram e superaram todas as adversidades para que eu pudesse chegar até aqui: **a minha família**.

Ao meu pai (**Alberto Santos Silva**), meu exemplo de honestidade e caráter. A pessoa que sempre fez de tudo pelos seus filhos. Um homem batalhador, que nunca mediu esforços para nos prover a melhor educação. Uma pessoa que sempre incentivou minhas escolhas, um exemplo que tento me espelhar. Ao meu pai, meu herói, meu amigo!

À minha mãe (**Simone de Freitas Silva**), a pessoa que dedicou a vida a seus filhos. Minha primeira professora! A mulher forte, sempre vibrante a cada vitória de seus filhos, e que nunca nos deixou desanimar frente as dificuldades. A pessoa que faz de tudo para que seus filhos realizem seus sonhos.

À minha tia (**Zélia Damiana Guimarães de Freitas**), minha segunda mãe. A pessoa que torce por mim e dedica a vida à sua família. Uma mulher forte, que lutou a vida inteira, servindo de inspiração para mim. É a pessoa que sempre está preocupada com seus sobrinhos, que não mede esforços para ajudar a família.

À minha irmã (**Verônica de Freitas Silva**), a pessoa companheira, que torce por mim e ajuda meus pais na minha ausência. Uma pessoa batalhadora, que serve de inspiração para eu continuar a seguir meus sonhos. Não é apenas uma irmã, mas minha amiga, que luta junto comigo independente da distância.

Aos meus sobrinhos **(Isabella e Lucca)**, que trouxeram alegria imensa as nossas vidas. Mesmo pequeninos desempenham um papel muito importante na minha vida. São as pessoas que tornam a casa dos meus pais mais alegre, preenchendo o quarto vazio que deixei para seguir um sonho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador Prof. Adj. Idelmo Rangel Garcia Júnior. Com certeza sem ele eu não teria chegado até aqui. Foi a pessoa que me aceitou como seu aluno e sempre esteve disponível para me ajudar nesta caminhada. Sempre nos aconselhou com serenidade e incentivou nossos projetos. É um exemplo de professor, procuro me espelhar no seu modo de ensinar. Tenho muito orgulho de ser seu orientando e espero me tornar um professor como o senhor!

Ao Professor Ashraf Ayoub. Não tenho palavras para agradecer ao professor a oportunidade de participar deste trabalho, o qual me proporcionou um crescimento pessoal e profissional. Com o professor Ayoub pude observar um exemplo de pesquisador e líder de equipe de pesquisa. Além disso, minha primeira experiência fora do Brasil se deve ao senhor, permitindo ver o mundo com outros olhos. Tenho o senhor como exemplo para minha vida tanto profissional quanto pessoal!

À Profa. Ass. Dra. Roberta Okamoto, por ser essa pessoa maravilhosa que é. Um exemplo de professora, sempre disposta a ajudar seus alunos. Sou eternamente grato pelos ensinamentos e ajuda nos trabalhos.

Ao Prof. Adj. Osvaldo Magro Filho, pelos ensinamentos e disponibilidade em nos ajudar, sou muito grato por ter sido seu aluno.

Ao Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani. Um exemplo para ser seguido na Cirurgia Buco-Maxilo-Facial. Um professor no verdadeiro sentido da palavra e um

grande amigo que Araçatuba me deu. Sou muito grato por ter a oportunidade de estar junto e aprender muito com você.

À Profa. Dra. Daniela Ponzoni. Sou muito feliz por ter sido seu aluno. Procuro me espelhar na sua simplicidade e disposição na docência. Sempre me deu todo apoio e tornou esta caminhada muito mais fácil. Sou grato por tudo.

À Profa. Ass. Dra. Ana Paula Farnezi Bassi. Um exemplo de determinação para mim. Uma professora batalhadora que faz de tudo para ajudar seus alunos. Sou muito feliz pela oportunidade de ser seu aluno.

Ao Prof. Ass. Dr. Francisley Ávila Souza, pelos ensinamentos nos plantões no hospital, pela disponibilidade empenho em ajudar nos trabalhos. Sou muito grato pela ajuda que tem me dado na minha formação.

Ao Prof. André Luis Fabris, por toda ajuda que recebi desde os tempos em que éramos colegas, inicialmente no mestrado e depois como meu professor no doutorado, sempre dedicado ajudando e ensinando nos plantões. Tenho orgulho de ter sido seu colega e aluno!

À Dra. Adriana Mattos, pela disponibilidade e atenção em nos ajudar a realizar o trabalho. Sou muito grato pela oportunidade de acompanhar o ambulatório do Hospital Roberto Santos, podendo aprender um pouco com o atendimento aos pacientes com microcefalia. Sem você não teria como realizar este trabalho!

Ao Professor Abrahão Cavalcante Gomes de Souza Carvalho. Um grande professor que Fortaleza me deu. Sou imensamente grato pelas oportunidades e orientações que recebi!

Aos meus colegas do doutorado (Erik Neiva, João Paulo, Valthierre Nunes, Ciro Duailibe, Gustavo Momesso, Lara Cervantes e Laís Sara). Sem vocês eu nunca conseguiria chegar até aqui. Sou muito feliz por ter conhecido vocês! São os grandes amigos que Araçatuba me deu!

Aos meus colegas do doutorado (Jonathan Ribeiro, Bruno Mendes e Juliana Zorzi). Sou eternamente grato por toda ajuda que recebi de cada um de vocês! Vocês são grandes amigos que fiz aqui em Araçatuba!

Aos meus amigos Ney Robson e Vinícius Florentino. Dois amigos que Fortaleza me deu. Sou eternamente grato por todo apoio que tenho recebido de vocês.

Aos meus amigos Dante e Emily, que me receberam aqui em Araçatuba e me deram todo apoio tornando essa jornada mais fácil.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pela concessão da Bolsa de doutorado durante o curso. Meus sinceros agradecimentos por promover o apoio financeiro e com isso, permitir que fosse possível a realização do doutorado.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, na pessoa do diretor **Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara** pela oportunidade de realização dos cursos de Mestrado e Doutorado. A cada dia admiro mais esta universidade, pela união e grande esforço para que a tríade fundamental da instituição representada pelo ensino, pesquisa e extensão universitária seja o maior lema desta casa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” com o atual Coordenador **Prof. Adj. André Luiz Fraga Briso**.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada (Dirce, Gilmar, Odair, Tina, Paulo Gratão, Renato, Joilson e Marco). Muito obrigado pelo carinho e respeito.

Aos professores Mossey e Dr. Yang, obrigado por todo o apoio que vocês me deram durante o estudo!

À Universidade de Glasgow por me receber e me permitir participar do estudo.

Epígrafe

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e
nunca se arrepende.”

Leonardo da Vinci

Silva LF. Caracterização inovadora da morfologia da cabeça de bebês nascidos com o vírus zika: uma inovação metodológica para amplas aplicações clínicas [dissertação]. Araçatuba: Unesp – Universidade Estadual Paulista; 2020.

RESUMO

Introdução: A epidemia do vírus Zika em 2016 constituiu uma emergência de saúde pública, com o chamando da OMS para vigilância reforçada na detecção precoce de microcefalia relacionada às condições neurológicas. **Métodos:** Quarenta e quatro crianças infectadas pelo vírus Zika foram avaliadas e comparadas com crianças saudáveis com o objetivo de identificar as medidas mais confiáveis do formato e tamanho da cabeça, explorando o relacionamento entre fenótipo craniofacial e anormalidades cerebrais. A análise de componentes principais (ACP) foi utilizada para identificar padrões de variação na morfologia craniofacial. As seguintes medições adicionais da abóboda craniana foram realizadas; altura cefálica (AC), comprimento cefálico (ComC), circunferência cefálica (CC) e ângulo naso-frontal (ANF). O nível de anormalidade cerebral presente nas tomografias, a gravidade da perda de volume do parênquima cerebral e ventriculomegalia foram classificadas como leve, moderada ou grave. **Resultados:** Os 12 primeiros componentes principais das abóbodas analisadas explicaram 91% da variação da abóboda craniana. Correlações significativas foram detectadas entre a pontuação do segundo CP da abóboda craniana e CC (+0,66), AC (+0,87), ComC (+0,80) e ANF (-0,48). **Conclusão:** Este estudo recomenda mensurar a AC em pacientes com infecção pelo vírus Zika, em vez de CC como recomendado pela OMS, para melhorar a sensibilidade e especificidade da detecção precoce.

Palavras-chave: Zika vírus; Microcefalia; Face; Tomografia.

Silva LF. Novel Characterization of Head Morphology of Infants Born with Zika Virus: A Methodological Innovation for Broad Clinical Applications [dissertação]. Araçatuba: Unesp – Universidade Estadual Paulista; 2020.

ABSTRACT

Background: The 2016 Zika virus epidemic constituted a public health emergency, with the WHO calling for strengthened surveillance for the early detection of related microcephaly and associated neurological conditions. Methods: We analysed 44 Zika infected infants and matched controls to identify the most reliable measurements of head shape and size and explore the relationship between craniofacial phenotype and brain abnormalities. Principal component analysis (PCA) was applied to identify patterns of variation in the craniofacial morphology of Zika cases relative to controls. We carried out the following additional measurements of the cranial vault, the head circumference (HC), head height (HH), head length (HL) and naso-frontal-angle (NFA). The level of brain abnormality present in the CT scans, mainly the severity of parenchymal volume loss and ventriculomegaly, was classified as being mild, moderate or severe. Results: The first 12 PCs of the vaults we analysed explained 91% of the variation of the cranial vault between Zika cases and controls. Significant correlations were detected between the score of the 2nd PC of the cranial vault and HC (+0.66); HH (+0.87); HL (+0.80) and NFA (-0.48). Conclusion: We recommend measuring HH in Zika patients, rather than HC as recommended by WHO, to improve the sensitivity and specificity of early detection.

Keywords: Zika Virus. Microcephaly. Face. Tomography.

LISTAS E SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem capturada da cabeça dos bebês usando o sistema de imagem por estereofotogrametria Di3D.

48

Figura 2 – Ilustração das medidas da abóbada craniana.

49

Figura 3 – A forma facial 3D de uma criança com zika (máscara vermelha) e de um controle saudável compatível com a idade (branco). As imagens destacam a fronte proeminente vista em bebês com Zika.

50

Figura 4 – Variações de -2α (esquerda) a 2α (direita) do segundo CP da abóbada craniana adicionadas à abóbada craniana média (meio); e variações de -2α (esquerda) a 2α (direita) do segundo PC da face adicionadas à face média (meio).

51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Correlações significativas entre escores de CP, medidas da cabeça e anormalidades cerebrais (Rho de Spearman $p < 0,05$, * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$) no grupo Zika.

45

Tabela 2. Correlações significativas entre escores de CP e medidas da cabeça (Rho de Spearman $p < 0,05$, * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$) no grupo Controle.

46

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------|--------------------------------------|
| AC | = Altura Cefálica |
| ACP | = Análise do Componente Principal |
| AGP | = Análise Generalizada de Procrustes |
| ANF | = Ângulo Naso-Frontal |
| APP | = Análise Parcial de Procrustes |
| CC | = Circunferência Cefálica |
| ComC | = Comprimento Cefálico |
| CP | = Componente Principal |
| EUA | = Estados Unidos da América |
| IG | = Imunoglobulina |
| OMS | = Organização Mundial da Saúde |
| RM | = Ressonância Magnética |
| SCZ | = Síndrome Congênita do Zika Vírus |
| TC | = Tomografia Computadorizada |
| 3D | = Três Dimensões |

SUMÁRIO

| | |
|---------------------|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 22 |
| 2 MÉTODOS | 25 |
| 3 RESULTADOS | 29 |
| 4 DISCUSSÃO | 33 |
| 5 CONCLUSÃO | 39 |
| REFERÊNCIAS | 41 |
| ANEXOS | 53 |

*Caracterização inovadora da morfologia da cabeça de bebês
nascidos com o vírus zika: uma inovação metodológica para
amplas aplicações clínicas*

**Este trabalho foi formatado de acordo com as normas do periódico the New England Journal of Medicine (Anexo B)*

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O surto repentino da infecção pelo vírus Zika em 2016 levantou uma grave preocupação global, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou emergência internacional de saúde pública para aumentar a conscientização sobre esta epidemia ¹. Também foi solicitado apoio no aumento e fortalecimento dos sistemas de vigilância em países com casos notificados de microcefalia relacionada ao vírus Zika e outras condições neurológicas associadas ¹. Atualmente 51 países relataram um surto de infecção pelo vírus Zika ². A epidemia foi particularmente grave na região nordeste do Brasil, onde ocorreram 97% das infecções pelo vírus Zika do país ³. Essa área também responde por 28% de todos os nascimentos no Brasil ³.

