

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

BÁRBARA DOS SANTOS ROSA

QUANTIFICAÇÃO CELULAR DE ENCÉFALOS HUMANOS EM
DESENVOLVIMENTO

RIO DE JANEIRO

2024

Bárbara dos Santos Rosa

QUANTIFICAÇÃO CELULAR DE ENCÉFALOS HUMANOS EM
DESENVOLVIMENTO

Produção textual apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina, área de concentração em Anatomia Patológica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Medicina (Anatomia Patológica).

ORIENTADORA – Professora Doutora Patrícia Pestana Garcez
Professora Adjunta do Instituto de Ciências Biomédicas – UFRJ
COORIENTADORA – Doutora Emily Johanna Castro Fonseca
Instituto de Ciências Biomédicas – UFRJ

Rio de Janeiro

2024

Bárbara dos Santos Rosa

QUANTIFICAÇÃO CELULAR DE ENCÉFALOS HUMANOS EM
DESENVOLVIMENTO

Produção textual submetida ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina na Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Medicina (Anatomia Patológica).

Rio de Janeiro, 26 de abril de 2024.

Aprovada por:

Profa. Dra. Patrícia Pestana Garcez (Orientadora – Presidente da Banca)

Dra. Emily Johanna Castro Fonseca (Coorientadora)

Prof. Dr. Henrique Rocha Mendonça

Prof. Dr. Luiz Gustavo Feijó Dubois

Resumo

O desenvolvimento do encéfalo humano requer uma ação orquestrada de eventos, com variados tipos celulares que permanecem em uma coordenação precisa por um longo período, desde a vida intrauterina até vários anos após o nascimento. A desregulação desses processos, causados por agentes teratogênicos, ambientais ou processos intrínsecos maternos, pode afetar a estrutura e a função do sistema nervoso em desenvolvimento, ocasionando diferentes patologias, como distúrbios neurológicos ou em casos mais severos, até a morte. O *Treponema pallidum* é um desses agentes conhecidos por afetar o desenvolvimento na gestação. Técnicas quantitativas de caracterização do sistema nervoso (SN) nos permitem estudar de maneira eficiente a celularidade encefálica. Neste trabalho, o Fracionamento Isotrópico nos possibilitou registrar em números absolutos a celularidade de encéfalos humanos durante o desenvolvimento em períodos fetais até os primeiros meses de vida pós-natal.

Em nosso estudo, foi possível analisar 10 encéfalos humanos em diferentes períodos do desenvolvimento. Conseguimos observar, em números absolutos, que o número total de células encefálicas varia de ~22 bilhões no início do terceiro trimestre da gestação até ~119 bilhões no quarto mês de vida pós-natal, as células neuronais variam de ~8 bilhões a ~27 bilhões e células não-neuronais variam de ~14 bilhões até 21 bilhões neste mesmo período. Observamos que o comportamento em números absolutos de células varia tanto por região quanto temporalmente. No telencéfalo, o maior crescimento do número de neurônios acontece no período fetal, enquanto no cerebelo acontece principalmente na vida pós-natal. Já a gliogênese acontece preferencialmente após o nascimento em ambas as regiões.

Neste estudo foi possível comparar a composição celular do encéfalo de neonatos a termo com a do adulto, mostrando que no período a termo temos ~18% do número total de células. E complementarmente, verificamos que há uma diminuição do número de células do encéfalo de um caso de recém-nascido a termo com sífilis congênita em relação ao seu controle da mesma idade, com redução de 34% do número total de células do encéfalo e 32% do número de neurônios, caracterizando o efeito deletério dessa doença durante a gestação.

Palavras-chave: Desenvolvimento; Encéfalo; Celularidade; Fracionador Isotrópico; Sífilis Congênita.

Abstract

The development of the human brain requires a sequence of events, that involve several cell types, which remain in precise coordination from intrauterine life to several years after birth. The disruption of these processes, caused by teratogenic, environmental agents or intrinsic maternal processes, can affect the structure and function of the developing nervous system, causing different pathologies, such as neurological disorders or, in severe cases, death. *Treponema* is known as one teratogenic factor that compromise the development during pregnancy. Quantitative techniques focus on the nervous system have enable us to efficiently study brain cellularity. In this work, Isotropic Fractionation has been used to register in absolute numbers the cellularity of human brains during development in fetal periods up to the first months of postnatal life.

In our study, it was possible to analyze 10 cases in the development period. We observe, in absolute numbers, that the total number of brain cells varies from ~22 billion at the beginning of the third trimester of pregnancy to ~119 billion in the fourth month of postnatal life, neuronal cells vary from ~8 billion to ~27 billion and non-neuronal cells range from ~14 billion to 21 billion in this same period. We observed that the absolute cell numbers varies both by region and temporally. In the telencephalon, the number of neurons grows in the fetal period, while in the cerebellum it occurs in postnatal life. Gliogenesis occurs after birth in both regions.

In this study, it was possible to compare the absolute values of brain cells in full-term newborn with the values previously found in adults, demonstrating that we have only ~18% of the total number of cells. We verified that there is a deficit in all values of brain cells in a case of full-term newborn with congenital syphilis in relation to their control, with a reduction of 34% in the total number of brain cells and 32% in the number of neurons, characterizing the deleterious effect of this disease during pregnancy.

Lista de Ilustrações

Figura 1 Desenvolvimento macroscópico do encéfalo	12
Figura 2 Representação da estrutura histológica neocortical humana.....	13
Figura 3 Linha do tempo dos eventos de desenvolvimento do encéfalo humano.	14
Figura 4 Linha do tempo do desenvolvimento do encéfalo humano em diferentes regiões encefálicas	21
Figura 5 Dissecção	34
Figura 6 Fracionamento isotrópico	36
Figura 7 Esquema ilustrativo do processo de quantificação neuronal.....	37
Figura 8 Imunocitoquímica.....	38
Figura 9 Massa em função da idade.....	41
Figura 10 Número total de células em função da idade.	42
Figura 11 Taxa de crescimento, em porcentagem com o aumento da idade.....	43
Figura 12 Número total de células no telencéfalo, em função da idade.	45
Figura 13 Número total de células no cerebelo em função da idade.....	47
Figura 14 Média do número total de células no período a termo em comparação com o adulto.	49
Figura 15 Comparação do número de células de um encéfalo de um recém-nascido a termo com sífilis congênita e seu controle da mesma idade gestacional.....	51

Lista de Tabelas

Tabela 1. Casos coletados ordenados por idade.	40
Tabela 2 Médias dos valores absolutos do número total de células do telencéfalo ..	45
Tabela 3 Médias da densidade do número total de células do telencéfalo.	46
Tabela 4. Comparação em números absolutos e em porcentagem do caso com sífilis congênita e seu controle.....	51

Lista de abreviações

CMV - Citomegalovírus

DAPI - Diidrocloreto de 4,6-diamidino-2-fenilindol

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS - Solução Tampão Fosfato Salino

PFA - Paraformaldeído

SN - Sistema Nervoso

SNC - Sistema Nervoso Central

SVO - Serviço de Verificação de óbitos

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TG - Toxoplasma gondii

UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro

ZV - Zona Ventricular

ZSV - Zona Subventricular

Sumário

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. DESENVOLVIMENTO TÍPICO DO ENCÉFALO HUMANO	11
1.1.1 ETAPAS DO DESENVOLVIMENTO CELULAR ENCEFÁLICO	14
1.1.1.1. NEUROGÊNESE.....	15
1.1.1.2. MIGRAÇÃO.....	16
1.1.1.3. FORMAÇÃO DE CIRCUITOS NEURAIS.....	17
1.1.1.4. MORTE CELULAR PROGRAMADA.....	18
1.1.1.5. MATURAÇÃO.....	19
1.2. ALTERAÇÕES DO DESENVOLVIMENTO DO ENCÉFALO HUMANO SECUNDÁRIAS A INFEÇÕES CONGÊNITAS	22
1.2.1. SÍFILIS CONGÊNITA.....	25
1.3. ESTUDOS QUANTITATIVOS DA CELULARIDADE DO ENCÉFALO	28
2. OBJETIVOS	31
2.1. OBJETIVO GERAL	31
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. CAPTAÇÃO DOS ENCÉFALOS HUMANOS	32
3.2. DISSECÇÃO DOS ENCÉFALOS	33
3.3. FRACIONAMENTO ISOTRÓPICO	34
3.3.1. QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS.....	35
3.3.2. QUANTIFICAÇÃO DE NEURÔNIOS.....	37
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
5. RESULTADOS	40
5.1. COMPOSIÇÃO CELULAR ABSOLUTA DO ENCÉFALO HUMANO E SUAS REGIÕES (TELENCÉFALO E CEREBELO) DURANTE O DESENVOLVIMENTO	41
5.1.1. INCREMENTO DA MASSA ENCEFÁLICA DURANTE O DESENVOLVIMENTO HUMANO.....	41
5.1.2. COMPOSIÇÃO CELULAR ABSOLUTA DO ENCÉFALO HUMANO DURANTE O DESENVOLVIMENTO.....	41
5.1.2.1 COMPOSIÇÃO CELULAR ABSOLUTA DO TELENCÉFALO HUMANO DURANTE O DESENVOLVIMENTO.....	44
5.1.3. COMPOSIÇÃO CELULAR ABSOLUTA DO CEREBELO HUMANO DURANTE O DESENVOLVIMENTO.....	46
5.2. COMPOSIÇÃO CELULAR ABSOLUTA DO ENCÉFALO E SUAS REGIÕES (TELENCÉFALO E CEREBELO) DE NEONATOS HUMANOS NO PERÍODO A TERMO EM COMPARAÇÃO COM O ADULTO	47
5.3. COMPOSIÇÃO CELULAR ABSOLUTA DE UM ENCÉFALO HUMANO TÍPICO E SUAS REGIÕES (TELENCÉFALO E CEREBELO) EM COMPARAÇÃO A UM CASO DE SÍFILIS CONGÊNITA DA MESMA IDADE	49
6. DISCUSSÃO	53
6.1. Incremento da massa encefálica durante o desenvolvimento humano	53
6.2. Composição celular do encéfalo humano em desenvolvimento	54
6.3. Neurogênese pós-natal	55

6.4. Impacto da sífilis congênita na celularidade do encéfalo humano em desenvolvimento.....	56
6.5. Importância dos estudos quantitativos da celularidade encefálica durante o desenvolvimento humano	57
7. LIMITAÇÕES.....	59
8. CONCLUSÃO	60
9. REFERÊNCIAS.....	60
10. ANEXOS.....	77

1. INTRODUÇÃO

1.1. DESENVOLVIMENTO TÍPICO DO ENCÉFALO HUMANO

Em estágios iniciais do desenvolvimento humano, o embrião dá origem a três camadas ou folhetos germinativos: o endoderma, o mesoderma e o ectoderma. Estes são o início da formação de todos os tecidos e órgãos. O sistema nervoso (SN) terá origem no ectoderma. Por volta da terceira semana de gestação, o primeiro grande evento de formação do SN ocorre: a formação do tubo neural. Neste período, ocorre um espessamento do ectoderma, através da indução neural e a formação da placa neural, primeira estrutura rudimentar do SN. As paredes desse espessamento dobram na formação de um sulco e se unem para formar o tubo neural. Seu crescimento se dá com orientação céfalo-caudal, seguindo a formação do embrião (PURVES, 2018).