O vírus Zika é transmitido principalmente pelos mosquitos *Aedes aegyptis*, através de sua picada, e pode ser detectado no fluido de mães grávidas e no cérebro de recém-nascidos com microcefalia durante autópsia ⁴⁻⁶. Sabe-se que a infecção de mães grávidas pelo vírus Zika aumenta o risco de seus fetos desenvolverem microcefalia, bem como uma grande variedade de outras anormalidades cerebrais ⁶. Como resultado, a circunferência cefálica (CC) dos bebês é rotineiramente medida para identificar a Síndrome Congênita do Zika Vírus (SCZ). A medida da CC é utilizada como um dos padrões para avaliação do crescimento infantil pela OMS ⁷. Microcefalia é definida como uma CC inferior a dois desvios-padrões abaixo da média ¹. Para identificar rapidamente os defeitos congênitos do Zika, recomenda-se que a CC do bebê seja medida antes das 24 horas de idade, independentemente dos resultados dos exames laboratoriais. No entanto, foi relatado que aproximadamente 20% das crianças com CC normal desenvolvem microcefalia em um estágio posterior ⁸. Curiosamente, a

literatura confirma que cerca de 20% desses casos apresentavam valores normais de CC⁹.

A equipe responsável por este estudo acredita que os atuais critérios de diagnóstico para microcefalia, com base nas medidas de CC, são inespecíficos e lançam uma rede muito ampla para identificar casos reais. Neste estudo foi pesquisado se novos métodos morfométricos podem melhorar a sensibilidade e a especificidade da vigilância da SCZ, para permitir que 20% das crianças atualmente identificadas como normais sejam diagnosticadas corretamente, melhorando desse modo a precisão da triagem de pacientes com microcefalia e proporcionando o reconhecimento precoce dos bebês afetados. Com esse objetivo, foi obtido um fenótipo da morfologia craniofacial de bebês nascidos com microcefalia devido à infecção pelo vírus Zika e foi analisado o método mais confiável para a triagem, medindo a forma e o tamanho da cabeça. Também foi avaliada a relação entre o fenótipo craniofacial e o grau de anormalidade cerebral nesses bebês usando dados de tomografia computadorizada.

MÉTODOS

2 MÉTODOS

Aprovação do comitê de ética

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, São Paulo Brasil, sob número de protocolo CAAE 60031216.4.0000.5420. Todos os responsáveis pelos pacientes assinaram um termo de consentimento autorizando a realização do estudo e a publicação dos resultados seguindo os protocolos médicos e éticos da declaração de Helsinque, 2013.

Pacientes

As imagens em 3D da morfologia craniofacial de 44 bebês infectados com o vírus Zika (com idades entre 10 e 21 meses) e de 44 bebês saudáveis de acordo com a idade (captura de imagem descrita abaixo) foi obtida de pacientes do Hospital Geral Roberto Santos, Salvador, Bahia, Brasil. Além disso, o hospital forneceu a tomografia computadorizada do crânio pós-natal dos 44 casos de Zika, capturadas por um scanner de 16 seções (Siemens Healthcare, Erlangen, Alemanha). A avaliação preliminar dos casos de infecção pelo vírus zika foi realizada através da mensuração da CC com uma fita métrica. Todas as crianças do grupo Zika tiveram teste sorológico positivo para infecção pelo vírus Zika.

Captura das imagens

As imagens 3D foram capturadas por um sistema móvel de imagem por estereofotogrametria 3D (Di3D, Dimensional Image Ltd, Hillington, Reino Unido). Múltiplas imagens da face foram capturadas, incluindo os perfis direito e esquerdo, a abóboda do crânio e a parte posterior da cabeça (Figura 1). Uma touca elástica descartável personalizada foi usada durante a captura da imagem. Os modelos

craniofaciais 3D de 360 graus foram reconstruídos usando um software especialmente projetado para essa finalidade (Figura 1).

Para este trabalho foram utilizadas malhas genéricas, que consistem em máscaras matemáticas da face e do crânio formadas por 7461 "vértices" de pontos indexados (7145 vértices para a máscara facial e 316 vértices para a máscara craniana). Primeiro as malhas genéricas foram conformadas para se parecer com as características 3D da morfologia craniofacial usando um programa de software de conformação¹⁰. A precisão da conformação da imagem 3D foi previamente avaliada e verificada¹¹.

A Análise Parcial de Procrustes (APP) é um método matemático¹² que foi aplicado para obter uma média matemática da face de bebês do grupo Zika e controle. A análise Generalizada de Procrustes (GPA) foi utilizada para sobrepor as malhas conformadas da abóbada craniana e a face dos grupos Zika e Controle com escala¹²⁻¹³. Isso permitiu que variações na morfologia craniofacial dos casos de Zika em relação aos controles fossem investigadas, independentemente das diferenças de tamanho envolvidas.

Em seguida, as malhas craniofaciais sobrepostas ao GPA foram analisadas e os componentes principais (CP) foram calculados usando a análise de componentes principais (ACP) para identificar padrões de variação na morfologia craniofacial dos casos de Zika em relação aos controles. O teste *t* de Student (no nível de significância de 0,05) foi usado para comparar as pontuações dos principais componentes dos casos de Zika com controles pareados por idade.

As seguintes medições adicionais da abóboda craniana foram realizadas (Figura 2):

A. Circunferência cefálica (CC), que é rotineiramente medida do ponto mais anterior da fronte até o ponto mais posterior da parte de trás da cabeça;

b. A altura cefálica (AC), que é a distância de orelha a orelha através do ponto mais alto da abóbada do crânio;

c. O comprimento cefálico (ComC), que mede a distância ântero-posterior da abóbada craniana, da fronte, através do ponto mais alto da abóbada craniana, até o ponto mais proeminente do osso occipital;

d. O ângulo naso-frontal (ANF) entre os três pontos: Pronasale-Nasion-Glabella.

Todas as medições foram repetidas após uma semana por um operador experiente para avaliar sua reprodutibilidade.

Análise tomográfica

Um radiologista pediatra avaliou as tomografias usando o Horos, um visualizador de imagens médicas de formato DICOM gratuito. O radiologista categorizou o nível de anormalidade cerebral presente nas tomografias, principalmente a gravidade da perda de volume do parênquima cerebral e ventriculomegalia, como leve, moderada ou grave, de acordo com Oliveira-Szejnfeld et al. 2016¹⁴. Em seguida, as características clínicas de cada indivíduo e a relação entre o fenótipo craniofacial e a extensão das anormalidades cerebrais foram avaliadas usando o teste estatístico Rho de Spearman.

RESULTADO

3 RESULTADOS

Este é um estudo prospectivo não-randomizado. Os erros produzidos pela medida repetida de CC, AC (altura cefálica) e ComC (comprimento cefálico) foram inferiores a 0,2 mm. O erro de digitalização dos pontos de referência repetidos foi inferior a 0,5 mm. Houve diferença significativa nos valores de CC, AC, ComC e ANF (ângulo naso-frontal) dos casos de zika, em relação aos controles pareados por idade ($p = 0,0000$, $<0,05$, teste t de Student). Conforme calculado a partir da análise de sobreposição da APP, o formato médio da abóbada craniana foi significativamente menor nos casos de zika em relação aos controles (Figura 3).

Os 12 primeiros componentes principais das abóbodas analisadas explicaram 91% da variação da abóboda craniana, com contribuições individuais variando de 33% (CP1) a 1% (CP12). Após a correção de Bonferroni para testes múltiplos, essa análise identificou uma diferença significativa ($p = 0,0000$, $<0,0042$) nas pontuações do segundo componente principal nos casos de Zika em relação aos controles. Não foram encontradas diferenças significativas nos escores dos outros componentes principais entre esses dois grupos.

Os dezesseis primeiros componentes principais explicaram 86% da variação da forma facial, com contribuições individuais variando de 24% (para CP1) a 1% (para CP16). Os demais componentes principais contribuíram com $<1\%$. O teste t de duas amostras, seguido da correção de Bonferroni para testes múltiplos, revelou uma diferença significativa ($p = 0,0000$ $<0,0031$) entre as pontuações do segundo componente principal nos casos de Zika em relação aos controles; não foram identificados outros diferenciais significativos nas pontuações dos principais

componentes. A Figura 4 mostra as variações de -2α a 2α do segundo CP da abóbada craniana e da face. Esta análise mostrou que a abóbada craniana do grupo Zika estava subdesenvolvida (plana) em comparação com o controle, e o ANF do grupo Zika foi maior que a do controle.

As imagens tomográficas foram avaliadas por um radiologista pediátrico. A análise por TC revelou perda de volume do parênquima cerebral em pacientes com Zika, sendo leve em 25% dos casos, moderada em 22% e grave em 53%. Também foi observada ventriculomegalia secundária (ventrículos aumentados) devido a anormalidades cerebrais em pacientes com Zika, sendo leves em 28% dos casos, moderados em 41% e graves em 28%. Os ventrículos cerebrais normais estavam presentes em 3% dos casos de Zika. Desenvolvimento cortical anormal também foi evidente em todos os casos de Zika, mas com uma ampla gama de variações. A calcificação estava predominantemente presente na interface substância cinzenta - substância branca. Os coeficientes de correlação Spearman mostraram uma forte correlação (0,69) entre perda de volume do parênquima e ventriculomegalia, e uma correlação significativa entre a perda de volume do parênquima e a CC (-0,53), a AC (-0,48) e ComC (-0,39) (Tabela 1). Houve uma correlação significativa (-0,50, $p = 0,0007$) entre a gravidade da perda de volume do parênquima e os tamanhos centróides da abóbada craniana. Esta análise sugere que a gravidade da perda de volume parenquimatosa está negativamente correlacionada com o tamanho da abóbada craniana dos casos de infecção pelo vírus Zika. Também foi detectada correlação significativa (-0,48, $p = 0,0023$) entre a gravidade da perda de volume do parênquima e os escores do segundo CP da abóbada craniana (Tabela 1).

As correlações entre a forma e medições da cabeça foram investigadas. Nos casos de Zika, foram detectadas correlações significativas (+0,76) entre a pontuação do segundo componente principal e o tamanho do centróide da abóbada craniana. Correlações significativas também foram detectadas entre a pontuação do segundo componente principal da abóbada craniana e CC (+0,66), AC (+0,87), ComC (+0,80) e ANF (-0,48).

No grupo controle, uma correlação significativa (+0,58) foi detectada entre a pontuação do segundo componente principal e o tamanho do centróide da abóbada craniana. Correlações significativas também foram detectadas entre o escore do segundo componente principal da abóbada craniana e CC (+0,33), AC (+0,82), ComC (0,62) e ANF (-0,42) (Tabela2).

DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

A infecção pelo vírus Zika é uma das epidemias infecciosas globais mais desafiadoras nos últimos anos ¹⁵. Portanto, este estudo pretendeu explorar uma melhor medida da cabeça para a triagem dos bebês com microcefalia devido à infecção pelo vírus Zika.

Os achados do presente estudo revelaram diferenças estatisticamente significantes na morfologia facial e na forma da abóbada craniana dos casos de infecção pelo Zika em relação a bebês saudáveis, conforme detectado pelo segundo componente principal da ACP das formas sobrepostas pelo AGP. Também foi detectada uma correlação significativa entre a medida da cabeça e a abóbada craniana (microcefalia). Os resultados do presente estudo mostraram que a medida mais significativa e sensível foi a AC, que apresentou fortes correlações (+0,87 no grupo Zika e +0,82 no grupo Controle) para os escores dos segundos componentes principais da abóbada craniana, onde apresentou as características significativas de diferença entre as formas dos grupos estudados. Além disso, foi detectada uma correlação significativa entre a magnitude da deformidade craniana e a gravidade da perda de volume do parênquima. Entretanto, a presente análise revelou que a CC e a morfologia craniana estão correlacionadas em +0,66 no grupo Zika e fracamente correlacionadas (+0,33) no grupo controle. Os resultados deste estudo mostram que a CC não é a melhor medida correlacionada com a morfologia craniana distinta.

É uma rotina para os pediatras medir a CC de lactentes e crianças pequenas e comparar essas medidas com as informações fornecidas pelo Centro Nacional de Estatísticas de Casos em Saúde do Centro de Controle e Prevenção de Doenças ¹⁶ e

com os gráficos de crescimento da OMS ⁷. No entanto, uma variação significativa no CC existe entre os grupos étnicos ^{3,17}. Por exemplo, bebês malaios e chineses têm uma CC significativamente maior em comparação com crianças indianas na coorte de nascimentos. Além disso, o método existente usado para medir a CC (uma fita métrica) falha em considerar o formato da abóbada craniana e, portanto, não discrimina entre a microcefalia que é devida ao baixo peso ao nascer e à microcefalia das síndromes craniofaciais ¹⁸. O método atual de medição da CC também não descreve a morfologia do vértice da abóbada craniana, nem discrimina entre tamanho pequeno e um crânio deformado.

Um novo achado deste estudo é que existe uma forte correlação entre a morfologia craniana dos casos de Zika e as novas medidas de AC e, em menor grau, o ComC, que fornecem medidas sensíveis do vértice da abóbada craniana nos bebês infectados pelo vírus Zika. Esta é uma descoberta lógica. As novas medições abrangem a forma da abóbada craniana. A medida padrão da CC não captura as características morfológicas do vértice da abóbada do crânio, que geralmente é afetada em uma ampla gama de síndromes craniofaciais ³. As novas medições podem detectar com mais robustez uma variedade de anomalias craniofaciais e podem melhorar a sensibilidade da detecção de microcefalia. Isso é de suma importância, porque os achados deste estudo mostram que a gravidade da microcefalia se correlaciona com a gravidade das anormalidades cerebrais.

França et al. ³ relataram anteriormente que 20% dos pacientes da infectados pelo vírus Zika estão associados a uma CC dentro da faixa normal, de acordo com o gráfico internacional de crescimento fetal e recém-nascido da OMS. Moore et al

(2017)¹⁹ destacaram anteriormente a importância dos pediatras reconhecerem o fenótipo craniofacial dos casos de Zika para garantir sua avaliação e acompanhamento apropriados e oportunos. As descobertas deste estudo podem facilitar a realização desse importante objetivo. Com base nos resultados, é provável que uma proporção de casos infectados com Zika não tenha sido detectada suficientemente cedo devido às limitações da triagem para microcefalia usando apenas o protocolo recomendado pela OMS de CC. Um achado interessante a emergir deste trabalho é o aumento do ângulo naso-fontal (ANF) dos casos de Zika. Os resultados mostram que a medida ANF pode discriminar casos de vírus Zika do grupo controle. Isso não foi relatado anteriormente na literatura e promete ser uma medida robusta e confiável a ser usada no rastreamento da microcefalia relacionada ao zika.

As imagens de tomografia computadorizada mostraram uma ampla variedade de anormalidades em bebês infectados com Zika, incluindo calcificações subcorticais, afinamento cortical, padrão girial anormal, diminuição da mielinização, ausência de calosidade corporal, hipoplasia cerebelar, fechamento anterior fontanela e atrofia cerebral^{20, 21}. De fato, a dismorfologia craniofacial refletiu a gravidade da perda de volume do parênquima associada, o que é um novo achado deste estudo. Assim, os resultados destacam os benefícios clínicos da utilização de imagens craniofaciais 3D não invasivas como ferramenta de triagem para bebês. Este trabalho também destaca o potencial do uso amplo de estereofotogrametria não invasiva para capturar a morfologia craniana e facial de outras síndromes craniofaciais.

Uma tentativa anterior para a obtenção de um fenótipo de bebês com infecção pelo vírus Zika foi realizada, em três das maiores séries de casos que relatam 35, 48 e

104 bebês com síndrome congênita do vírus Zika, nos quais dois terços dos bebês tinham microcefalia grave^{22, 23, 24}. Em 75% desses casos, a região occipital era proeminente. Assim, a medição de rotina do CC do osso frontal à proeminência occipital, em torno da circunferência do crânio acima das orelhas, desconsiderando a abóbada do crânio, pode não fornecer uma medida precisa da microcefalia, porque a proeminência do osso occipital camufla microcefalia subjacente. As novas medidas apresentadas neste estudo, incluindo AC e ComC, eliminariam essa fonte potencial de erro de medição ao avaliar o tamanho da cabeça. As medições proporcionam uma melhoria distinta na avaliação da abóboda craniana²⁵.

Deve-se ainda enfatizar que a ausência de microcefalia ao nascimento não exclui a possibilidade de infecção congênita pelo vírus Zika. Este estudo demonstra que a perda de volume do parênquima está significativamente associada à dismorfologia da abóbada craniana. Como a gravidade da microcefalia está diretamente relacionada ao dano neurológico subjacente, também pode ser usado como um indicador prognóstico da gravidade do dano neurológico e da provável resposta do paciente a várias modalidades de tratamento. A imagem em 3D da abóboda craniana de um paciente também pode informar os médicos sobre a extensão de suas anormalidades cerebrais, o que pode ajudar a classificar os casos, de acordo com a gravidade, para um protocolo de acompanhamento especializado. Os métodos aqui relatados para a captura e análise 3D da morfologia craniofacial também podem ser usados para avaliar uma variedade de anomalias craniofaciais, incluindo escafocefalia, trigonocefalia e braquicefalia, além de facilitar o monitoramento do desenvolvimento craniofacial e a

avaliação de várias abordagens de tratamento, incluindo a remodelação da abóboda craniana, avanço fronto-orbital e suturectomia.

Os autores reconhecem que o presente estudos estudo tem algumas limitações, que incluem o pequeno tamanho da amostra e a disponibilidade limitada de tomografias para apoiar a imagem 3D da morfologia craniofacial. O estudo foi limitado àqueles diagnosticados com infecção pelo vírus Zika e microcefalia, e permanece incerto se os casos com infecção pelo vírus Zika que não tinham um diagnóstico tradicional de microcefalia foram incluídos na coorte.

CONCLUSÃO

5 Conclusão

Os resultados também mostram que a medida mais sensível e discriminatória da gravidade da deformidade craniana nesses bebês foi a medida transversal da distância orelha a orelha (AC). A recomendação deste estudo é que a OMS considere revisar suas diretrizes para o diagnóstico de microcefalia alterando de uma medida craniana circunferencial para transversal.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Centers for Disease Control and Prevention. Congenital zika syndrome and other birth defects <https://www.cdc.gov/pregnancy/zika/testing-follow-up/zika-syndrome-birth-defects.html> (2020).
2. Centers for Disease Control and Prevention. All countries and territories with active Zika virus transmission <http://www.cdc.gov/zika/geo/active-countries.html> (2020).
3. França, G. V. et al. Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 live-births with complete investigation. *Lancet* 388, 891-897 (2016).
4. Calvet, G. et al. Detection and sequencing of Zika virus 438 from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect. Dis.* 16, 653-660 (2016).
5. Brasil, P. et al. Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro. *N. Engl. J. Med.* 375, 2321-2334 (2016).
6. Melo, A. S. et al. Congenital Zika virus infection: beyond neonatal microcephaly. *JAMA Neurol.* 73, 1407-1416 (2016).
7. World Health Organization. WHO child growth standards: head circumference-for-age, arm circumference-for-age, triceps skinfold-for-age and subscapular skinfold-for-age: methods and development <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43706> (2020).
8. Victora, C. G. et al. Microcephaly in Brazil: how to interpret reported numbers? *Lancet* 387, 621-624 (2016).
9. Silva, A. A. M. et al. Early growth and neurological outcomes of infants with probable congenital Zika virus syndrome. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 1953-1956 (2016).
10. Ju, X. & Siebert, J. P. Conforming generic animatable models to 3D scanned data. *Proceedings: 6th Numerisation 3-D/Scanning* (2001).

11. Almkhatar, A., Khambay, B., Ju, X., McDonald, J. & Ayoub, A. Accuracy of generic mesh conformation: the future of facial morphological analysis. *JPRAS Open* 14, 39-48 (2017).
12. Dryden, I. L. & Mardia, K. *Statistical shape analysis*. New York, Wiley, 1998.
13. Hammond, P. et al. 3D Analysis of Facial Morphology. *Am. J. Med. Genet. A* 126A, 339–348 (2004).
14. Oliveira-Szejnfeld, P. S. et al. Congenital brain abnormalities and Zika virus: what the radiologist can expect to see prenatally and postnatally. *Radiology* 281, 203-218 (2016).
15. Sulleiro, E. et al. The challenge of the laboratory diagnosis in a confirmed congenital Zika virus syndrome in utero: a case report. *Medicine* 98, e15532 (2019).
16. Centers for Disease Control and Prevention. Growth charts. <http://www.cdc.gov/growthcharts/> (2020).
17. Boo, N., Lye, M. & Ong L. Intrauterine growth of liveborn Malaysian infants between gestation of 28 to 42 weeks. *Singapore Med. J.* 35, 163-166 (1994).
18. Sutan, R. et al. Trend of head circumference as a predictor of microcephaly among term infants born at a regional Centre in Malaysia between 2011-2015. *Dovepress* 8, 9-17 (2018).
19. Moore, C. A. et al. Characterizing the pattern of anomalies in congenital Zika syndrome for pediatric clinicians. *JAMA Pediatr.* 171, 288-295 (2017).
20. Melo A. S. et al. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 47, 6-7 (2016).

21. Sarno, M. et al. Progressive lesion of the central nervous system in microcephalic features with suspected congenital Zika virus syndrome. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 50, 717-722 (2017).
22. Microcephaly Epidemic Research Group. Microcephaly in infants, Pernambuco State, Brazil, 2015. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 1090-1093 (2016).
23. Schuler-Faccini, L. et al. Possible association between Zika virus infection and microcephaly. Brazil, 1015. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 65, 59–62 (2016).
24. Silva AAM, Ganz JSS, Sousa PS, et al. Early growth and neurological outcomes of infants with probable congenital Zika virus syndrome, *Emerging infectious diseases.* 22, 1953-1956 (2016).
25. Martini, M., Klausning, A., Lüchters, G., Heim, N. & Messing-Jünger, M. Head circumference - a useful single parameter for skull volume development in cranial growth analysis? *Head Face Med.* 14, 3 (2018).

TABELAS

Tabela 1. Correlações significativas entre escores de CP, medidas da cabeça e anormalidades cerebrais (Rho de Spearman $p < 0,05$, * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$) no grupo Zika

| | Centróide A | CC | AC | ComC | ANF | PVP | VM |
|--------------------|--------------------|-----------|-----------|-------------|------------|------------|-----------|
| PC2 Abóboda | 0.76** | 0.66** | 0.87** | 0.80** | -0.48* | -0.48* | |
| PC2 Face | 0.34 | | | | | | |
| Centróide F | 0.50* | | | | | | |
| Centróide A | | 0.96** | 0.90** | 0.92** | -0.44 | -0.50* | -0.48* |
| CC | | | 0.87** | 0.86** | -0.35 | -0.53* | |
| AC | | | | 0.84** | -0.47* | -0.48* | |
| ComC | | | | | -0.44* | -0.39 | |
| PVP | | | | | | | 0.69** |

AC: Altura cefálica; **CC:** Circunferência cefálica; **ComC:** Comprimento cefálico;
Centróide F: Centróide da face; **Centróide A:** Centróide da abóboda craniana; **CP2:** Segundo componente principal; **ANF:** Ângulo naso-frontal; **PVP:** Perda do volume do parênquima; **VM:** Ventriculomegalia.

Tabela 2. Correlações significativas entre escores de CP e medidas da cabeça (Rho de Spearman $p < 0,05$, * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$) no grupo Controle.

| | Centróide A | CC | AC | ComC | ANF |
|--------------------|--------------------|-----------|-----------|-------------|------------|
| PC2 Abóboda | 0.58** | 0.33 | 0.82** | 0.62** | -0.42 |
| PC2 Face | | | | | |
| Centróide F | 0.66* | 0.67** | | 0.50 | |
| Centróide A | | 0.90** | 0.75** | 0.80** | -0.40 |
| CC | | | 0.54** | 0.69** | |
| AC | | | | 0.57** | -0.47* |
| ComC | | | | | |

AC: Altura cefálica; **CC:** Circunferência cefálica; **ComC:** Comprimento cefálico; **Centróide F:** Centróide da face; **Centróide A:** Centróide da abóboda craniana; **CP2:** Segundo componente principal; **ANF:** Ângulo naso-frontal; **PVP:** Perda do volume do parênquima; **VM:** Ventriculomegalia.