Uma das extremidades do tubo neural se fecha, iniciando a formação da porção rostral do tubo neural, que se enche de um fluido, se expande formando as três vesículas primordiais do encéfalo, que se tornam evidentes antes do final da quarta semana de gestação: o prosencéfalo, o mesencéfalo e o rombencéfalo (PURVES, 2018). Posteriormente, as vesículas formadas serão subdivididas. A partir da quinta semana de gestação, o prosencéfalo se subdivide no telencéfalo e diencefalo. O telencéfalo se expande rapidamente dando origem aos hemisférios cerebrais. Ao final da quinta semana de gestação, o diencefalo, tem o tálamo e o hipotálamo visíveis. O tálamo cresce desproporcionalmente após a sétima semana e se torna a maior estrutura do diencefalo (SCHOENWOLF et al., 2020). O rombencéfalo dará origem ao mesencéfalo, metencéfalo e o mielencéfalo. Os primórdios dos hemisférios cerebelares e do vermis, estrutura medial do cerebelo, aparecem entre 12 a 13 semanas de gestação, com o espessamento bilateral nas faces laterais da superfície dorsal do rombencéfalo, conhecidos como lábios rômnicos (SCHOENWOLF et al., 2020).

Inicialmente, a superfície dos hemisférios cerebrais é lisa (Figura 1). Com o seu crescimento, há um aumento no número de giros e sulcos (GAREL et al., 2001). Esse processo se inicia aproximadamente no quarto mês de gestação, com a formação do lobo temporal, marcado pelo sulco lateral. No sexto mês de gestação, segue a formação de novos sulcos, o sulco central aparece e delimita o lobo frontal e o lobo

parietal. O sulco occipital surge e delimita o lobo occipital. Nesta idade, o número de sulcos e giros pouco variam entre os indivíduos (SCHOENWOLF et al., 2020).

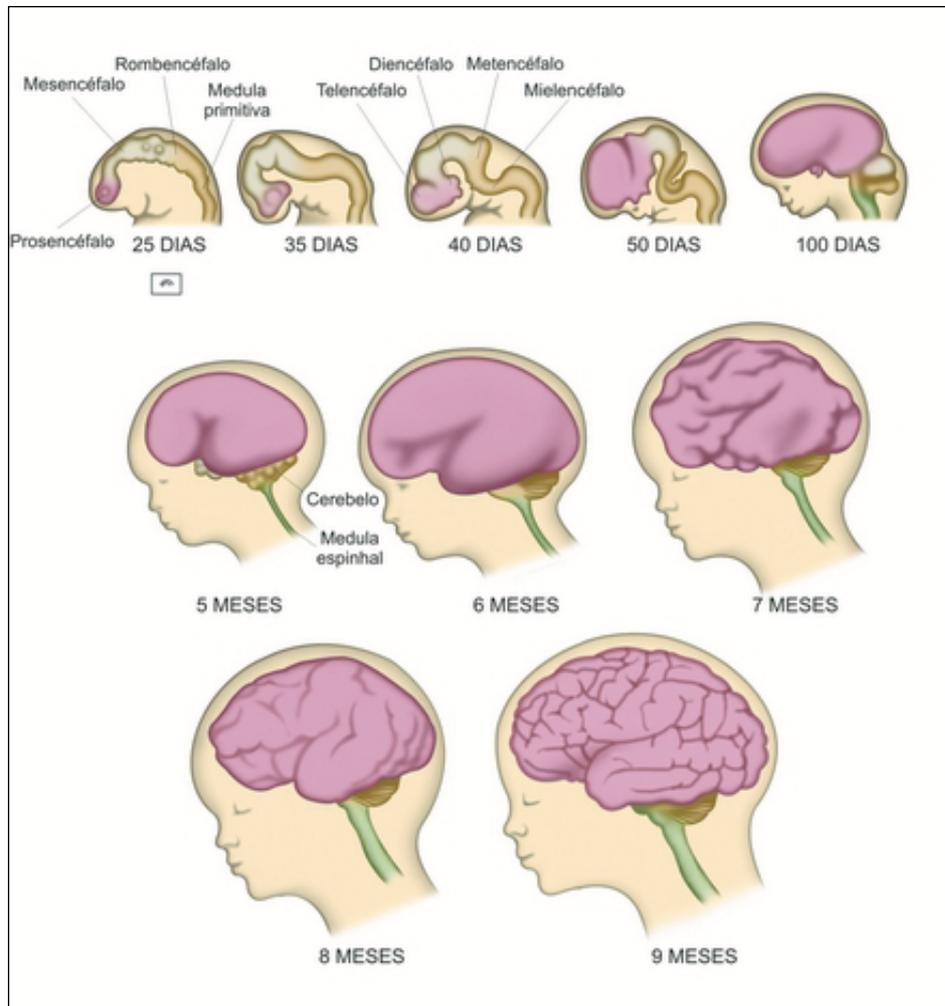


Figura 1 Desenvolvimento macroscópico do encéfalo durante a gestação (LENT, 2010).

O perímetro cefálico ao nascimento é definido pelo crescimento do encéfalo dentro dos limites do crânio. Ao nascimento, a anatomia macroscópica do encéfalo humano lembra sua aparência adulta, seu peso é apenas 26,2% (homens) e 26,8% (mulheres) quando comparada a um jovem adulto. Em ambos os sexos, o maior aumento no peso do cérebro ocorre durante o primeiro ano de vida, quando o peso ao nascer mais que dobra. Aproximadamente aos 3 anos de idade, o peso do cérebro atinge quatro vezes o seu valor de nascimento. O crescimento posterior do cérebro é significativamente mais lento, com o cérebro levando de 15 a 18 anos para quase quintuplicar seu peso ao nascer e atingir o maior tamanho médio entre os adultos jovens, com 1.450g para homens e 1340g para mulheres (DEKABAN; SADOWSKY,

1978). Ao longo dos primeiros anos de vida pós-natal, o encéfalo humano sofre grande variação no número de células e do seu volume.

A organização celular encefálica tem sido estudada há muitas décadas. Já no início do século XX foi descrita a estrutura do córtex cerebral humano (BRODMANN, 1909; JONES, 2009), o neocórtex é dividido em seis camadas, distintas em densidade e disposição de células neurais.

Com o entendimento sobre essa distribuição em camadas, verificou-se que nos mamíferos há variação da forma, tamanho e número de neurônios. Nos humanos, regiões corticais com funções específicas, como o córtex somatossensorial e o córtex motor, demonstram características histológicas que refletem suas funções. O córtex sensorial, por exemplo, tem grandes camadas de células granulares para receber informações extensas, enquanto o córtex motor tem camadas de células granulares esparsas e extensas células piramidais (CAMPBELL, 1905). Estas características tornam a distribuição celular encefálica humana heterogênea (FELTEN, 2016).

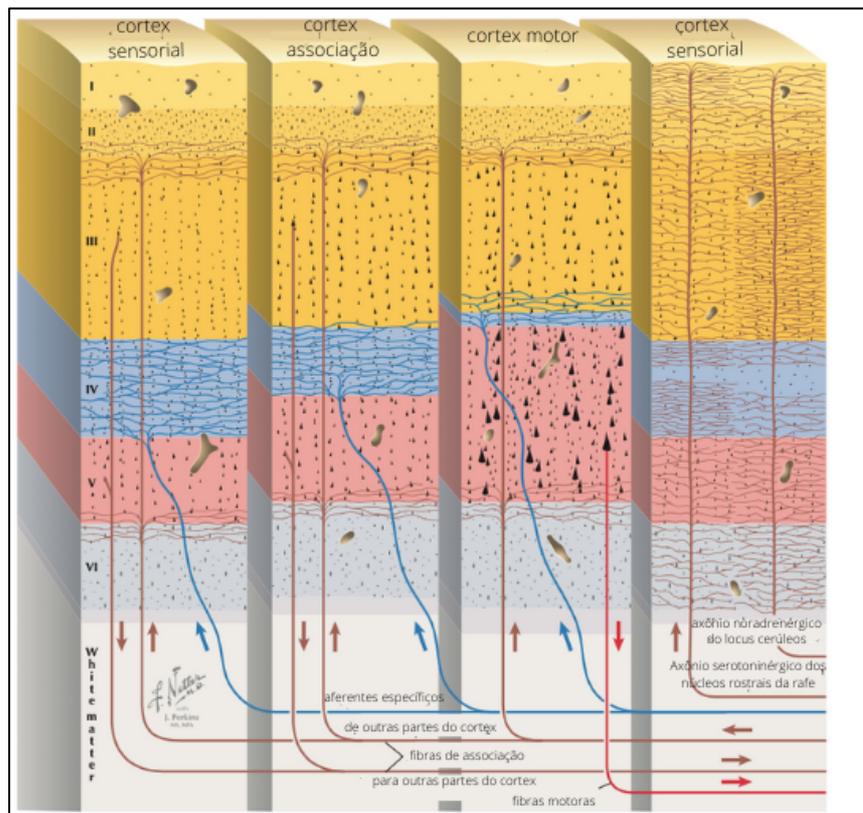


Figura 2 Representação da estrutura histológica neocortical humana, dividida em 6 camadas, com distribuição heterogênea celular, de acordo com as funções especializadas. Adaptado Netter, 2016.

1.1.1 ETAPAS DO DESENVOLVIMENTO CELULAR ENCEFÁLICO

Para uma adequada formação das diferentes regiões encefálicas, é necessário que ocorra uma série de eventos perfeitamente organizados no nível celular, que vão desde a proliferação celular (neurogênese e gliogênese), migração, crescimento axonal, formação de sinapses, maturação, morte celular, e mielinização (Figura 3). A seguir, iremos detalhar as principais características destes eventos.