FIGURAS

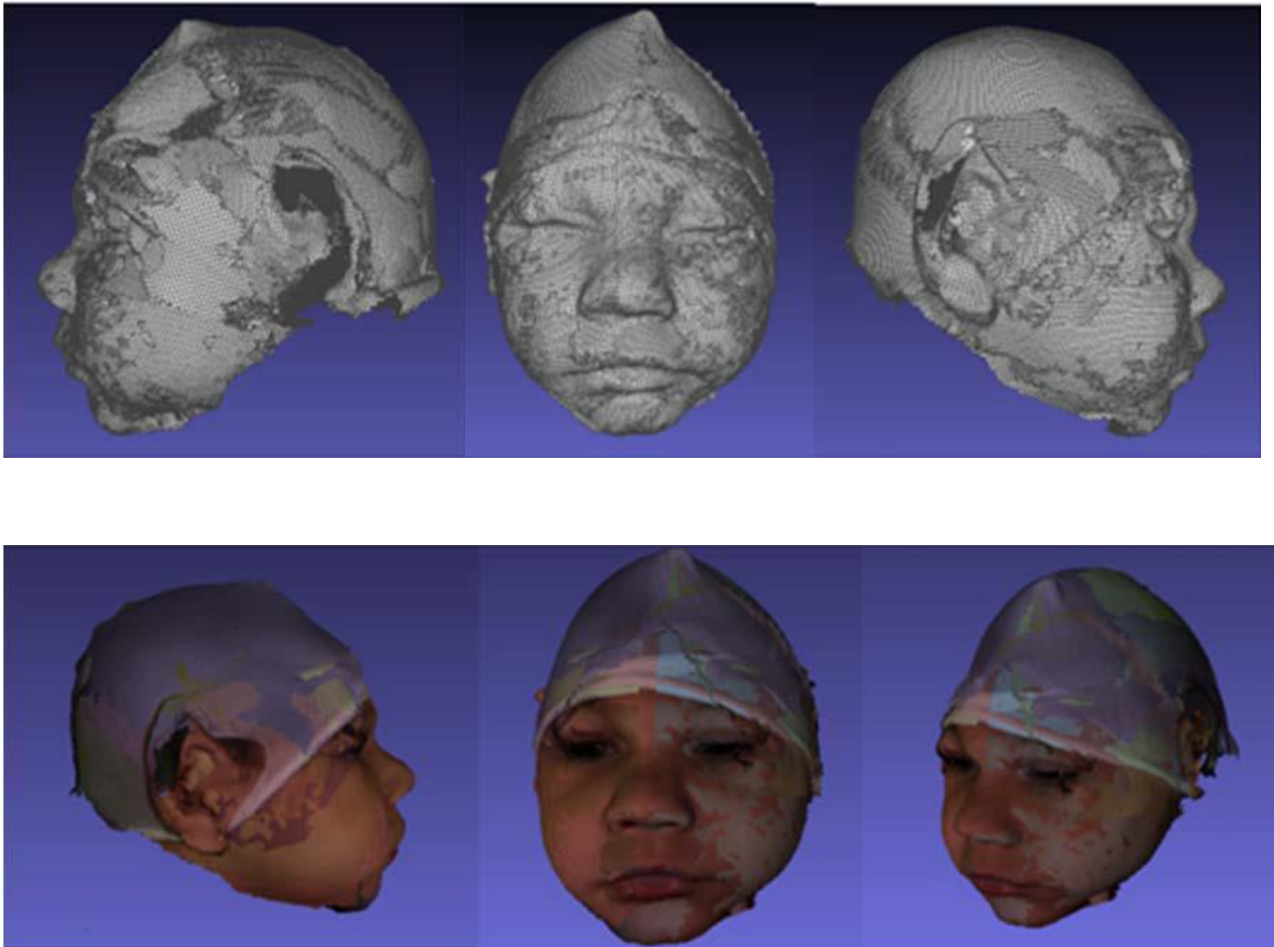


Figura 1 – Imagem capturada da cabeça usando o sistema de imagem por estereofotogrametria Di3D.

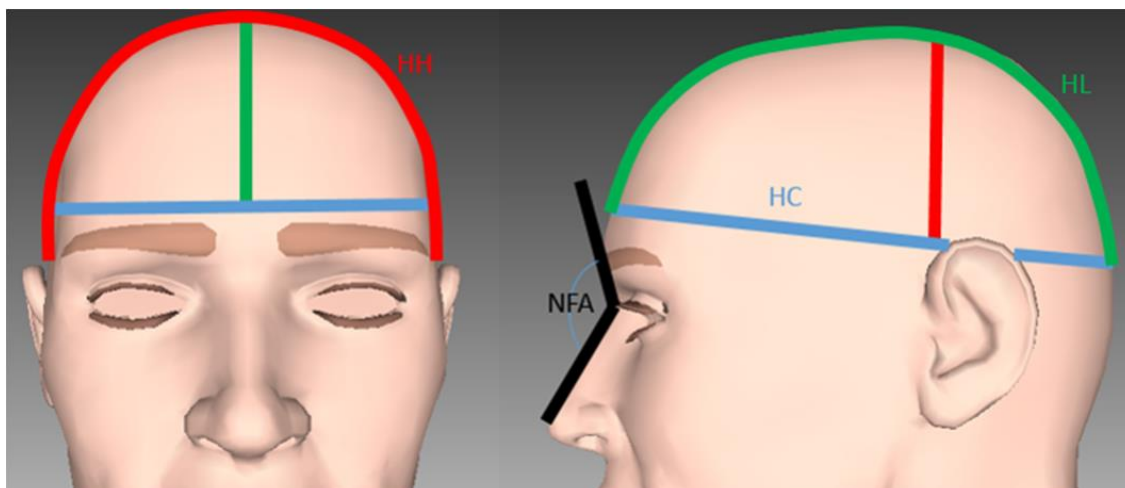


Figura 2 – Ilustração das medidas da abóbada craniana.

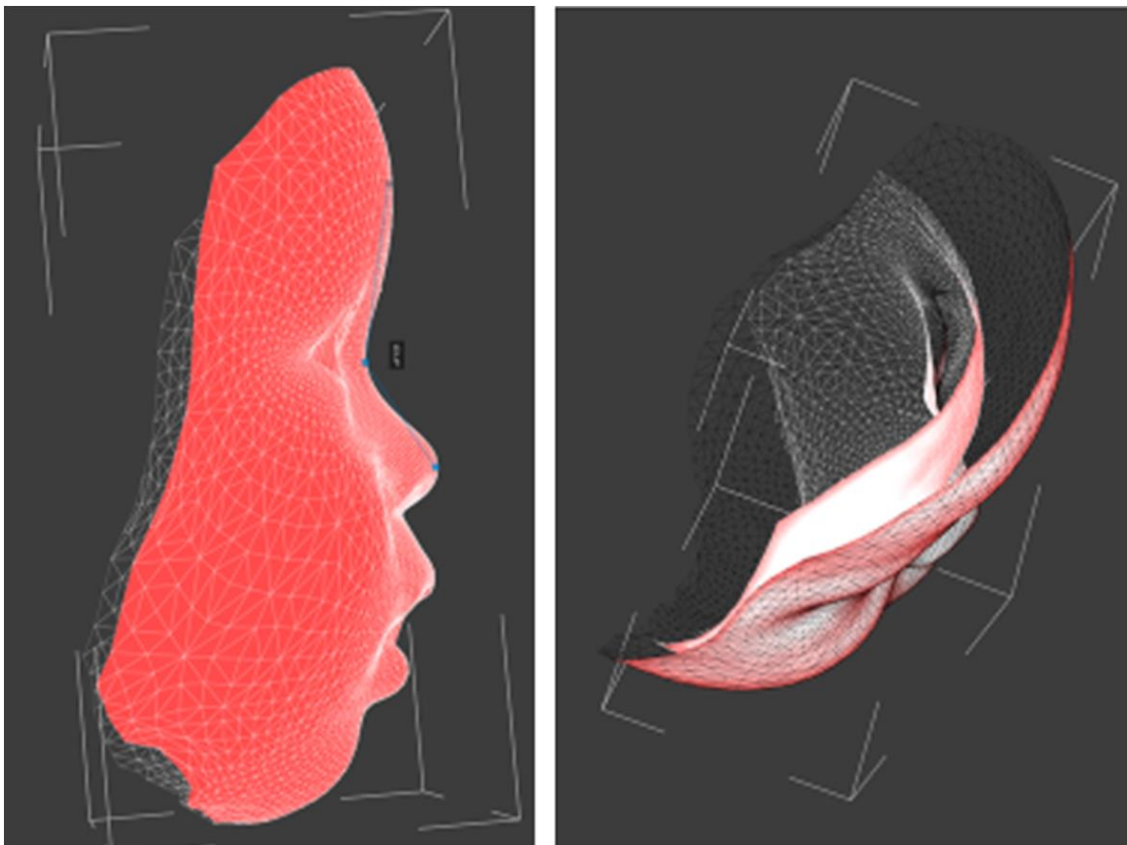


Figura 3 – A forma facial 3D de uma criança com zika (máscara vermelha) e de um controle saudável compatível com a idade (branco). As imagens destacam a fronte proeminente vista em bebês com Zika.

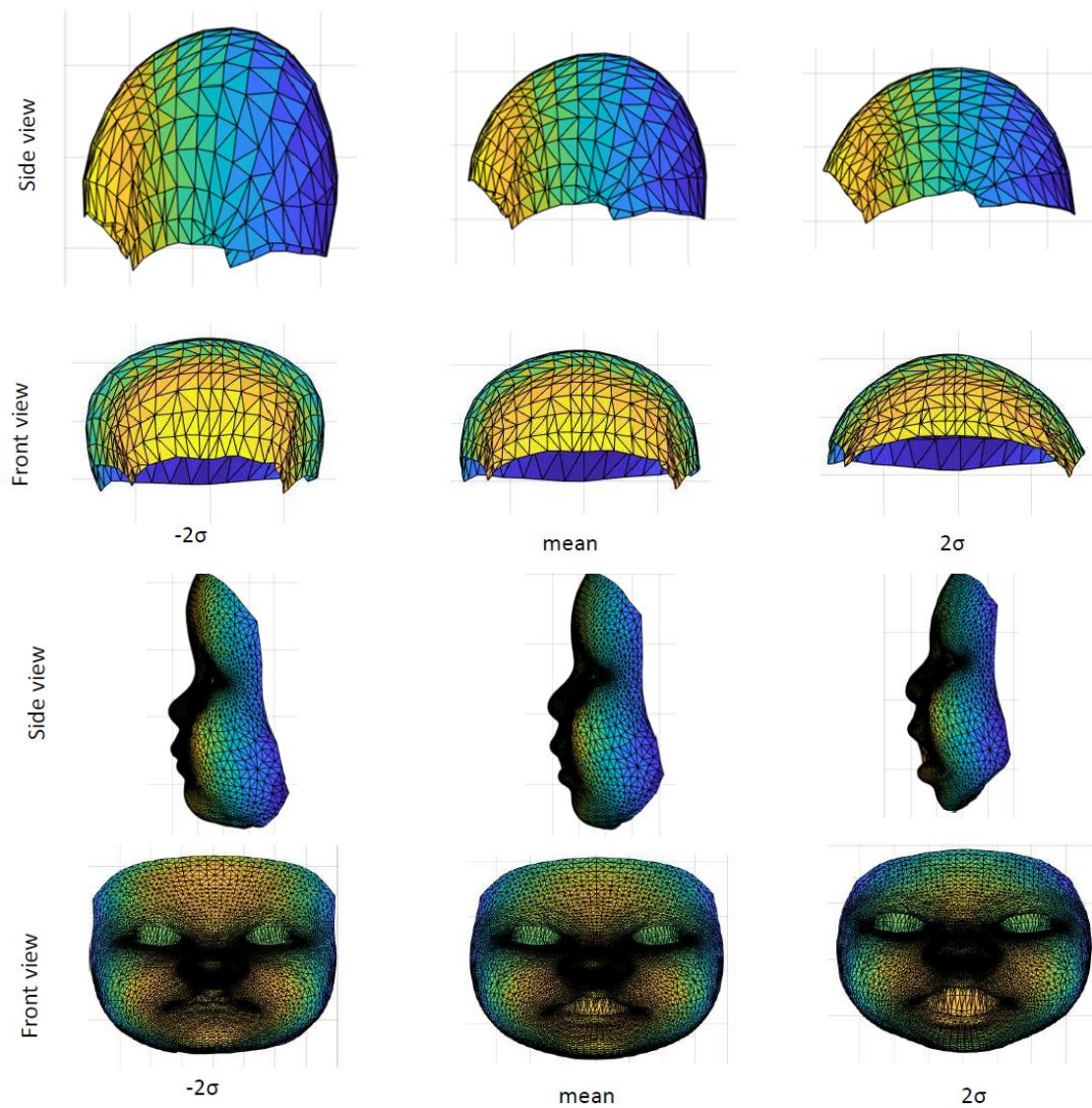


Figura 4 – Variações de -2α (esquerda) a 2α (direita) do segundo CP da abóbada craniana adicionadas ao valuto craniano médio (meio); e variações de -2α (esquerda) a 2α (direita) do segundo PC da face adicionadas à face média (meio).