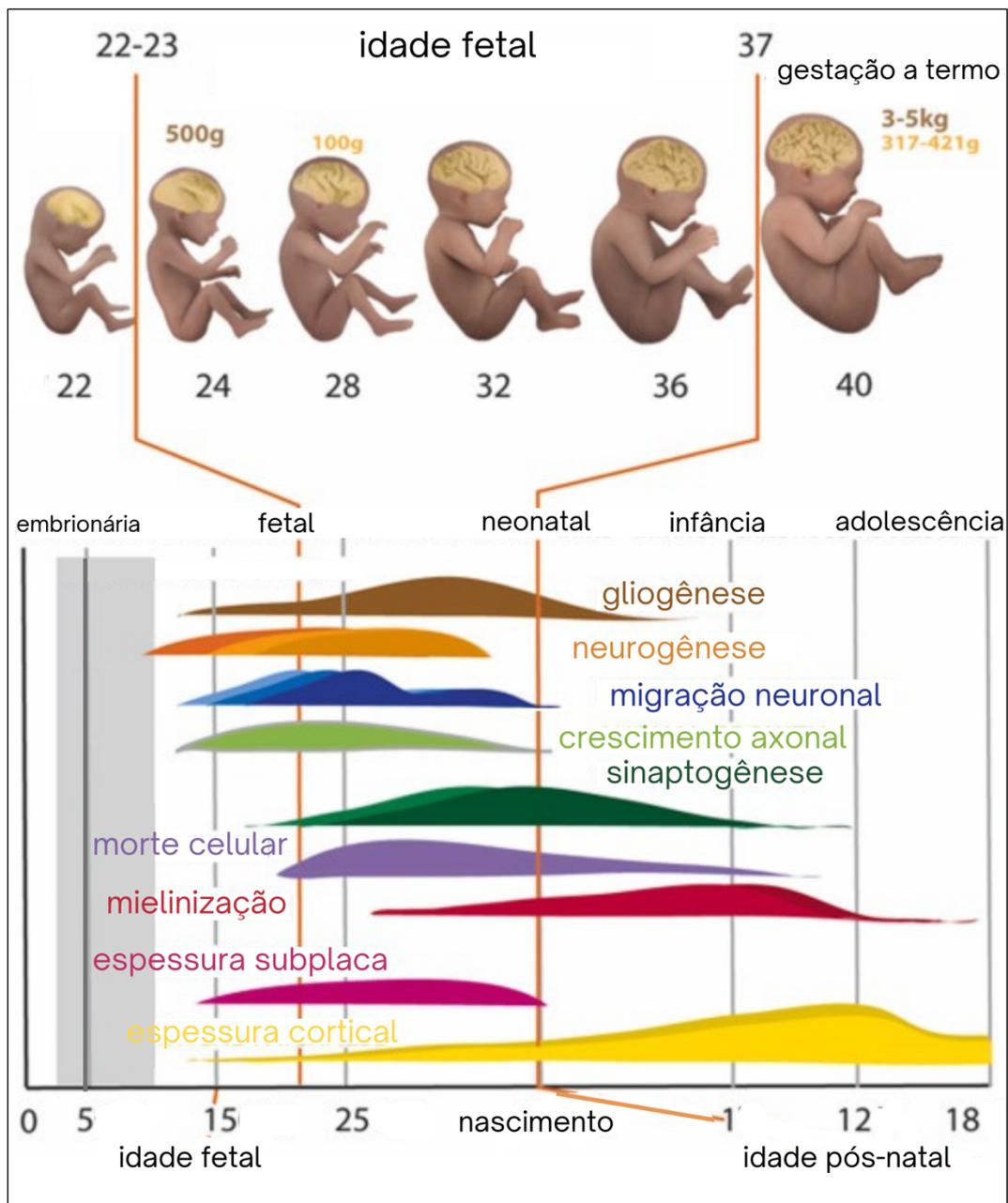


Figura 3 Linha do tempo dos eventos de desenvolvimento do encéfalo humano. Adaptado Luhmann H. J. et al, 2022.

1.1.1.1. NEUROGÊNESE

O incremento celular do encéfalo se inicia nas primeiras semanas do desenvolvimento na região do tubo neural. Nos humanos, a proliferação de células neurais se concentra em uma camada celular que reveste o ventrículo cerebral. Esta etapa do desenvolvimento acontece com maior intensidade entre o 3º e 4º mês de gestação (GÖTZ; BARDE, 2005). Camadas celulares do prosencéfalo humano foram identificadas em períodos precoces, aos 4 meses de gestação.

Os progenitores neurais, primeiro da chamada zona ventricular (ZV) e posteriormente da zona subventricular (ZSV), sofrem sucessivas divisões, inicialmente simétricas e autorrenováveis, de células inicialmente indiferenciadas (RAKIC, 1971). Estes progenitores neurais dividem-se na superfície ventricular para formar células-tronco neurais pluripotentes adicionais (GÖTZ; BARDE, 2005), que podem reter características que equivalem às da glia radial, que atuam tanto na migração quanto na gênese de novos neurônios (NOCTOR et al., 2004).

Nos humanos, a segunda camada de proliferação celular, ZSV, está dividida em ZSV interna e externa. Nesta camada, as divisões dos progenitores neurais mudam para assimétricas (NOCTOR et al., 2001), com duas células filhas. Neurônios pós-mitóticos são gerados a partir de uma célula enquanto a outra entra novamente no ciclo celular para dar origem a outra célula progenitora, por meio de divisão assimétrica. Esse grupo celular específico, com capacidade de divisão assimétrica, conhecido como progenitores intermediários, são responsáveis pela amplificação em número de células, devido à sua rápida cinética mitótica e divisões assimétricas em série (SMART et al., 2002).

Recentemente descrita por Haldipur e colaboradores, as zonas progenitoras primárias em expansão do cerebelo humano em desenvolvimento possuem células proliferativas, com origem do lábio rômico, que formam uma ZSV no cerebelo, contendo células morfologicamente semelhantes às células da glia radial externa do córtex cerebral, que dão suporte a uma maior expansão do órgão. Esta semelhança pode estar somente no desenvolvimento humano (HALDIPUR et al., 2019).

A neurogênese do lábio rômico do futuro cerebelo permanece desde a 11ª semana de gestação e persiste até os 9 meses após o nascimento (KEEFE;

NOWAKOWSKI, 2020). Tanto o cérebro quanto o cerebelo são muito imaturos ao nascimento, sabemos que 80% dos neurônios, em adultos humanos, residem no cerebelo (AZEVEDO et al., 2009). A persistência de células germinativas do lábio rômico no cerebelo em desenvolvimento, específica em humanos, parece ser crítica para o desenvolvimento típico do cerebelo (KEEFE; NOWAKOWSKI, 2020).

Embora a maior parte da proliferação neuronal ocorra no período fetal, nas últimas décadas foi identificada neurogênese adulta em roedores e primatas (RAKIC, 2002), que ocorre principalmente no giro denteado do hipocampo. O papel que a neurogênese adulta desempenha permanece controversa (revisado por MING&SONG, 2011).

1.1.1.2. MIGRAÇÃO

Os neurônios recém-formados iniciam seu processo de migração. Destaque-se que os mecanismos da migração neuronal são diversos, e sua conclusão bem-sucedida é essencial para muitos aspectos da função cerebral típica.

A migração radial, inicialmente demonstrada em colunas, se dá por meio do deslocamento de novos neurônios que se fixam a um prolongamento guia das células da glia radial, e se movem ao longo da estrutura da placa cortical em desenvolvimento (SIDMAN; RAKIC, 1973). Um prolongamento de glia radial pode suportar a migração de muitos neurônios para o seu alvo no SN. Os neurônios que percorrem maiores distâncias usam diferentes tipos de sinalização ao longo de sua rota migratória para direcionar seu movimento. O período de migração pode se sobrepor ao período proliferativo, seu pico acontece por volta do quinto mês de gestação (DE GRAAF-PETERS; HADDERS-ALGRA, 2006).

Na ZSV externa, há uma dispersão lateral dos neurônios em migração, conhecida como migração tangencial. As fibras da glia radial podem se estender apenas em parte do caminho, forçando os neurônios, que iniciam a migração na ZSV, a trocar de fibras e se dispersar tangencialmente no caminho para a placa cortical (SMART et al., 2002). A descontinuidade desta fibra radial oferece oportunidade de dispersão horizontal, uma vez que os neurônios migram de fibra para fibra. Este

mecanismo pode ser importante na expansão da área de superfície e do dobramento neocortical (NOCTOR; MARTÍNEZ-CERDEÑO; KRIEGSTEIN, 2007).

Com a formação da primeira camada celular, a placa cortical inicia a formação laminar do córtex. A distribuição é ordenada, seguindo o padrão *inside-out*, ou seja, quando o posicionamento de novos neurônios se dá de dentro para fora (SIDMAN; RAKIC, 1973). Um neurônio recém-formado deve ultrapassar aqueles já estabelecidos na placa cortical e se posicionar logo acima. Sendo assim, as camadas mais superficiais do córtex, camadas II e III, têm origem no final do desenvolvimento, enquanto as camadas mais profundas, V e VI, no início (KOSTOVIĆ et al., 1995).

1.1.1.3. FORMAÇÃO DE CIRCUITOS NEURAIIS

Após alcançar o seu destino, os neurônios recém-formados se estabelecem em suas regiões e precisam integrar a rede de processamento de informações. Para isto, passam a desenvolver seus prolongamentos, axônios e dendritos, que permitem estabelecer a comunicação com outros neurônios que definirão os circuitos neurais. Com 26 semanas de gestação é o momento do pico de transferência de conexões sinápticas aferentes da subplaca para a placa cortical (ZECEVIC, 1998).

Os neurônios emitem seu axônio para uma célula alvo apropriada, que pode ser local ou estar a longas distâncias. Pistas ambientais de sinalização direcionam o axônio, algumas dicas são atrativas e outras são repulsivas, estas orientam o movimento para o seu destino e impedem os prolongamentos de entrarem em área alvo errada (RAPER; MASON, 2010). Seguindo o sequenciamento de dentro para fora da laminação cortical, a sinaptogênese começa mais cedo nas camadas mais profundas do que nas mais superficiais (HUTTENLOCHER, 1990).

À medida que as conexões neurais se tornam eficazes, as células-alvo produzem fatores neurotróficos, que serão necessários para a manutenção desta comunicação (EYRE et al., 2001). Os neurônios que são capazes de responder aos fatores tróficos têm maior probabilidade de sobreviver. As mesmas moléculas de adesão que participam na orientação de axônios podem contribuir para a identificação e estabilização de sinapses com as células-alvo, bem como para a capacidade de um axônio em crescimento reconhecer os seus sítios específicos (SERAFINI et al., 1996). As células que enviam prolongamentos para regiões incorretas são eventualmente

eliminadas porque essas células são menos propensas a manter comunicação em sincronia com a célula pós-sináptica, e então deixa de liberar os fatores tróficos necessários (EYRE et al., 2001). Assim, a atividade neuronal coerente também é importante para a sobrevivência e manutenção de neurônios, sinapses e circuitos neurais.

A formação de circuitos com sinapses talamocorticais, corticotalâmicas e corticocorticais se inicia logo após o desenvolvimento da subplaca. O fornecimento de fatores tróficos para o desenvolvimento da placa cortical guia os prolongamentos até seus sítios, localizados em camadas preliminares do córtex. Neste momento, ocorre um período de rápido crescimento axonal que marca o início da formação dos circuitos corticais (KOSTOVIC; GOLDMAN-RAKIC, 1983). A arborização dendrítica e a sinaptogênese são aceleradas no terceiro trimestre da gestação para produzir um espessamento do córtex em desenvolvimento (HUTTENLOCHER, 1990). Os padrões de dobramento neocortical estão provavelmente relacionados ao efeito combinado de mecanismos iniciais de proliferação, à diferenciação neuronal, e posterior formação de circuitos, incluindo a tensão exercida pelas fibras axonais que conectam as regiões corticais associadas (ESSEN, 1997).

1.1.1.4. MORTE CELULAR PROGRAMADA

Uma vez que as vias de conexão estejam completas, os neurônios que não estabeleceram conexão com seu alvo retraem seus prolongamentos e as próprias células morrem gradualmente, processo chamado morte celular programada ou apoptose (COWAN et al., 1984). Os processos de poda começam no final da gestação e tornam-se cada vez mais ativos após o nascimento.