ANEXO

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Resposta global à epidemia de vírus Zika: a caracterização matemática da morfologia facial

Pesquisador: Leonardo de Freitas Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 60031216.4.0000.5420

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.807.671

Apresentação do Projeto:

Com o projeto de pesquisa pretende-se desenvolver um sistema de classificação estatística com sensibilidade superior a 90% e especificidade para o reconhecimento e quantificação de alterações faciais de pacientes com microcefalia. Para tal 84 pacientes participarão deste estudo. 42 pacientes normais e 42 com alterações decorrentes pela infecção por Zika vírus. Os pacientes serão fotografados para a aquisição de uma imagem tridimensional (3D) da face para o estudo de modelos de superfície densa de variação do formato do rosto dos grupos dos pacientes. Esses arquivos serão comparados entre os dois grupos para evidenciar as características de um indivíduo normal e portador de alterações decorrentes da infecção pelo Zika vírus. Os dados obtidos serão inicialmente submetidos a um teste estatístico de normalidade e homocedasticidade, para a averiguação da distribuição dos mesmos na curva de normalidade e comparados entre os dois grupos (teste paramétrico ou não paramétrico), considerando $p < 0,05$ como nível de significância.

Objetivo da Pesquisa:

Com o trabalho objetiva-se estabelecer um padrão para imagens da face de pacientes saudáveis e pacientes com alterações decorrentes pela infecção pelo Zika vírus, servindo como uma nova ferramenta na compreensão e diagnóstico desta condição.

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONCA

CEP: 16.015-050

UF: SP

Município: ARACATUBA

Telefone: (18)3636-3200

Fax: (18)3636-3332

E-mail: andrebertoz@foa.unesp.br

Continuação do Parecer: 1.807.671

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos da pesquisa são mínimos, uma vez que os participantes da pesquisa serão apenas fotografados. Com relação aos benefícios, o paciente não terá nenhum benefício direto, entretanto, esperamos que este estudo resulte em informações importantes que permita a criação/elaboração de um modelo de diagnóstico não invasivo para as alterações faciais decorrentes pela infecção do Zika vírus.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo que visa avaliar, por meio de análise fotográfica 3D da face, as alterações/relações decorrentes da infecção pelo Zika vírus em crianças, objetivando assim obter informações que permitam ser empregadas como meio diagnóstico para a afecção em tela.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram anexados. Ressaltamos ainda a necessidade de correção e/ou adequação do número de indivíduos que serão empregados na pesquisa pois ainda constam nos documentos anexados "Projeto plataforma Brasil - Resumo" e "Informações básicas do projeto - Resumo" 100 indivíduos que participarão da pesquisa e não 84.

Recomendações:

Por ocasião do envio do relatório realizar as correções no texto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP acata o parecer do relator. Informamos ao(a) senhor(a) pesquisador(a) que de acordo com a Resolução 466 CNS, de 12/12/2012 (título X, seção X.1., art. 3, item b, e, título XI, seção XI.2., item d), há necessidade de apresentação de relatórios semestrais, devendo o primeiro relatório ser enviado até 07/05/2017.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|--|------------------------|---------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_785888.pdf | 21/10/2016 15:32:25 | | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | projeto_plataforma_brasil.pdf | 21/10/2016 15:30:23 | Leonardo de Freitas Silva | Aceito |

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193
Bairro: VILA MENDONCA CEP: 16.015-050
UF: SP Município: ARACATUBA
Telefone: (18)3636-3200 Fax: (18)3636-3332 E-mail: andrebertoz@foa.unesp.br

Página 02 de 03

Continuação do Parecer: 1.807.671

ANEXO B - NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DO PERIÓDICO *The
New England Journal of Medicine (NEJM)*

Link da página: <https://www.nejm.org/author-center/new-manuscripts>

COVER LETTER

Though cover letters are not required, the NEJM online submission system contains a text field through which important information that is not in the metadata, such as a meeting presentation date or a major conflict of interest not in the manuscript, should be communicated with initial manuscript submissions.

MANUSCRIPT TEXT FILE

Compile all text, references, figure legends, and tables into a single double-spaced digital file (preferably an MS Word document). NEJM will also accept text (.txt), or Rich Text Format (.rtf) files.

TITLE PAGE

Create a title page that includes:

- Manuscript title
- Each author's name, highest degree, and affiliation/institution
- Contact information for one (1) corresponding author

ABSTRACT

Provide an abstract of not more than 250 words with four labeled paragraphs containing the following:

- Background: Problem being addressed in the study
- Methods: How the study was performed
- Results: Salient results
- Conclusions: What the authors conclude from study results
- Trial registration number

IDENTIFYING DATA

At appropriate places in the manuscript, please provide the following items:

- If applicable, a statement that the research protocol was approved by relevant institutional review boards or ethics committees and that all human participants gave written informed consent
- Identities of those who analyzed the data
- For clinical trials, registration number and registry name (see: N Engl J Med 2004;351:1250-1)

- For studies containing microarrays, accession numbers and repository name

REFERENCES

References must be double-spaced and numbered consecutively as they are cited.

References first cited in a table or figure legend should be numbered so they will be in sequence with references cited in the text at the point where the table or figure is first mentioned. List all citation authors when there are six or fewer; when there are seven or more, list the first three, followed by et al. The following are sample references:

1. Shapiro AMJ, Lakey JRT, Ryan EA, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000;343:230-8.
2. Goadsby PJ. Pathophysiology of headache. In: Silberstein SD, Lipton RB, Dalessio DJ, eds. *Wolff's headache and other head pain*. 7th ed. Oxford, England: Oxford University Press, 2001:57-72.
3. Kuczmarski RJ, Ogden CL, Grammer-Strawn LM, et al. CDC growth charts: United States. *Advance data from vital and health statistics*. No. 314. Hyattsville, Md.: National Center for Health Statistics, 2000. (DHHS publication no. (PHS) 2000-1250 0-0431.)
4. Medicare: trends in fees, utilization, and expenditures for imaging services before and after implementation of the Deficit Reduction Act of 2005. Washington, DC: Government Accountability Office, September 2008. (<http://www.gao.gov/new.items/d081102r.pdf>. opens in new tab.)

Numbered references to personal communications, unpublished data, or manuscripts either “in preparation” or “submitted for publication” are unacceptable. If essential, such materials can be incorporated at appropriate places in the text.

TABLES

All tables should be included at the end of the manuscript text file. Double-space tables (including footnotes) and provide a title for each table. For Original Articles, there is normally a limit of five (5) figures and tables (total) per manuscript. Extensive tables or supplementary materials will be published as supplemental materials with the digital version of the article.

ANEXO C – VERSÃO EM INGLÊS

LEONARDO DE FREITAS SILVA

**Novel Characterization of Head Morphology of
Infants Born with Zika Virus: A Methodological
Innovation for Broad Clinical Applications**

Araçatuba – São Paulo

2020

LEONARDO DE FREITAS SILVA

**Novel Characterization of Head Morphology of
Infants Born with Zika Virus: A Methodological
Innovation for Broad Clinical Applications**

Thesis presented to the School of Dentistry of the
Campus of Araçatuba – São Paulo State University
“Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, to obtain the title
of PhD IN DENTISTRY (Area of concentration on Oral
and Maxillofacial Surgery).

Advisor: Associate Prof. Idelmo Rangel Garcia
Júnior

Araçatuba – São Paulo

2020

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S586r Silva, Leonardo de Freitas.
Caracterização inovadora da morfologia da cabeça de bebês nascidos com o vírus zika : uma inovação metodológica para amplas aplicações clínicas / Leonardo de Freitas Silva. - Araçatuba, 2020
58 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Idelmo Rangel Garcia Júnior

1. Zika virus 2. Microcefalia 3. Face 4. Tomografia
I. T.

Black D7
CDD 617.64

DEDICATION

I dedicate this achievement to the people responsible for what I am today as a person and as a citizen. Those who endured and overcame all adversities so that I could get here: **my family**.

To my father (**Alberto Santos Silva**), my example of honesty and character. The person who always did everything for his children. A hardworking man, who made his best to provide us the best education. A person who always encouraged my choices, an example that I try to mirror. To my father, my hero, my friend!

To my mother (**Simone de Freitas Silva**), the person who dedicated her life to her children. My first teacher! The strong woman, always vibrant with each victory of her children, and who never let us get discouraged in the face of difficulties. The person who does everything for his children to make their dreams come true.

To my aunt (**Zélia Damiana Guimarães de Freitas**), my second mother. The person who cheers for me and dedicates her life to her family. A strong woman, who fought her whole life, inspiring me. It is the person who is always concerned about his nephews, who goes to great lengths to help the family.

To my sister (**Verônica de Freitas Silva**), the companion, who supports me and helps my parents in my absence. A struggling person, who serves as an inspiration for me to continue following my dreams. It is not just a sister, but my friend, who fights with me regardless of distance.

To my nephews (**Isabella and Lucca**), who brought immense joy to our lives. Even little ones play a very important role in my life. They are the people who make my parents' home more cheerful, filling the empty room I left to follow a dream.

SPECIAL THANKS

SPECIAL THANKS

To my advisor Prof. Adj. Idelmo Rangel Garcia Júnior. I certainly wouldn't have made it this far without him. He was the person who accepted me as his student and was always available to help me on this journey. He has always advised us with serenity and encouraged our projects. It is an example of a teacher; I try to mirror my way of teaching. I am very proud to be your student and hope to become a teacher like you!

To Professor Ashraf Ayoub. I have no words to thank you for the opportunity to participate in this work, which provided me with personal and professional growth. With Professor Ayoub I was able to observe an example of a researcher and research team leader. In addition, my first experience outside Brazil is due to you, allowing me to see the world with different eyes. I have you as an example for my professional and personal life!

To Profa. Dr. Roberta Okamoto, for being such a wonderful person. An example of a teacher, always willing to help her students. I am forever grateful for the teachings and help with the work.

To Prof. Adj. Osvaldo Magro Filho, for the teachings and willingness to help us, I am very grateful to have been his student.

To Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani. An example to be followed in Oral and Maxillofacial Surgery. A teacher in the true sense of the word and a great friend that

Araçatuba gave me. I am very grateful to have the opportunity to be together and learn a lot from you.

To Profa. Dra. Daniela Ponzoni. I am very happy to have been your student. I try to mirror myself in your simplicity and willingness in teaching. She always supported me and made this journey much easier. I am grateful for everything.

To Profa. Dr. Ana Paula Farnezi Bassi. An example of determination for me. A struggling teacher who does everything to help her students. I am very happy for the opportunity to be your student.

To Prof. Dr. Francisley Ávila Souza, for his teaching on duty at the hospital, for his willingness to help with the work. I am very grateful for the help you have given me in my training.

To Prof. André Luis Fabris, for all the help I received since the days when we were colleagues, initially in the master's degree and later as my professor in the doctorate, always dedicated to helping and teaching on duty. I am proud to have been your colleague and student!

To Dr. Adriana Mattos, for her availability and attention in helping us get the job done. I am very grateful for the opportunity to follow the Roberto Santos Hospital outpatient clinic, being able to learn a little from attending to patients with microcephaly. Without you there would be no way to do this job!

To Professor Abrahão Cavalcante Gomes de Souza Carvalho. A great teacher that Fortaleza gave me. I am immensely grateful for the opportunities and guidance I received!

To my doctoral colleagues (Erik Neiva, João Paulo, Valthierre Nunes, Ciro Duailibe, Gustavo Momesso, Lara Cervantes and Laís Sara). Without you I would never be able to get here. I am very happy to have met you! You are the great friends that Araçatuba gave me!

To my doctoral colleagues (Jonathan Ribeiro, Bruno Mendes and Juliana Zorzi). I am forever grateful for all the help I received from each of you! You are great friends that I made here in Araçatuba!

To my friends Ney Robson and Vinícius Florentino. Two friends Fortaleza gave me. I am forever grateful for all the support I have received from you.

To my friends Dante and Emily, who welcomed me here in Araçatuba and gave me all the support making this journey easier.

To the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) - Financing Code 001, for the granting of the PhD scholarship during the course. My sincere thanks for promoting financial support and, with that, allowing the achievement of the doctorate.

THANKS

THANKS

To the Faculty of Dentistry of Araçatuba - UNESP, in the person of the director **Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara** for the opportunity to take Masters and Doctorate courses. Every day I admire this university more, for the union and great effort so that the fundamental triad of the institution represented by teaching, research and university extension is the main motto of this house.

To the Graduate Program in Dentistry, Faculty of Dentistry of Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” with the current **Coordinator Prof. Adj. André Luiz Fraga Briso**.

To the employees of the Integrated Surgery and Clinic Department (Dirce, Gilmar, Odair, Tina, Paulo Gratão, Renato, Joilson and Marco). **Thank you very much for your affection and respect.**

To professor Mossey and Dr. Yang, thank you for all support you gave me during the study!

To the University of Glasgow for receive me at university’s facilities and allow me to participate in the study.

Epigraph

“Learning is the only thing the mind never exhausts, never fears, and never
regrets.”