Estima-se que cerca de metade dos neurônios produzidos durante a neurogênese morrem no processo de apoptose até o final da adolescência (LOSSI; MERIGHI, 2003). As razões para o excesso de produção da maioria dos tipos neuronais e glia não são totalmente compreendidas. Uma função importante mediada pela apoptose durante o período de desenvolvimento do SN é a regulação e estabelecimento de circuitos neurais, eficazes e funcionais (KATZ; SHATZ, 1996). A perda de neurônios parece servir para ajustes e eliminação de projeções aberrantes e remoção de ramos axonais terminais e suas sinapses, refinando as conexões

sinápticas (LEVITT, 2003). A superativação deste processo pode ter implicações deletérias importantes para o desenvolvimento do cérebro (VOLPE, 2018).

Em uma primeira etapa, a morte celular é descrita envolvendo principalmente células precursoras em proliferação na ZV, o que começa por volta da 7ª semana gestacional e continua durante todo o primeiro trimestre (BLASCHKE; STALEY; CHUN, 1996). Esse fenômeno está relacionado com processos intracelulares ligados à regulação do ciclo celular (DE LA ROSA; DE PABLO, 2000). Uma segunda etapa de apoptose atinge o pico por volta de 20 semanas gestacionais. Esta elimina os neurônios pós-mitóticos dentro da placa cortical. Nesta onda, a apoptose é regulada pela atividade sináptica, fatores tróficos ligados à membrana que são produzidos pela glia e outros neurônios (LOSSI; MERIGHI, 2003). A maior parte da morte celular programada ocorre por fatores naturais em populações neurais, e acontece no período pré-natal. A morte celular em populações da glia e os eventos que envolvem a produção exuberante e a poda de conexões são, em grande parte, eventos pós-natais.

1.1.1.5. MATURAÇÃO

Além dos neurônios, o grupo de células que ajuda a compor o encéfalo é composto por micróglia, oligodendrócitos e astrócitos, presentes no sistema nervoso central (SNC). Estas células participam de funções além do suporte para os neurônios, orientação da migração neuronal, regulação da composição do ambiente extracelular, modulação das conexões sinápticas, e síntese de neurotransmissores (PURVES, 2018).

Os astrócitos povoam a substância branca e a substância cinzenta. Eles têm formato de estrela, com filamentos que se encontram tanto em contato com as sinapses, quanto com os vasos sanguíneos no encéfalo. Desempenham uma variedade de funções nutricionais e de suporte em relação à homeostase neuronal. As células de microglia estão presentes em períodos precoces do desenvolvimento (MONIER et al., 2006). A substância branca cerebral é densamente povoada com microglia ativada, células que desempenham papéis importantes durante o desenvolvimento do cérebro, envolvendo vascularização, apoptose, desenvolvimento axonal e, posteriormente, mielinização (REZAIE; MALE, 2002).

Logo nos primeiros meses após o nascimento há uma mudança dramática na estrutura e função do encéfalo. O aumento do volume encefálico durante o primeiro ano de vida é iniciado no cerebelo, seguido pelas áreas subcorticais e, posteriormente, pelo córtex cerebral (KNICKMEYER et al., 2008). A expansão da glia e a mielinização, contribuem de forma significativa para o crescimento encefálico observado em recém-nascidos e crianças (DEKABAN; SADOWSKY, 1978). Estudos anatômicos e de ressonância magnética mostram que a mielinização avança na direção posterior-anterior (BRODY et al., 1987; PAUS et al., 2001). As vias sensoriais mielinizam primeiro, seguidas pelas vias motoras, e depois pelas áreas de associação. A mielinização atinge as porções mais distantes dos lobos frontais entre 7 e 11 meses de idade (BARKOVICH et al., 1988). A produção de mielina aumenta a velocidade da transmissão de informações que se propagam ao longo dos neurônios. O processo de revestimento da membrana de mielina ao redor dos axônios, no ser humano, acontece por um longo período. Por volta da semana 30 de gestação, os precursores de oligodendrócitos já estão todos formados e contatam os axônios. Esses locais de contato servem para ancorar o oligodendrócito antes que ele inicie o enrolamento em espiral da mielina (STERNBERGER, 1978). O seu período mais intenso é nos primeiros 2 anos de vida pós-natal, seguido por um estágio de platô, e se diferencia nas regiões encefálicas (VAN DER KNAAP et al., 1990).

A linha do tempo e a relação entre os processos de proliferação, migração, diferenciação e regressão podem aparecer sobrepostas (Figura 4). Esses acontecimentos no período pós-natal em humanos têm sido cada vez mais estudados, e métodos de imagem mais recentes têm auxiliado a delimitar essas questões (GAREL et al., 2001).

Durante o período de desenvolvimento do SNC cada estrutura apresenta uma composição celular específica, tempo de desenvolvimento e processos biológicos particulares. Esses processos marcam as diferenças funcionais e em sua morfologia de cada estrutura. Estudos sobre a expressão de genes no desenvolvimento, por exemplo, elucidam questões sobre o processo do desenvolvimento de cada estrutura e o início de suas funções biológicas específicas (MILLER et al., 2014).

Nos humanos, estruturas como as zonas proliferativas e células progenitoras, que facilitam a expansão do encéfalo, possuem características que diferenciam os períodos de desenvolvimento de cada estrutura. O neocortex inicia a neurogênese precocemente (Figura 4) (STAGNI et al., 2015); o cerebelo tem zonas de proliferação detectáveis até o nascimento (KEEFE; NOWAKOWSKI, 2020); e o giro denteado do hipocampo permanece com a neurogênese, em um ritmo menor, ao longo da vida (BOLDRINI et al., 2018).

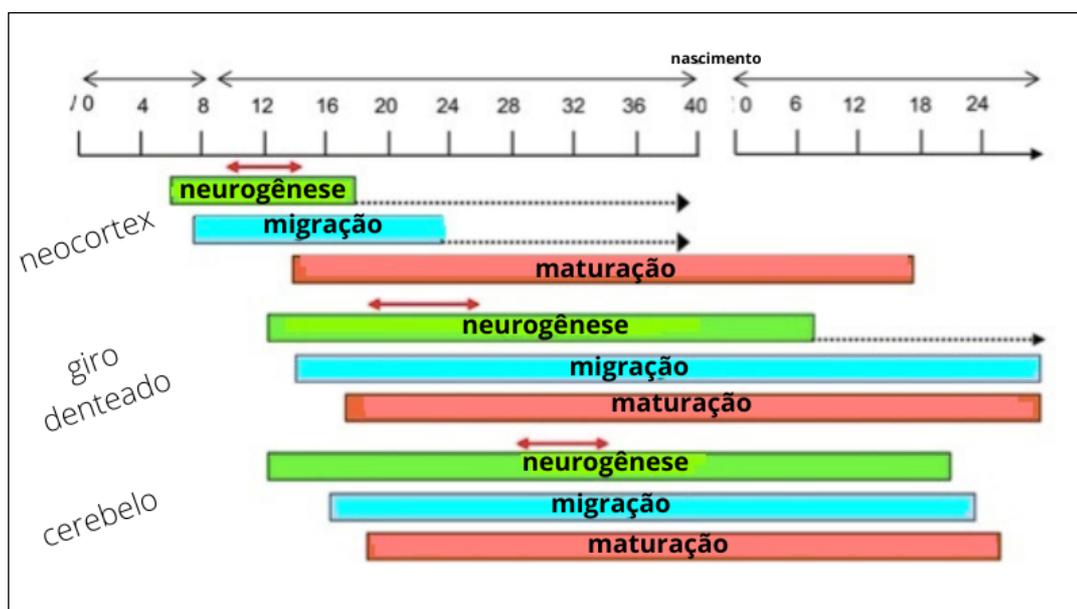


Figura 4 Linha do tempo de diferentes etapas do desenvolvimento do encéfalo humano em diferentes regiões encefálicas – Adaptado Stagni, 2015.

Cuidados pré-natais e pós-natais de qualidade são cruciais para a saúde das mães e dos recém-nascidos. O cuidado deve ser integral e deve procurar estabelecer perspectivas que compreendem os processos de saúde e doença como um todo, levando em consideração aspectos sociais, necessidades intelectuais, econômicas, o ambiente cultural e físico em que a mulher e sua família vivem, e não somente um cuidado biológico (CHALMERS et al., 2001).

Alterações em qualquer uma das etapas anteriormente descritas pode levar ao desenvolvimento anormal do SN, com diferentes graus de severidade, gerando impacto no adequado funcionamento do indivíduo na vida pós-natal. A etiologia destas alterações é diversa, como por exemplo, a combinação de fatores genéticos somados a deficiências na ingestão de vitaminas (BLOM et al., 2006). A exposição a fatores ambientais, como álcool antes dos 3 meses de gestação, combinado com o estado

nutricional parecem modular o desenvolvimento da síndrome alcoólica fetal e as malformações cerebrais mais recentemente reconhecidas associadas a ela (PAUL et al., 2007). O abuso de drogas, e os efeitos do parto prematuro também são fatores que predispõem a resultados cognitivos e de neurodesenvolvimento ruins (NESS et al., 2001). Anormalidades metabólicas maternas, exposição a substâncias teratogênicas e infecções maternas levam a manifestações congênitas (ABUELO, 2007), que podem ocorrer em qualquer fase da gestação com diferentes repercussões.

1.2. ALTERAÇÕES DO DESENVOLVIMENTO DO ENCÉFALO HUMANO SECUNDÁRIAS A INFEÇÕES CONGÊNITAS

Algumas infecções bacterianas maternas são comuns, porém não apresentam risco elevado ao desenvolvimento do SN durante a gestação, como por exemplo, a infecção do trato urinário materno, tendo como agente causador a *Escherichia coli*, relatada como a complicação clínica mais frequente durante a gestação (SCHENKEL et al., 2014), seu diagnóstico precoce e tratamento são recomendados visto que a infecção está associada ao baixo peso ao nascer e parto pré-maturo (GLASER; SCHAEFFER, 2015).

As malformações no SNC podem ocorrer em diferentes etapas do desenvolvimento: desde etapas precoces, até períodos pós-natais. Diferentes tipos de insultos durante a gestação podem impedir que o encéfalo se desenvolva normalmente. Fatores ambientais, lesão por hipóxia, anormalidades metabólicas maternas (BLOM et al., 2006), exposição a substâncias teratogênicas (PAUL et al., 2007), e algumas infecções que levam a manifestações congênitas (ABUELO, 2007). Infecções intrauterinas, como as englobadas no conjunto de doenças TORCH, - em que T designa a toxoplasmose; O outras (sífilis e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV); R rubéola; C citomegalovírus; H herpes simples; e, mais recentemente, o vírus ZIKA, são associados a fatores causadores de malformações (VOLPE, 2018).

A toxoplasmose, infecção causada pelo *Toxoplasma gondii* (TG) é comum e presente em todo o mundo. A infecção pelo protozoário TG em adultos geralmente é assintomática ou associada a sintomas limitados, por exemplo, febre, mal-estar e linfadenopatia (Hill; Dubey, 2002). A infecção em mulheres grávidas pode causar

sérios problemas de saúde se o parasita for transmitido ao feto (WALLON et al., 1999). Mulheres infectadas com o TG antes da concepção raramente o transmitem ao feto, mas aquelas gravemente infectadas ou com reativação da doença devido à imunossupressão, podem transmitir o TG através da placenta. Quando a infecção materna ocorre no primeiro trimestre, o risco de doença congênita é mais baixo do que quando a infecção materna ocorre no terceiro trimestre da gestação, no entanto, a doença congênita é mais grave quando a infecção ocorre no início da gravidez (KERNS et al., 2014). Entre as malformações decorrentes da toxoplasmose congênita, podem ser descritas: restrição de crescimento intrauterino, morte fetal, prematuridade, pneumonite, hepatoesplenomegalia, erupção cutânea e lesões oculares, sequelas no SN como surdez, convulsões, microcefalia, hidrocefalia, calcificações cerebrais e retardo mental (FURTADO et al., 2011). A toxoplasmose leva a defeitos na vascularização e proliferação neural (MARCOS et al., 2020).

A rubéola é uma infecção viral que geralmente cursa como uma doença sistêmica benigna, semelhante a um caso leve de sarampo, que tem como característica erupção cutânea, febre e linfadenopatia (LAMBERT et al., 2015). A vacina contra rubéola é altamente eficaz e, como resultado de um programa de imunização eficiente, a transmissão endêmica da rubéola foi interrompida nas Américas desde 2009 (ANDRUS et al., 2011). A grande ameaça em relação a este vírus se dá na infecção do feto, pois este apresenta alta patogenicidade para os tecidos embrionários. Durante o primeiro trimestre da gestação, a infecção materna pode cursar com aborto, natimortalidade e infecção da placenta, ocasionando infecção embrionária persistente e conseqüentemente ocasionar a síndrome da rubéola congênita (GRILLNER et al., 1983), que tem como sintomas: glaucoma, catarata congênita, cegueira, microftalmia, cardiopatia congênita, e entre as malformações no SN, encefalopatia progressiva, surdez central ou coclear, retardo mental e atraso global do desenvolvimento (MILLER et al., 1982). A rubéola está relacionada a processos destrutivos que incidem sobre a proliferação celular (VOLPE, 2018).

A infecção por ZIKA tem como agente um flavivírus identificado inicialmente na África, transmitido pelo mosquito *Aedes* (DICK et al., 1952). O quadro clínico desta infecção assemelha-se ao da dengue e Chikungunya, se manifesta por febre, cefaleia,

artralgia, mialgia e erupção maculopapular. Alguns casos mais graves, com manifestações neurológicas e da síndrome de Guillain-Barré em adultos foram descritos na Polinésia Francesa (IOOS et al., 2014) e no Brasil durante a epidemia de ZIKA. A infecção por ZIKA durante a gravidez é prejudicial ao feto e pode levar à morte fetal. Outras possíveis complicações encontradas em neonatos compreendem a síndrome congênita do Zika, tendo a microcefalia como desfecho mais frequente, associado a variados graus de deficiência intelectual (MLAKAR et al., 2016). Dependendo da gravidade, as crianças com microcefalia podem apresentar diferentes manifestações, como deficiência intelectual, retardo no desenvolvimento, epilepsia, paralisia cerebral, além de distúrbios de visão e audição (ABITZ et al., 2007). Ainda são descritas como sequelas da síndrome congênita da ZIKA: hipertonicidade, convulsões, choro e irritabilidade nos primeiros meses de vida, sinais osteoesqueléticos incluindo pé torto congênito e displasia de quadril. Alterações na morfologia craniana como sobreposição de suturas e fontanelas fechadas estão associadas a esta infecção (FREITAS et al., 2011).

O citomegalovírus (CMV) pertence à família dos vírus do herpes. A infecção pode ser adquirida através do contato próximo com pessoas que transmitem o vírus, especialmente crianças. As fontes de transmissão do vírus são secreções respiratórias, sangue, urina, secreções cervicais, esperma e leite materno. Após a infecção primária, ocorre a excreção do vírus, que pode durar semanas ou anos. A maioria das crianças e adultos infectados são assintomáticos ou apresentam sintomas mínimos semelhantes aos encontrados em qualquer doença febril aguda (KIMBERLIN et al., 2015).

O CMV pode ser transmitido da mãe para o filho em diferentes momentos: durante a vida fetal, pela disseminação sanguínea do vírus; no parto, pelo contato do recém-nascido com sangue e secreções genitais maternas; durante a amamentação, o leite materno pode conter o vírus caso a mulher tenha sido infectada em algum momento de sua vida. Em infecções com sintomas mais graves temos trombocitopenia, petéquias, hepatomegalia, esplenomegalia, restrição de crescimento intrauterino e hepatite. O envolvimento do SNC pelo CMV se manifesta como microcefalia, anormalidades de neuroimagem listadas como ventriculomegalia, calcificações intracerebrais, ecogenicidade periventricular e convulsões (KABANI; ROSS, 2020). A infecção por CMV possui mecanismos destrutivos celulares e

distúrbios na migração neuronal associados que contribuem para a microcefalia (VOLPE, 2018).

1.2.1. SÍFILIS CONGÊNITA

A sífilis é uma doença infecciosa, sexualmente transmissível, causada pelo *Treponema pallidum*. Suas manifestações clínicas têm evolução crônica, em múltiplos sistemas e se dividem em estágios. A sífilis primária, caracterizada pela presença de lesão avermelhada indolor, chamada de cancro. Após em média 6 semanas, são estabelecidos estágios secundários da doença, que têm por características lesões na pele e inchaço persistente. A sífilis latente, pode durar vários anos sem apresentar sintomas. A sífilis terciária pode se manifestar depois de vários anos da infecção, com lesões cutâneas, cardiológicas e neurológicas (AVELLEIRA; BOTTINO, 2006).

Quando a infecção materna não é tratada ou o tratamento é inadequado, a disseminação hematogênica do treponema gera a infecção congênita do feto, que pode ocorrer por mecanismos transplacentários, quando os treponemas atingem a placenta e afetam múltiplos órgãos fetais (LAGO; VACCARI; FIORI, 2013). A penicilina é a droga de escolha para o tratamento da mãe durante a gestação. Nenhum outro medicamento é recomendado para o tratamento da sífilis durante a gravidez. A dessensibilização da penicilina é recomendada para pacientes com alergia comprovada à penicilina (SHEFFIELD et al., 2002).

Segundo dados do Ministério da Saúde do Brasil, um total de 167.523 casos de sífilis adquirida foram notificados no Brasil em 2021, com uma taxa de detecção de 78,5 casos por 100.000 habitantes. Foram registrados 27.019 casos de sífilis congênita, com taxa de 9,9 casos a cada 1.000 nascidos vivos. O número de mortes por sífilis congênita registradas em 2021 é de 192 casos, com uma taxa de mortalidade de 7,0 a cada 100.000 nascidos vivos. O Rio de Janeiro é a região com maior taxa de detecção de sífilis em gestantes e maior incidência de sífilis congênita no país. De 2011 a 2021, um total de 1.035.942 casos de sífilis adquirida foram notificados no Brasil (BRASIL, 2022).

A passagem transplacentária de treponemas durante a gravidez pode ocorrer em qualquer estágio clínico da sífilis materna (GENÇ; LEDGER, 2000). O risco do

acometimento fetal aumenta com a progressão do período gestacional, mas a infecção pode ocorrer em qualquer fase da gravidez (GRIMPREL et al., 1991). Dois fatores são importantes para determinar o quanto o feto será comprometido: o estágio da infecção materna e o tempo de exposição fetal a essa infecção (SHEFFIELD et al., 2002). Em fases mais tardias de infecção materna, melhor o desfecho fetal. Esse achado pode estar relacionado a um efeito protetor da imunidade materna adquirida, e menor carga de treponemas circulantes (CADDY et al., 2011). A carga circulante dos treponemas cai, mas não desaparece se não houver tratamento adequado (LAGO; VACCARI; FIORI, 2013).

A sífilis congênita é dividida em estágios precoce e tardio. Quando as manifestações da infecção ocorrem até os 2 primeiros anos de vida, são chamadas de precoce. Após essa idade, é denominada tardia (WOODS, 2005). A sífilis congênita raramente está associada a fenômenos neurológicos evidentes. Em relação ao SNC, suas manifestações parecem ser relativamente comuns. A doença tem ampla variabilidade clínica, podendo se manifestar desde formas assintomáticas, na maioria dos casos do período neonatal, até casos graves, ocasionando óbito fetal e neonatal (WOODS, 2005).

A meningite sífilítica aparece logo no período neonatal e em períodos tardios, aos 4 anos. Tem por característica inflamação por células mononucleares, principalmente linfócitos, plasmócitos e macrófagos. Suas áreas de inflamação atingem as meninges basilares, acometendo os nervos cranianos e ao redor dos vasos sanguíneos. A infecção perivascular pode se estender até o parênquima cerebral. Camadas superficiais do córtex cerebral podem estar envolvidas pelos infiltrados inflamatórios (VOLPE, 2018).

As consequências conhecidas da sífilis congênita no SNC são atrofia óptica e lesão do nervo auditivo. Sintomas clínicos como convulsões, paralisias de nervos cranianos, hidrocefalia, sinais de aumento da pressão intracraniana (por exemplo, fontanela anterior abaulada), e déficits neurológicos focais, são aparentes já no período neonatal (ZABRISKIE, 1923). As manifestações clínicas tardias incluem anormalidades dos dentes, perda visual, surdez neurossensorial, e sinais de doença cerebral (paresia geral) ou doença da medula espinhal (ZABRISKIE, 1923).

A avaliação da história clínica combinada com estudo sorológico é fundamental no diagnóstico da sífilis. Dois tipos básicos de testes são usados: não treponêmicos e treponêmicos. O ensaio não treponêmico mais amplamente utilizado para anticorpos contra esse antígeno é o Teste do Laboratório de Pesquisa de Doenças Venéreas ou Venereal Disease Research Laboratory (VDRL), que deve ser aplicado na mãe e na criança (BRASIL, 2022). Os testes não treponêmicos são úteis para investigação de sífilis ativa e monitoramento do tratamento, com estes testes é possível comparar o título do diagnóstico com títulos do tratamento subsequente. Os testes treponêmicos baseiam-se na detecção de anticorpos produzidos pelo hospedeiro em resposta imunológica, utilizam o *T. pallidum* como antígeno para detectar anticorpos treponêmicos. Podem ser do tipo *fluorescent treponemal antibody absorption* (FTA-Abs), *T. pallidum particle agglutination* (TPPA), *T. pallidum haemagglutination assay* (TPHA), além de testes rápidos imunocromatográficos. Os testes rápidos são fáceis de realizar, não necessitam de infraestrutura de laboratório e podem ser aplicados por qualquer pessoa qualificada, seus resultados ficam disponíveis em até 30 minutos (GASPAR et al., 2021).

As principais medidas preventivas para a sífilis congênita incluem tratar a infecção materna, por meio de acompanhamento pré-natal de qualidade. As gestantes com diagnóstico de sífilis devem ter tratamento adequado da infecção materna, o recomendado atualmente é o uso de penicilina benzatínica, incluindo o tratamento de seus parceiros sexuais, evitando a reinfecção. Entretanto, em 2021, 81,1% das mães com tratamento prescrito para sífilis congênita, apresentavam inadequação ou não realização, perdendo a oportunidade de evitar assim a transmissão vertical (BRASIL, 2022). É recomendado um exame cuidadoso de mulheres em trabalho de parto para verificar evidência de sífilis primária, assim como o tratamento imediato da criança exposta à infecção (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE [WHO], 2017). No Brasil, a mortalidade infantil por sífilis aumentou 84,6% entre 2011 e 2021, passando de 3,8 para 7,0 óbitos/100.000 nascidos vivos (BRASIL, 2022).