Leonardo da Vinci

Silva LF. Caracterização inovadora da morfologia da cabeça de bebês nascidos com o vírus zika: uma inovação metodológica para amplas aplicações clínicas [dissertação]. Araçatuba: Unesp – Universidade Estadual Paulista; 2020.

RESUMO

Introdução: A epidemia do vírus Zika em 2016 constituiu uma emergência de saúde pública, com o chamando da OMS para vigilância reforçada na detecção precoce de microcefalia relacionada às condições neurológicas. **Métodos:** Quarenta e quatro crianças infectadas pelo vírus Zika foram avaliadas e comparadas com crianças saudáveis com o objetivo de identificar as medidas mais confiáveis do formato e tamanho da cabeça, explorando o relacionamento entre fenótipo craniofacial e anormalidades cerebrais. **Resultados:** Foi observado que a altura cefálica (AC), em vez da circunferência cefálica (CC), é uma medida mais sensível para avaliar pacientes com microcefalia. **Conclusão:** Este estudo recomenda mensurar a AC em pacientes com infecção pelo vírus Zika, em vez de CC como recomendado pela OMS, para melhorar a sensibilidade e especificidade da detecção precoce.

Palavras-chave: Zika vírus; Microcefalia; Face; Tomografia.

Silva LF. Novel Characterization of Head Morphology of Infants Born with Zika Virus: A Methodological Innovation for Broad Clinical Applications [dissertação]. Araçatuba: Unesp – Universidade Estadual Paulista; 2020.

ABSTRACT

Background: The 2016 Zika virus epidemic constituted a public health emergency, with the WHO calling for strengthened surveillance for the early detection of related microcephaly and associated neurological conditions. Methods: We analysed 44 Zika infected infants and matched controls to identify the most reliable measurements of head shape and size and explore the relationship between craniofacial phenotype and brain abnormalities. Principal component analysis (PCA) was applied to identify patterns of variation in the craniofacial morphology of Zika cases relative to controls. We carried out the following additional measurements of the cranial vault, the head circumference (HC), head height (HH), head length (HL) and naso-frontal-angle (NFA). The level of brain abnormality present in the CT scans, mainly the severity of parenchymal volume loss and ventriculomegaly, was classified as being mild, moderate or severe. Results: The first 12 PCs of the vaults we analysed explained 91% of the variation of the cranial vault between Zika cases and controls. Significant correlations were detected between the score of the 2nd PC of the cranial vault and HC (+0.66); HH (+0.87); HL (+0.80) and NFA (-0.48). Conclusion: We recommend measuring HH in Zika patients, rather than HC as recommended by WHO, to improve the sensitivity and specificity of early detection.

Keywords: Zika Virus. Microcephaly. Face. Tomography.

LISTS AND SUMMARY

LIST OF FIGURES

Figure 1 – Capture of the head image using Di3D stereophotogrammetry imaging system.

53

Figure 2 – Illustration of the measurements of the cranial vault.

54

Figure 3 – The 3D facial shape of an infant with Zika (red mask) and of an age-matched healthy control (white). The images highlighted the prominent forehead seen in infants with Zika.

55

Figure 4 – Variations of -2α (left) to 2α (right) of the second PC of the cranial vault added to the mean cranial vault (middle); and variations of -2α (left) to 2α (right) of the second PC of the face added to the mean face (middle).

56

LIST OF TABLES

Table 1. The correlations between PC scores, head circumference and brain abnormalities (Spearman's Rho $p < 0.05$, $*p < 0.01$, $**p < 0.001$) in Zika cases.

50

Table 2. The correlations between PC scores, head circumference and brain abnormalities (Spearman's Rho $p < 0.05$, $*p < 0.01$, $**p < 0.001$) in controls.

51

LIST OF ABBREVIATIONS

| | |
|------------|-----------------------------------|
| HH | = Head Height |
| PCA | = Principal Component Analysis |
| GPA | = Generalised Procrustes Analysis |
| NFA | = Naso-Frontal Angle |
| PPA | = Partial Procrustes Analysis |
| HC | = Head Circumference |
| HL | = Head Length |
| PC | = Principal Components |
| WHO | = World Health Organization |
| CZS | = Congenital Zika Syndrome |
| CT | = Computerized Tomography |
| 3D | = Three Dimensions |

SUMMARY

| | |
|-----------------------|-----------|
| 1 INTRODUCTION | 22 |
| 2 METHODS | 31 |
| 3 RESULTS | 35 |
| 4 DISCUSSION | 39 |
| 5 CONCLUSION | 44 |
| REFERENCES | 46 |
| SUPPLEMENTS | 58 |

*Novel Characterization of Head Morphology of Infants Born
with Zika Virus: A Methodological Innovation for Broad Clinical
Applications*

** This work was formatted according to the guidelines of the New England Journal of Medicine
(Anexo B)*

INTRODUCTION

1 INTRODUCTION

The sudden outbreak of the Zika virus infection in 2016 raised grave global concern, the WHO declared international public health emergency to raise the awareness of this epidemic. It also called for support in scaling up and strengthening the surveillance systems in countries with reported cases of Zika virus-related microcephaly and other associated neurological conditions ¹. There are currently 51 countries in which a Zika outbreak has been reported ². The Zika epidemic was particularly severe in the north-east corner of Brazil, where 97% of the country's Zika infections occurred ³. This area also accounts for 28% of all births in Brazil ³.

The Zika virus is transmitted primarily by *Aedes* mosquitoes, it has been detected in the fluid of pregnant mothers and in the brains of neonates with microcephaly at autopsy ⁴⁻⁶. The infection of pregnant mothers with Zika virus is known to increase the risk of their fetuses developing microcephaly and brain abnormalities ⁶. As a result, the head circumference (HC) of infants is now routinely measured to identify Congenital Zika Syndrome (CZS). HC is one of the WHO's child growth standards ⁷. Microcephaly is defined as having a HC of less than two standard deviations below the mean ¹. To rapidly identify Zika birth defects, it is recommended that a baby's HC should be measured before 24 hours of age, regardless of their laboratory test results. However, ~ 20% of infants with a normal HC have been reported to develop microcephaly at a later stage ⁸. Interestingly, the literature confirms that about 20% of these cases had normal HC values ⁹.

We believe that the current diagnostic criteria for microcephaly, based on skull HC measurements, are non-specific and cast too wide a net to capture real cases.

Here, we explore if new morphometric methods can improve the sensitivity and specificity of CZS surveillance, to enable the 20% of infants currently identified as being normal to be correctly diagnosed, and to improve the accuracy of microcephaly screening to support its early recognition and the timely evaluation and support of affected infants. To do so, we phenotyped the craniofacial morphology of infants born with microcephaly due to Zika virus infection and explored the most reliable method for screening by measuring head shape and size. We also explored the relationship between craniofacial phenotype and the degree of brain abnormality in these infants using CT scan data.

METHODS

3 METHODS

ETHICAL APPROVAL

Approval for the study was obtained from the Brazil ethics committee (CAAE 60031216.4.0000.5420), mothers were consented and provided approval for their infants' data to be used for the analysis.

PATIENTS

The Robert Santos General Hospital, Salvador, Brazil, provided us with 3D images of the craniofacial morphology of 44 infants infected with Zika virus (aged 10-21 months) and of 44 age-matched healthy controls (image capture is described below). In addition, they provided postnatal head CT scans of the 44 Zika cases, captured by a 16-section scanner (Siemens Healthcare). The preliminary surveillance of Zika cases in this study entailed measuring their HC with a measuring tape. All children from the Zika Group had positive serological test for Zika virus infection.

IMAGE CAPTURE

3D images were captured by a mobile 3D stereo photogrammetry imaging system (Di3D, Dimensional Image Ltd, Hillington, UK). Multiple images were captured of the face, including right and left profiles, the vault of the skull, and the back of the head (Figure 1). A custom made disposable elastic head cap was used during image capture. The 360 degrees 3D craniofacial models were reconstructed using a specially designed software for this purpose (Figure 1). Here, we used generic meshes, which consist of mathematical masks of the face and the cranium made up of 7461 indexed point "vertices" (7145 vertices for the facial mask and 316 vertices for the cranial mask). First, generic meshes were conformed to resemble the 3D characteristics of

craniofacial morphology using a conformation software program¹⁰. The accuracy of 3D image conformation has been previously evaluated and verified¹¹.

Partial Procrustes Analysis (PPA) is a mathematical method¹² that we applied to obtain an average mathematical face of both Zika cases and controls. We used Generalised Procrustes Analysis (GPA) to superimpose the conformed meshes of the cranial vault and face of both Zika and control cases with scaling¹²⁻¹³; this allowed variations in the craniofacial morphology of Zika cases relative to controls to be investigated regardless of the size differences involved.

We next analysed the GPA superimposed craniofacial meshes and calculated the principal components (PC) using principal component analysis (PCA) to identify patterns of variation in the craniofacial morphology of Zika cases relative to controls. Student t-test (at the significance level of 0.05) was used to compare the scores of the PCs of the Zika cases with age-matched controls.

We carried out the following additional measurements of the cranial vault (Figure 2):

- a. The head circumference (HC), which is routinely measured from the most anterior point of the forehead to the most posterior point of the back of the head.
- b. The head height (HH), which is the distance from ear to ear across the highest point of the vault of the skull.
- c. The head length (HL), which measures the antero-posterior distance of the cranial vault, from the forehead, across the highest point of the cranial vault, to the most prominent point of the occipital bone.

d. The naso-frontal angle (NFA) between the three points: Pronasale-Nasion-Glabella.

All measurements were repeated after one week by an experienced operator to assess the repeatability.

A consultant paediatric radiologist assessed the CT scans using Horos, a free open source DICOM medical image viewer. The radiologist categorised the level of brain abnormality present in the CT scans, mainly the severity of parenchymal volume loss and ventriculomegaly, as being mild, moderate or severe, according to Oliveira-Szejnfeld et al 2016 ¹⁴.

We assessed the mean differences using student t-test; and the relationship between their craniofacial phenotype and extent of brain abnormalities using Spearman's Rho statistical test.

RESULTS

3 RESULTS

This is a non-randomized prospective study. Errors produced by the repeated measurement of HC, HH (head height), and of HL (head length) were less than 0.2mm. The repeated landmarks' digitisation error was less than 0.5 mm. Significant differences exist in the HC, HH, HL and NFA (naso-frontal angle) of Zika cases, relative to age-matched controls ($P = 0.0000$, <0.05 , Student t test). As calculated from the PPA superimposition analysis, the average shape of the head vault was significantly smaller in Zika cases relative to controls (Figure 3).

The first 12 PCs of the vaults we analysed explained 91% of the variation of the cranial vault between Zika cases and controls, with individual contributions ranging from 33% (PC1) to 1% (PC12). After Bonferroni correction for multiple testing, this analysis identified a significant difference ($P = 0.0000$, <0.0042) in the scores of the 2nd PC in Zika cases relative to controls. No significant differences were found in the scores of the other PCs between these two groups.

The first 16 PCs explained 86% of the variation of facial shape, with individual contributions ranging from 24% (for PC1) to 1% (for PC16). The remaining PCs each contributed $<1\%$. The two-sample t-test, followed by Bonferroni correction for multiple testing, revealed a high significant difference ($P = 0.0000 < 0.0031$) between the scores of the 2nd PC in Zika cases relative to the controls; no other significant differences in the scores of the PCs were identified. Figure 4 shows the variations of -2α to 2α of the 2nd PC of cranial vault and face. This analysis showed that the head vault of the Zika group was under-developed (flat) comparing to that of the controls; and the NFA of the Zika group was larger than that of the controls.

CT images were assessed by an independent consultant paediatric radiologist. The CT analysis revealed parenchymal volume loss in Zika patients that was mild in 25%, moderate in 22%, and severe in 53% of cases. It also revealed secondary ventriculomegaly (enlarged ventricles due to brain abnormalities in Zika patients, which was mild in 28%, moderate in 41%, and severe in 28% of cases. Brain ventricles were normal in 3% of Zika cases. Abnormal cortical development was also evident in all Zika cases but with a wide range of variation. Calcification was predominantly present at the grey matter-white matter interface. Spearman's rank-order correlation coefficients showed a strong correlation (+0.69) between parenchymal volume loss and ventriculomegaly, and significant correlations between: parenchymal volume loss and HC (-0.53); parenchymal volume loss and HH (-0.48); and parenchymal volume loss and HL (-0.39) (Table 1). There was a significant correlation (-0.50, $p=0.0007$) between the severity of parenchymal volume loss and the centroid sizes of the cranial vault. This analysis suggests that the severity of parenchymal volume loss is negatively correlated to the size of the head vault of the Zika case. A significant correlation (-0.48, $P=0.0023$) was also detected between the severity of parenchymal volume loss and the scores of the 2nd PC of the cranial vault (Table 1).