Apesar da Sífilis congênita ser uma doença há muito tempo conhecida, com diversos estudos sobre possíveis alterações causadas no feto, os mecanismos da infecção que afetam o SNC em desenvolvimento necessitam de mais esclarecimentos.

1.3. ESTUDOS QUANTITATIVOS DA CELULARIDADE DO ENCÉFALO

O encéfalo humano sofre uma variação no número de células neurais e um aumento em volume nas semanas pós-natais (DOBBING; SANDS, 1973). Para entender as mudanças ao longo do desenvolvimento no encéfalo humano, técnicas não invasivas de neuroimagem, principalmente por ressonância magnética, têm ganhado destaque no estudo *in vivo*. As técnicas buscam mapear as diferenças em estruturas macroscópicas e no volume do encéfalo (FOGLIARINI et al., 2005; MATSUZAWA et al., 2001). Os marcos de desenvolvimento, como o aparecimento de giros e sulcos, têm sido delimitados cada dia com mais precisão, bem como o aumento de volume nas diferentes regiões do encéfalo durante os períodos do desenvolvimento gestacional (LEVITT, 2003).

Um estudo utilizando ressonância magnética com crianças prematuras e com nascimento a termo, buscou quantificar alterações do volume cerebral total e nos volumes totais de substância cinzenta e substância branca mielinizada e não mielinizada. Os resultados determinam que no lactente há grande progressão do desenvolvimento da substância cinzenta cortical cerebral e da mielinização ao longo de um período crítico de 29 até 41 semanas pós-concepção (HÜPPI et al., 1998).

O encéfalo humano em desenvolvimento não pode ser acessado experimentalmente (FARAHANY et al., 2018). Construir modelos experimentais, para estudo *in vivo* do desenvolvimento tem sido um desafio. O recente surgimento de organoides do encéfalo humano representa um grande avanço na modelagem da complexa característica de estrutura celular do encéfalo humano embrionário *in vitro* (ADAMS; CUGOLA; MUOTRI, 2019). Os organoides podem gerar os principais tipos de células de uma região cerebral complexa, como o córtex cerebral (VELASCO et al., 2019). Esses novos modelos têm grande potencial para complementar os estudos de cultura de células 2D que limitavam o grau de complexidade arquitetônica e interação célula-célula. Novos aspectos do desenvolvimento, patologias e impactos na funcionalidade do encéfalo humano poderão ser melhor explorados (QUADRATO; BROWN; ARLOTTA, 2016).

Pesquisas antigas utilizando métodos quantitativos, com material *post-mortem*, descrevem o desenvolvimento encefálico. Em 1973, um estudo de Dobbing e Sands

descreve as diferenças de massa e células neurais de 139 encéfalos, desde o período fetal até a idade adulta, utilizando a extração de DNA para determinar o número de células neurais, tendo como evidência o pico de desenvolvimento de células neurais após o nascimento, que ocorre por volta de 18 semanas de vida pós-natal (DOBBING; SANDS, 1973).

Em ratos, usando a técnica do fracionamento isotrópico, foi descrito o aumento no número de neurônios logo após o nascimento. Em seguida, notou-se uma perda desse número concomitante com a geração de células não-neuronais no cérebro, sugerindo que os neurônios encontrados no cérebro adulto não são necessariamente gerados durante o período embrionário (BANDEIRA; LENT; HERCULANO-HOUZEL, 2009). Porém, o encéfalo humano é diferente: o neocortex possui várias diferenças em comparação com outros animais, incluindo os primatas não humanos (LUI; HANSEN; KRIEGSTEIN, 2011). Essas diferenças são grandes desafios para o estudo do desenvolvimento do SNC humano.

Em humanos foi descrito que o número de neurônios no encéfalo do adulto é aproximadamente 86 bilhões, sendo a sua maioria localizada no cerebelo (AZEVEDO et al., 2009). Quando este número é comparado entre espécies de mamíferos, roedores e primatas, é possível perceber que este não é diretamente proporcional ao tamanho do encéfalo. O encéfalo do elefante, embora maior, não tem necessariamente mais neurônios que um encéfalo humano, por exemplo (HERCULANO-HOUZEL, 2011). As pesquisas que utilizam a técnica do fracionamento isotrópico têm como princípio transformar o tecido encefálico, altamente anisotrópico, em uma suspensão isotrópica de núcleos (HERCULANO-HOUZEL; LENT, 2005). A técnica destaca-se por ter baixo custo e utilizar poucos materiais (HERCULANO-HOUZEL et al., 2015).

Ainda com material *post-mortem*, pesquisas sobre o número de células neurais em humanos utilizam com mais frequência a técnica da estereologia, um dos principais métodos de quantificação celular (SCHMITZ & HOF, 2005). Esta técnica verifica a distribuição tridimensional de objetos a partir de seções. Com um número determinado de amostras de partes do tecido, faz-se a estimativa do todo. A estereologia tem sido mais indicada para estudos com estruturas de densidade celular homogênea, com limites bem estabelecidos (LENT et al., 2012), o que requer técnicas

elaboradas, que exigem tempo de treinamento e processamento (HERCULANO-HOUZEL et al., 2015).

Em um estudo com 10 casos, verificou-se a estabilização do número de neurônios após o nascimento, com um aumento do número de células da glia nos primeiros 3 anos de vida (KJÆR et al., 2017). Outro estudo, realizado com 8 recém-nascidos e 8 adultos, comparou o número de neurônios em um núcleo do tálamo e evidenciou que em adultos o número de neurônios foi, em média, 41% menor quando comparado aos de recém-nascidos. Em todos os casos foi demonstrado um número de neurônios significativamente menor no adulto em comparação com os recém-nascidos (ABITZ et al., 2007).

Em idades fetais precoces, um estudo mostrou o crescimento exponencial de células no prosencéfalo nas primeiras 20 semanas gestacionais, seguido de um crescimento linear até o período do nascimento (LARSEN, 2017). No cerebelo, grande parte das células granulares é gerada no período pós-natal, o cerebelo humano tem sua plasticidade estrutural aumentada durante o primeiro ano de vida (KIESSLING et al., 2014).

O desenvolvimento do SNC humano é um processo intrincado e dinâmico. O encéfalo, órgão complexo do nosso corpo, tem características mutantes ao longo do desenvolvimento. A pesquisa em humanos compartilhada com modelos animais é essencial para compreender os mecanismos por trás dos insultos que podem acometer o desenvolvimento de feto e os neonatos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Determinar a composição celular absoluta (células neuronais, não-neuronais e totais) do encéfalo humano em desenvolvimento.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a composição celular do encéfalo humano e suas subdivisões (telencéfalo e cerebelo) durante o desenvolvimento.

Comparar a composição celular de encéfalos de neonatos a termo com a do adulto.

Comparar a composição celular do encéfalo de um neonato a termo, com desenvolvimento típico, em relação a um caso de sífilis congênita da mesma idade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. CAPTAÇÃO DOS ENCÉFALOS HUMANOS

O presente estudo contou com a colaboração do Biobanco da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), vinculado ao Serviço de Verificação de óbitos (SVO), e da Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). O estudo obteve aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Escola da UFRJ, número do Parecer 1.705.093 (Anexo 1) e do Biobanco da Faculdade de Medicina da USP, número do Parecer 5.235.830 (Anexo 2). Todos os encéfalos foram coletados entre fevereiro de 2017 e fevereiro de 2020.

Foram incluídos encéfalos de fetos ou crianças que foram a óbito com até 1 (um) ano de nascidas obtidos através de doação, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 3) pelo responsável. O momento do óbito devia ser conhecido, para aferição do intervalo *post-mortem*. Como critério de exclusão, tivemos o tempo de óbito desconhecido e intervalo *post-mortem* acima de 24h.

Após a verificação do óbito, uma avaliação foi realizada pela equipe para a inserção de cada caso na pesquisa de acordo com os critérios de inclusão já descritos. Um familiar mais próximo foi contatado e convidado para participar deste estudo. Em todos os casos foram explicados os direitos, procedimentos e riscos envolvidos. Dada a aceitação de participação, foi assinado o TCLE.

Os dados de cada caso foram coletados por meio de análise do prontuário e da Ficha de Relato de Caso (Anexo 4). Essas informações compreendem: dados demográficos, antecedentes patológicos, ginecológicos, obstétricos e toxicológicos maternos, e informações sobre a via de parto, medidas antropométricas do recém-nascido e resultados de exames laboratoriais.

Para a preservação do tecido neural, o encéfalo foi removido com as meninges e principais vasos. Em estudos prévios, não foram encontradas diferenças significativas entre os valores de números absolutos de células entre os hemisférios direito e esquerdo (AZEVEDO et al., 2009). Sendo assim, cada encéfalo foi clivado no plano mediano para separação dos hemisférios encefálicos. Um dos hemisférios de

cada caso foi destinado para a análise histopatológica, enquanto o hemisfério contralateral foi destinado para a quantificação celular.

A fixação foi realizada em paraformaldeído (PFA) a 2% em solução tampão fosfato salino (PBS 0,1M, pH 7,4) por 36 a 40 horas. Posteriormente, os encéfalos foram transferidos para PBS, e mantidos a 4°C.

3.2. DISSECÇÃO DOS ENCÉFALOS

No Laboratório de Neuroplasticidade do Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ foi realizada a dissecação de um hemisfério e a quantificação celular. Inicialmente, foi realizada a aferição da massa do hemisfério coletado. Após cuidadosa remoção da pia-máter e principais vasos sanguíneos, procedeu-se à nova aferição da massa. Na dissecação das áreas abordadas no estudo, foi seguida como referência a anatomia de giros e sulcos conhecidos por terem pouca variabilidade interpessoal.

Para a divisão do telencéfalo em lobos, o hemisfério foi posicionado com a face medial na superfície da tábua de corte e seus limites foram tomados com cortes perpendiculares à superfície (Figura 5). Os limites usados como referência foram o sulco central, o sulco lateral, a incisura pré-occipital e o sulco parieto-occipital.

Para delimitar o lobo occipital, conforme ilustrado na figura 5 por meio da utilização de linhas pontilhadas, foram utilizadas duas incisões traçadas na face lateral do telencéfalo: uma delas começando pela parte mais posterior do sulco lateral até o sulco parieto-occipital, e a outra tendo início na parte mais posterior do sulco lateral até a incisura pré-occipital.

Detalhamento adicional:

- O lobo frontal foi delimitado anteriormente ao sulco central e teve como limite inferior o sulco lateral.
- O lobo parietal foi identificado seguindo posteriormente o sulco central e superior ao sulco lateral, anterior à incisão entre a parte posterior do sulco lateral e o sulco parieto-occipital.

- O lobo temporal teve como limite superior o sulco lateral e seguiu até o limite da linha tracejada (Figura 5), referente ao limite da parte anterior do sulco lateral até a incisura pré-occipital.
- O lobo occipital foi identificado como o lobo posterior às linhas tracejadas, demonstradas na Figura 5.