Correlations were investigated between the cranial shape and head measurements. In Zika cases, a significant correlation (+0.76) was detected between the score of the 2nd PC of the cranial vault and the centroid size of the cranial vault. Significant correlations were also detected between the score of the 2nd PC of the cranial vault and HC (+0.66); HH (+0.87); HL (+0.80) and NFA (-0.48).

In the control group, a significant correlation (+0.58) was detected between the score of the 2nd PC of the cranial vault and centroid size of the cranial vault. Significant correlations were also detected between the score of the 2nd principal component of the cranial vault and: HC (+0.33); HH (+0.82); HL (+0.62); and NFA(-0.42) (Table 2).

DISCUSSION

3 DISCUSSION

Zika virus infection is one of the most challenging global infectious epidemics in recent years¹⁵. Therefore, we set out to explore a better head measurement for screening the Zika microcephaly infants.

Our findings reveal statistically significant differences in the facial morphology and cranial vault shape of Zika cases relative to healthy controls, as detected by the 2nd PC of the PCA analysis of the GPA superimposed shapes. We also detected a significant correlation between head measurement and the cranial vault (microcephaly). Our results show that the most significant and sensitive measurement was HH, which showed strong correlations (+0.87 in Zika; +0.82 in control) to the scores of the 2nd PC of the cranial vault; where the 2nd PC represented the significant different shape characteristics of the cranial vaults in between the Zika cases and control. In addition, we detected a significant correlation between the magnitude of cranial deformity and the severity of parenchymal volume loss. However, our analysis revealed that HC and the 2nd PC of the cranial vault was correlated at +0.66 in Zika infants; and weakly correlated at 0.33 in control. Our findings show that HC is not the best measurement correlated with distinctive cranial morphology.

It is current practice for paediatricians to measure the HC of infants and young children and to compare these measurements with the average norms¹⁶, and with WHO growth charts⁷. However, a significant variation in HC exists among ethnic groups^{3, 17}. For example, Malay and Chinese infants have a significantly larger HC compared to Indian infants in the birth cohort. In addition, the existing method used to measure HC (a measuring tape) fails to consider the shape of the cranial vault, and so it

does not discriminate between microcephaly that is due to low birth weight from that due to craniofacial syndromes¹⁸. The current method of HC measurement does not describe the morphology of the vertex of the cranial vault nor does it discriminate between small size and a deformed skull.

A novel finding of this study is that a strong correlation exists between the distinctive cranial morphology of Zika infants and the head measurements of HH and, to a lesser extent, HL, which both provided sensitive measurements of the vertex of the cranial vault in Zika virus infected infants. This is a logical finding; the new measurements encompass the shape of the cranial vault. The standard HC measure does not capture the morphological characteristics of the vertex of the vault of the skull, which is usually affected in a wide range of craniofacial syndromes³. The new measurements can more robustly detect a range of craniofacial anomalies and can improve the sensitivity of microcephaly detection. This is of paramount importance because our findings show that the severity of microcephaly correlates with the severity of brain abnormalities. França et al³ have previously reported that 20% of Zika virus infection are associated with a HC that falls within the normal range, according to the international fetal and new-born WHO growth chart. Moore et al (2017)¹⁹ have previously highlighted the importance of paediatricians recognising the craniofacial phenotype of Zika cases to ensure their appropriate and timely evaluation and follow up; our findings can facilitate achieving this important target. Based on the findings of this study, it is likely that a proportion of Zika infected cases have not been detected early enough owing to the limitations of screening for microcephaly using the recommended WHO protocol of HC alone. An interesting finding to emerge from this

study is the increased naso-frontal angle (NFA) of Zika cases. Our results show that the NFA measure could discriminate Zika virus cases from the control group. This has not been reported before and promises to be a robust and reliable measure to use when screening for Zika-related microcephaly.

Computed tomography (CT) showed a wide range of abnormalities including subcortical calcifications, cortical thinning, abnormal gyral pattern, decrease myelination, absence of corpus callosum, cerebellar hypoplasia, closed anterior fontanel and cerebral atrophy^{20, 21}. Indeed, craniofacial dysmorphology reflected the severity of the associated parenchymal volume loss, which is a novel finding of this study. Thus, our findings highlight the potential for using non-invasive stereophotogrammetry to capture the cranial and facial morphology of other craniofacial syndromes. A previous attempt has been made to phenotype infants with Zika virus infection, in three of the largest case series reporting 35, 48, and 104 infants with congenital Zika virus syndrome, in which two thirds of the infants had severe microcephaly^{22, 23}. In 75% of these cases, the occipital region was prominent. As such, the routine measurement of the HC from frontal bone to occipital prominence, around the circumference of the skull above the ears, disregarding the vault of the skull, may not provide an accurate measurement of microcephaly because the prominence of the occipital bone would camouflage the underlying microcephaly. The new measurements presented in our study, including both the HH and HL, would eliminate this potential source of measuring error when assessing head size. The measurements provide a distinct improvement in the evaluation of the cranial vault assessment²⁴.

It must be emphasised that the absence of microcephaly at birth does not exclude the possibility of congenital Zika virus infection. Our study demonstrates that parenchymal volume loss is significantly associated with cranial vault dysmorphology. Since the severity of microcephaly is directly related to the underlying neurological damage, the measurements could also be used as a prognostic indicator for the severity of the neurological damage and of a patient's likely response to various treatment modalities. The 3D imaging of a patient's cranial vault could also inform clinicians about the extent of the brain abnormalities, which could help to stratify cases, according to severity, for a specialised management protocol. It can be also used to assess a range of craniofacial anomalies including scaphocephaly, trigonocephaly and brachycephaly, and to facilitate the monitoring of craniofacial development and the evaluation of various treatment approaches including cranial vault remodelling, fronto-orbital advancement, and suturectomy.

We recognise that our study does have some limitations, which include the small sample size, and the limited availability of CT scans to support the 3D imaging of craniofacial morphology. The study was limited to those diagnosed with Zika virus infection and microcephaly, and it remains uncertain if cases with Zika virus infection who did not have a traditional diagnosis of microcephaly were included in the cohort.

CONCLUSION

5 CONCLUSION

The most sensitive and discriminatory measure of the severity of the cranial deformity in these infants was the transverse measure of the ear to ear distance (HH). The policy recommendation from this study is that the WHO should consider revising its guidelines for the diagnosis of microcephaly from a circumferential to a transverse cranial measurement.

REFERENCES

REFERENCES

1. Centers for Disease Control and Prevention. Congenital zika syndrome and other birth defects <https://www.cdc.gov/pregnancy/zika/testing-follow-up/zika-syndrome-birth-defects.html> (2020).
2. Centers for Disease Control and Prevention. All countries and territories with active Zika virus transmission <http://www.cdc.gov/zika/geo/active-countries.html> (2020).
3. França, G. V. et al. Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 live-births with complete investigation. *Lancet* 388, 891-897 (2016).
4. Calvet, G. et al. Detection and sequencing of Zika virus 438 from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect. Dis.* 16, 653-660 (2016).
5. Brasil, P. et al. Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro. *N. Engl. J. Med.* 375, 2321-2334 (2016).
6. Melo, A. S. et al. Congenital Zika virus infection: beyond neonatal microcephaly. *JAMA Neurol.* 73, 1407-1416 (2016).
7. World Health Organization. WHO child growth standards: head circumference-for-age, arm circumference-for-age, triceps skinfold-for-age and subscapular skinfold-for-age: methods and development <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43706> (2020).
8. Victora, C. G. et al. Microcephaly in Brazil: how to interpret reported numbers? *Lancet* 387, 621-624 (2016).
9. Silva, A. A. M. et al. Early growth and neurological outcomes of infants with probable congenital Zika virus syndrome. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 1953-1956 (2016).

10. Ju, X. & Siebert, J. P. Conforming generic animatable models to 3D scanned data. Proceedings: 6th Numerisation 3-D/Scanning (2001).
11. Almukhtar, A., Khambay, B., Ju, X., McDonald, J. & Ayoub, A. Accuracy of generic mesh conformation: the future of facial morphological analysis. JPRAS Open 14, 39-48 (2017).
12. Dryden, I. L. & Mardia, K. Statistical shape analysis. New York, Wiley, 1998.
13. Hammond, P. et al. 3D Analysis of Facial Morphology. Am. J. Med. Genet. A 126A, 339–348 (2004).
14. Oliveira-Szejnfeld, P. S. et al. Congenital brain abnormalities and Zika virus: what the radiologist can expect to see prenatally and postnatally. Radiology 281, 203-218 (2016).
15. Sulleiro, E. et al. The challenge of the laboratory diagnosis in a confirmed congenital Zika virus syndrome in utero: a case report. Medicine 98, e15532 (2019).
16. Centers for Disease Control and Prevention. Growth charts. <http://www.cdc.gov/growthcharts/> (2020).
17. Boo, N., Lye, M. & Ong L. Intrauterine growth of liveborn Malaysian infants between gestation of 28 to 42 weeks. Singapore Med. J. 35, 163-166 (1994).
18. Sutan, R. et al. Trend of head circumference as a predictor of microcephaly among term infants born at a regional Centre in Malaysia between 2011-2015. Dovepress 8, 9-17 (2018).
19. Moore, C. A. et al. Characterizing the pattern of anomalies in congenital Zika syndrome for pediatric clinicians. JAMA Pediatr. 171, 288-295 (2017).

20. Melo A. S. et al. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 47, 6-7 (2016).
21. Sarno, M. et al. Progressive lesion of the central nervous system in microcephalic fetuses with suspected congenital Zika virus syndrome. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 50, 717-722 (2017).
22. Microcephaly Epidemic Research Group. Microcephaly in infants, Pernambuco State, Brazil, 2015. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 1090-1093 (2016).
23. Schuler-Faccini, L. et al. Possible association between Zika virus infection and microcephaly. Brazil, 2015. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 65, 59–62 (2016).
24. Martini, M., Klausning, A., Luchters, G., Heim, N. & Messing-Jünger, M. Head circumference - a useful single parameter for skull volume development in cranial growth analysis? *Head Face Med.* 14, 3 (2018).

TABLES

Table 1. The correlations between PC scores, head circumference and brain abnormalities (Spearman's Rho $p < 0.05$, * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$) in Zika cases.

| | Centroid V | HC | HH | HL | NFA | PVL | VM |
|----------------|------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| PC2 Vault | 0.76** | 0.66** | 0.87** | 0.80** | -0.48* | -0.48* | |
| PC2 Face | 0.34 | | | | | | |
| Centroid Face | 0.50* | | | | | | |
| Centroid Vault | | 0.96** | 0.90** | 0.92** | -0.44 | -0.50* | -0.48* |
| HC | | | 0.87** | 0.86** | -0.35 | -0.53* | |
| HH | | | | 0.84** | -0.47* | -0.48* | |
| HL | | | | | -0.44* | -0.39 | |
| PVL | | | | | | | 0.69** |

HH: Head Height, HC: head circumference, HL: head length, Centroid F: centroid of the face, Centroid V: centroid of the vault of the skull, PC2: second principal component. NFA: nasofrontal angle. PVL: parenchymal volume loss. VM: ventriculomegaly.

Table 2. The correlations between PC scores, head circumference and brain abnormalities (Spearman's Rho $p < 0.05$, * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$) in controls.

Significant correlations between PC scores, head measurements (Spearman's Rho $p < 0.05$, * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$) in controls

| | Centroid V | HC | HH | HL | NFA |
|----------------|------------|--------|--------|--------|--------|
| PC2 Vault | 0.58** | 0.33 | 0.82** | 0.62** | -0.42 |
| PC2 Face | | | | | |
| Centroid Face | 0.66* | 0.67** | | 0.50 | |
| Centroid Vault | | 0.90** | 0.75** | 0.80** | -0.40 |
| HC | | | 0.54** | 0.69** | |
| HH | | | | 0.57** | -0.47* |
| HL | | | | | |

HH: Head Height, HC: head circumference, HL: head length, Centroid F: centroid of the face, Centroid V: centroid of the vault of the skull, PC2: second principal component. NFA: nasofrontal angle. PVL: parenchymal volume loss. VM: ventriculomegaly.