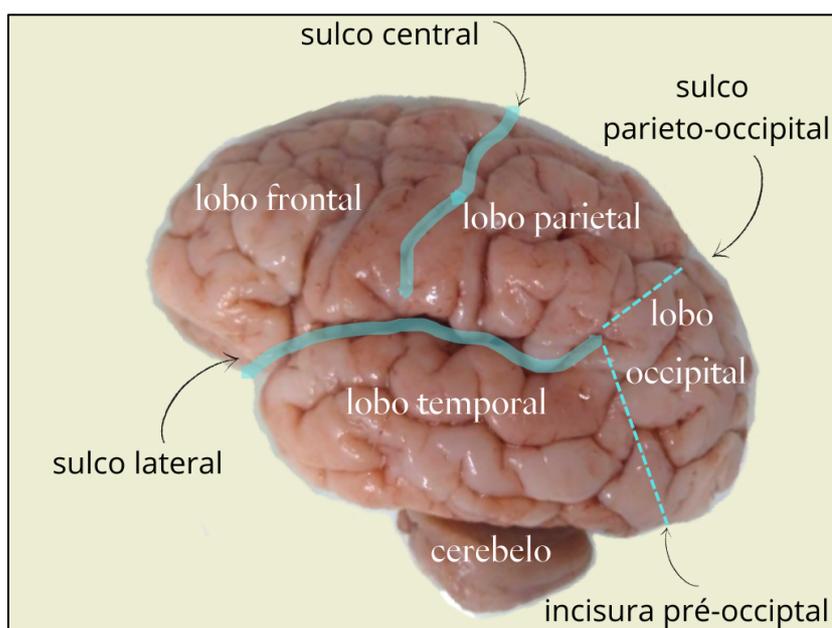


Figura 5 Dissecção – Representação dos limites para a dissecção do telencéfalo em lobos: Lobos frontal, temporal, parietal e occipital. Limites aplicados: sulco central, sulco lateral, incisura pré-occipital, sulco parieto-occipital. Linhas pontilhadas: indicam as linhas consideradas como limite anterior aplicado ao lobo occipital.

O tecido do encéfalo do feto é delicado, com textura macia. Em nossas amostras o caso H (Tabela 1), apresentou o tecido mais friável, de difícil manuseio, por este motivo, não foi possível a dissecção do telencéfalo em lobos. Durante a coleta do caso G (Tabela 1), não obtivemos o cerebelo e tronco para este estudo.

3.3. FRACIONAMENTO ISOTRÓPICO

Para a contagem do número absoluto de células, foi utilizada a técnica do Fracionamento Isotrópico, ilustrada na Figura 6, que permite transformar o tecido encefálico, que é altamente heterogêneo na sua densidade celular, em uma suspensão isotrópica de núcleos livres. Esta técnica está bem estabelecida no modelo animal (HERCULANO-HOUZEL; LENT, 2005), assim como em encéfalos adultos humanos (ANDRADE-MORAES et al., 2013; AZEVEDO et al., 2009), e foi

demonstrado que tem suas estimativas de contagem comparáveis com a técnica da estereologia (BAHNEY; VON BARTHELD, 2014).

Cada região foi submetida separadamente ao processo de fracionamento. Inicialmente, foi efetuada a pesagem, segmentação em pequenos fragmentos, e, então, procedeu-se à dissociação químico-mecânica. Posteriormente, em cada região, foi adicionada uma solução que continha citrato de sódio 40 mM e Triton X-100 a 1%. Com a utilização de um potter de vidro e com o auxílio de uma máquina semiautomática ou, manualmente, dependendo do tamanho da região a ser fracionada, o tecido neural foi macerado através do movimento contínuo vertical e rotacional produzido por um pistão (AZEVEDO et al., 2013). Esse processo permite o rompimento da membrana plasmática celular com a preservação da membrana nuclear, que oferece maior resistência por possuir uma dupla camada lipídica. Finalmente, o tecido neural é convertido em uma suspensão de núcleos livres, que pode ser mantida homogênea por constante agitação.

Após o tempo determinado de fracionamento, que teve como avaliação qualitativa a ausência de tecido não dissociado ou grumos, o material foi cuidadosamente removido do potter e então colocado em uma proveta com o volume devidamente aferido para a apropriada contagem de núcleos celulares.

3.3.1. QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS

Para cada região fracionada foi feita a contagem do número de células totais, acrescentando na suspensão homogênea um intercalante de DNA, 2% de 4'-6-diidrocloro de diamino-2-fenilindol (DAPI; Sigma-Aldrich), que emite uma cor azul brilhante para a identificação de todos os núcleos com o auxílio do microscópio de fluorescência (Zeiss Axio Imager) (Figura 6).

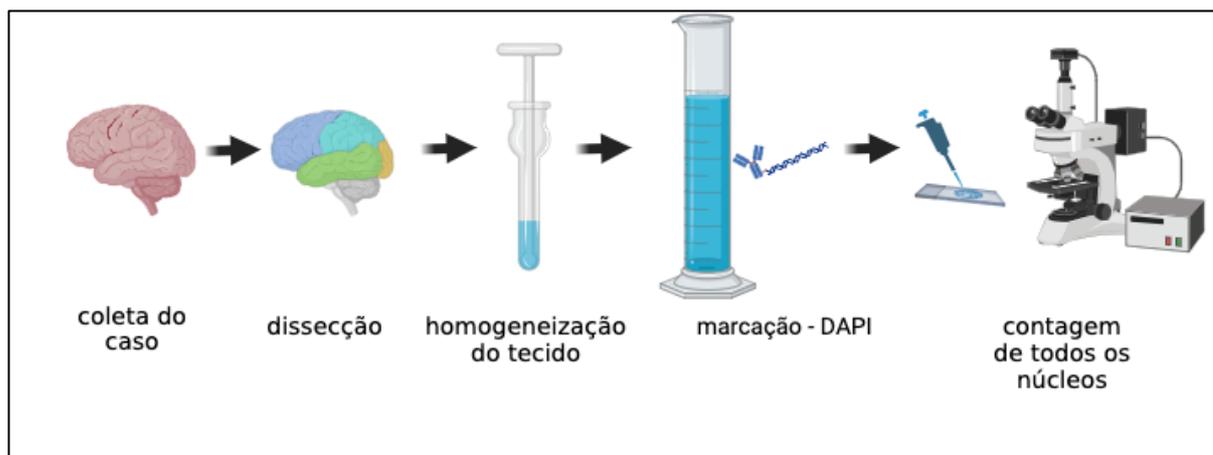


Figura 6 Fracionamento isotrópico- Esquema ilustrativo do processo de quantificação do número total de células.

A inspeção visual dos núcleos garante o controle de qualidade das amostras fracionadas obtidas. Somente núcleos intactos ou aqueles com mais da metade da circunferência foram contados. Tipicamente, com o tempo adequado de fracionamento, somente encontramos os núcleos intactos e a suspensão não contém nucléolos livres (Figura 8). As preparações com fracionados com núcleos rompidos, membranas dissolvidas, debris nucleares abundantes e nucléolos livres podem ser atribuídas a má qualidade do tecido, fixação insuficiente, ou excesso de exposição à solução detergente ou tempo prolongado de homogeneização, e devem ser descartadas (HERCULANO-HOUZEL et al., 2015). Por outro lado, a presença de agrupamentos nucleares em formato de grumos, indicam homogeneização insuficiente, revelando que a suspensão precisa continuar em processamento.

O resultado do número de núcleos encontrado é uma estimativa efetiva para o número total de células (HERCULANO-HOUZEL; LENT, 2005). No tecido nervoso, cada célula possui apenas um núcleo, ou seja, cada núcleo marcado corresponde a uma célula. A densidade dos núcleos foi estimada em alíquotas de 10 μ l da suspensão, dispostas em uma câmara de Neubauer. Foram realizadas pelo menos quatro contagens onde o coeficiente de variação deve ser menor do que 15% para a suspensão ser considerada isotrópica.

O número absoluto de células por região foi calculado pela multiplicação da densidade celular pelo volume total da suspensão isotrópica daquela região. Por ser uma suspensão homogênea, a densidade celular calculada em qualquer volume extraído da amostra sempre será a mesma.

3.3.2. QUANTIFICAÇÃO DE NEURÔNIOS

Após a estimativa do número total de células ser obtido, foi retirada de cada região fracionada uma amostra de 1ml da suspensão de núcleos para a marcação de neurônios por imunocitoquímica (Figura 7). Inicialmente, cada amostra foi centrifugada três vezes por cinco minutos. Após cada etapa de centrifugação, os sobrenadantes da amostra foram descartados e o resultado da centrifugação, o pellet, foi ressuspenso e lavado com PBS. Nesta etapa os detritos celulares, restantes da homogeneização, são descartados nos sobrenadantes, restando somente a amostra de núcleos celulares. Na sequência, em cada amostra foi aplicado o anticorpo primário monoclonal anti-NeuN (MAB377; Millipore), a uma concentração de 1:200 em PBS, que ficou incubado durante a noite a 4°C em constante agitação. Para o controle negativo, utilizou-se uma amostra por região sem a aplicação do anticorpo primário.

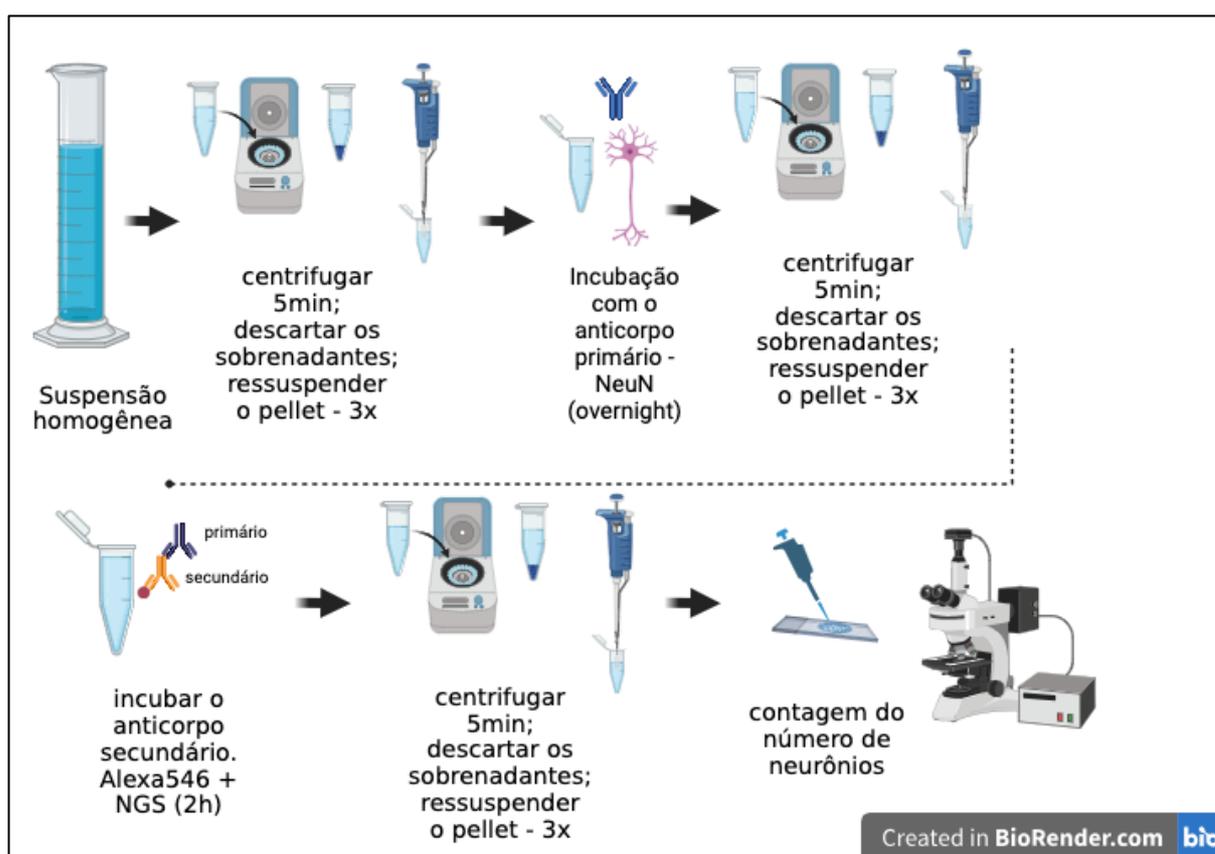


Figura 7 Quantificação do número total de neurônios - Esquema ilustrativo do processo de quantificação neuronal.