FIGURES

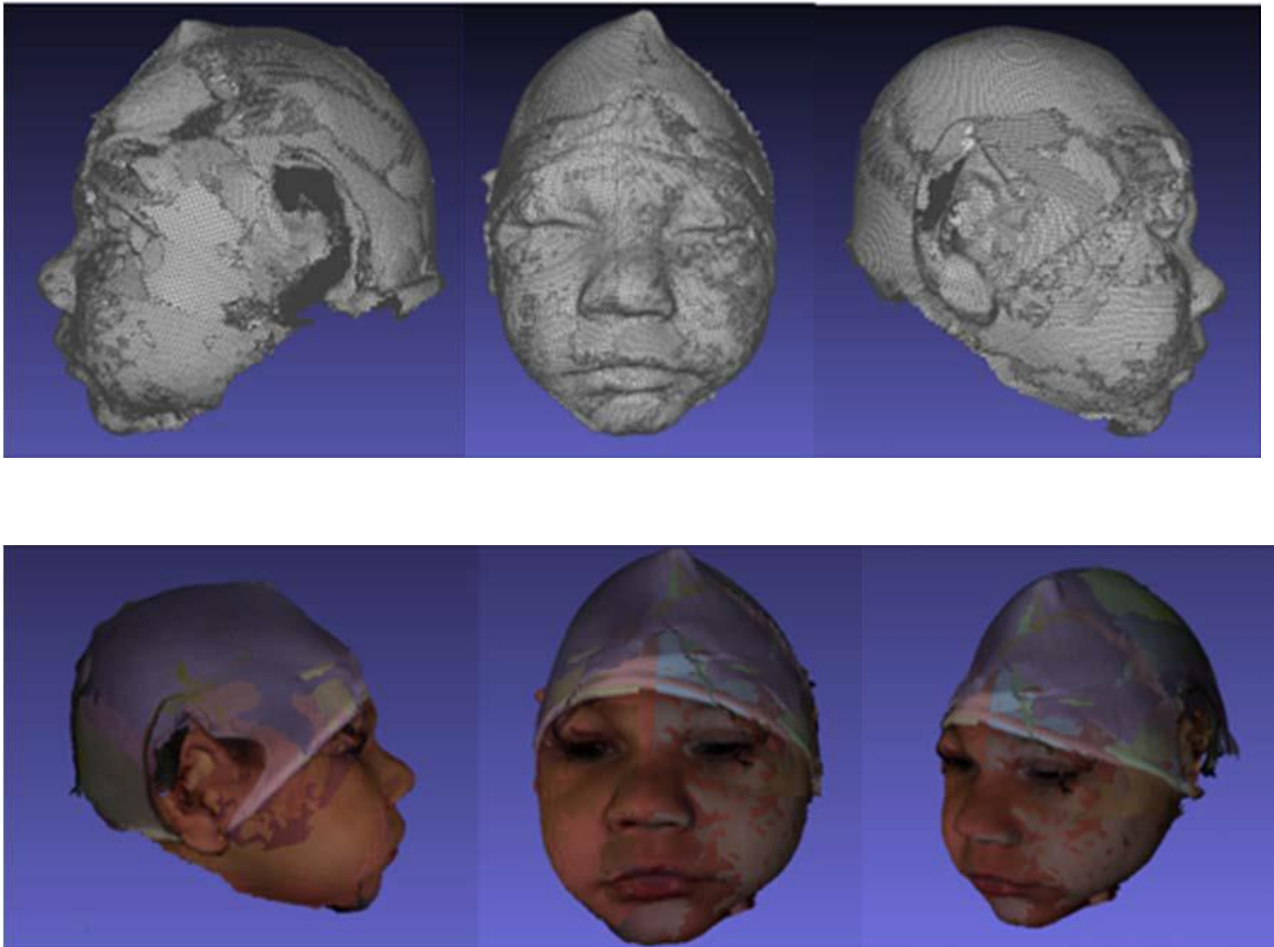


Figure 1 – Capture of the head image using Di3D stereophotogrammetry imaging system.

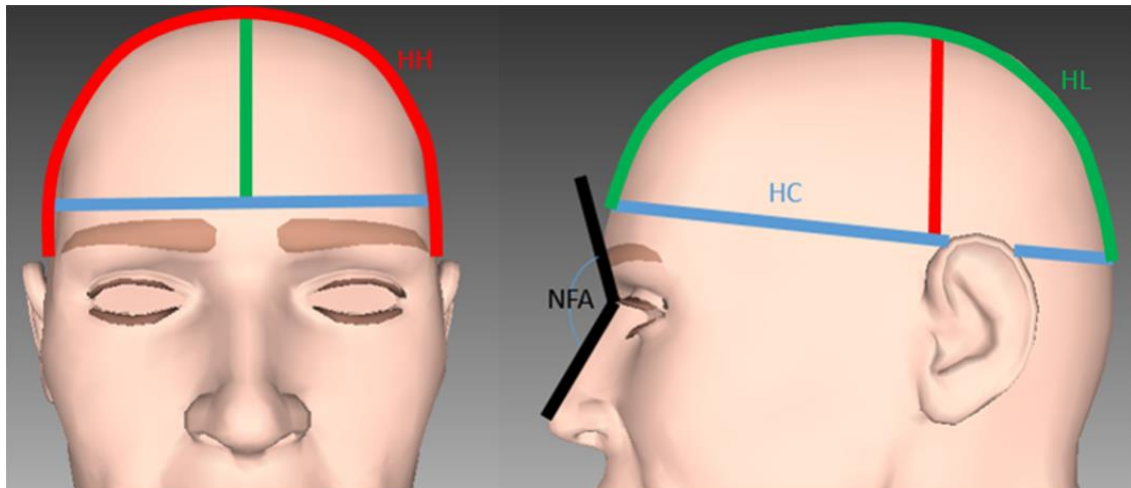


Figure 2 – Illustration of the measurements of the cranial vault. HH: Head Height; HL: Head Length; HC: Head Circumference; NFA: Naso-Frontal-Angle.

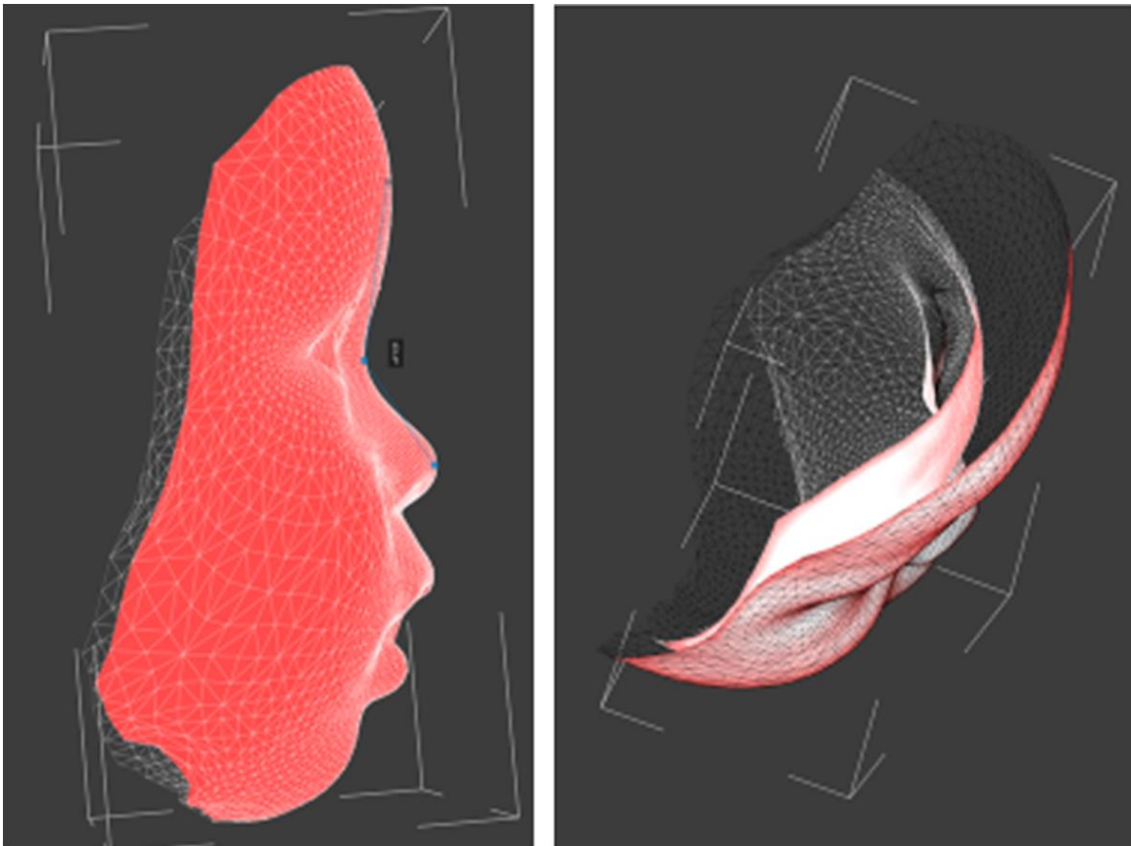


Figure 3 – The 3D facial shape of an infant with Zika (red mask) and of an age-matched healthy control (white). The images highlight the prominent forehead seen in infants with Zika.

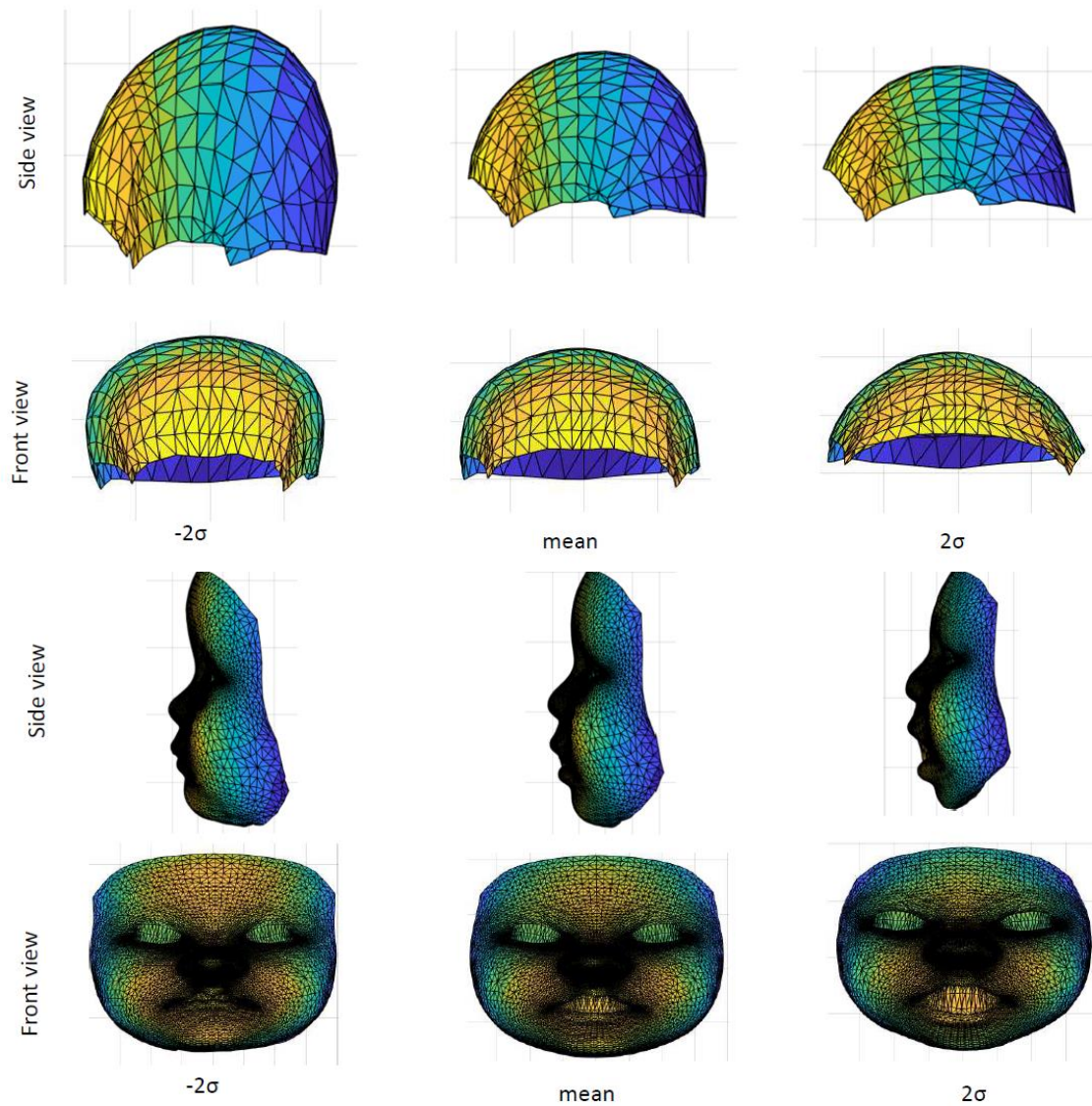


Figure 4 – Variations of -2α (left) to 2α (right) of the second PC of the cranial vault added to the mean cranial vault (middle); and variations of -2α (left) to 2α (right) of the second PC of the face added to the mean face (middle).