Como passo seguinte, após o período de incubação, foram realizados três novos processos de centrifugação por cinco minutos, em cada amostra, que foram lavadas com PBS e após foi aplicado o anticorpo secundário Alexa Fluor 546 (1:300,

A1103; Thermo Fischer) em 260µl de PBS, 30µl de soro normal de cabra (16210-064; Thermo Fischer) e 10µl de DAPI, as amostras foram mantidas preservadas da luz direta durante duas horas para a incubação do anticorpo. Ao final, foi realizada nova centrifugação das amostras e homogeneização. Para contagem no microscópio de fluorescência, alíquotas de 10 µl, foram dispostas na câmara de Neubauer, conforme ilustrado na Figura 7. Foi quantificado um total de 500 núcleos e registrados quantos desses apresentavam a marcação com NeuN+ (Figura 8).

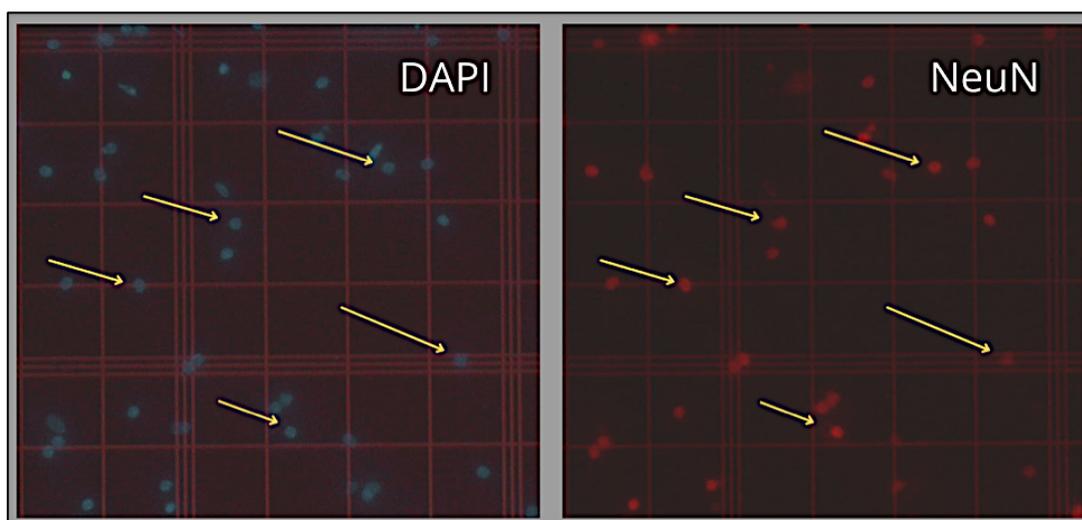


Figura 8 Imunocitoquímica – Imagem representativa da presença de núcleos DAPI (azul), NeuN (vermelho) e as setas em amarelo são alguns exemplos de núcleos com imunomarcção para NeuN.

Em suma, o valor final do número de células no encéfalo foi obtido por meio da multiplicação da densidade de núcleos pelo volume total da suspensão. Para neurônios, o valor final correspondeu ao total de células multiplicado pela porcentagem de núcleos NeuN+. Para células não-neuronais, o resultado se deu pela subtração entre o número de células totais e o número de neurônios. Os valores finais para cada hemisfério encefálico foram multiplicados por 2, a fim de totalizar o número absoluto de células no encéfalo (AZEVEDO et al., 2009). Em estudos prévios, não foram encontradas diferenças significativas entre os valores de números absolutos de células entre os hemisférios direito e esquerdo (AZEVEDO et al., 2009).

A confiabilidade da técnica e da variabilidade de contagens foi avaliada em diferentes animais de uma mesma espécie, regiões e para diferentes contadores, obtendo recomendações que têm sido aplicadas para a execução deste trabalho diminuindo a inserção de vieses (NEVES et al., 2019).

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A variação da massa do encéfalo e suas divisões (telencéfalo e cerebelo), número de células totais, número de neurônios e células não-neuronais foram analisadas em função da idade. Foram realizados testes de correlação entre as variáveis e o índice de correlação de Pearson (r) e seu nível de significância (valor p) foram determinados. Valores p inferiores a 0,05 foram considerados com significância estatística. Correlações com índices de correlação (r) de até 0,5 foram consideradas fracas; r com valores de 0,5 até 0,7, moderadas, e r com valores maiores ou iguais a 0,7, altas. Regressões lineares simples foram realizadas para mostrar o comportamento dos dados nos gráficos.

Para a comparação dos casos do período a termo com os números encontrados em adultos, foi realizada a média do número total de células, neurônios e células não-neuronais dos 3 casos deste período e obtida a porcentagem em relação ao adulto. A comparação do caso controle a termo com o caso patológico com sífilis congênita foi realizada com o cálculo da porcentagem em relação ao controle. O software utilizado na montagem de todos os gráficos foi GraphPad Prism, versão 9.

5. RESULTADOS

Obtivemos como resultado da colaboração entre o Laboratório de Neuroplasticidade da UFRJ, o Biobanco da Faculdade de Medicina da USP e a Maternidade Escola da UFRJ um total de 10 casos coletados para este estudo (Tabela 1), dentre os quais 7 foram do sexo masculino e 3 do feminino. O motivo do óbito foi coletado nas Fichas de Relato de Caso. Devido à heterogeneidade da amostra em relação à causa do óbito, todos os casos foram analisados sem distinção da mesma.

Durante as análises, a distribuição dos casos foi demonstrada seguindo a ordem cronológica das idades. Os resultados das análises foram organizados por períodos agrupados: Período pré-termo, 2 casos (33 e 34 semanas); Período a termo, correspondendo ao período completo de gestação ao nascimento, 3 casos (40 e 41 semanas); Período pós-natal, ainda dentro do primeiro ano de vida: primeiro trimestre, 4 casos (2 e 3 meses) e terceiro trimestre, 1 caso (7 meses).

Tabela 1. Casos coletados ordenados por idade.

Identificação	Sexo	Causa do óbito	Idade no óbito
A	Masc	Enterocolite necrosante	33 sem
B	Masc	Insuficiência renal	34 sem
C	Masc	Sepse neonatal / Hipóxia perinatal	40 sem
D	Masc	Sífilis congênita / Sepses neonatal	41 sem
E	Masc	Choque refratário / Hérnia diafragmática	41 sem
F	Masc	Sepses / Amiotrofia espinhal	2 meses
G	Fem	Insuficiência cardíaca congestiva	2 meses
H	Masc	Choque séptico	2 meses
I	Fem	Síndrome de Patau / Edema agudo de pulmão	3 meses
J	Fem	Broncopneumonia	7 meses

Masc: Masculino, Fem: Feminino, sem: semanas gestacionais.

5.1. COMPOSIÇÃO CELULAR ABSOLUTA DO ENCÉFALO HUMANO E SUAS REGIÕES (TELENCÉFALO E CEREBELO) DURANTE O DESENVOLVIMENTO

5.1.1. INCREMENTO DA MASSA ENCEFÁLICA DURANTE O DESENVOLVIMENTO HUMANO

A idade e a massa das regiões analisadas apresentaram uma correlação positiva e forte, com significância estatística para todas as regiões analisadas: Encéfalo ($n=10$; $r=0,843$, $p<0,001$), Telencéfalo ($n=10$; $r=0,775$, $p<0,001$), e Cerebelo ($n=9$; $r=0,893$, $p<0,001$). Desta forma, foi evidenciado um aumento linear da massa do telencéfalo, cerebelo e encéfalo em função da idade entre as 33 semanas de gestação e os 7 meses de vida pós-natal (Figura 9).

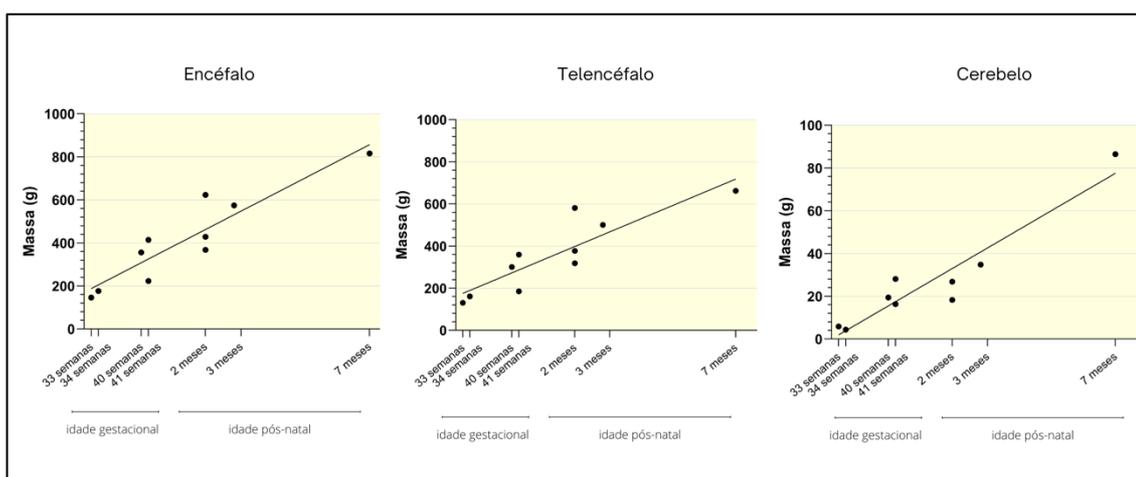


Figura 9 Massa em função da idade: encéfalo ($n=10$), telencéfalo ($n=10$), e cerebelo ($n=9$).

Observamos que a média da massa encefálica no recém-nascido a termo foi 331gr. Com os valores colhidos, vimos que o aumento da massa do telencéfalo atinge aproximadamente o dobro aos 7 meses pós-natal e que o cerebelo, aproximadamente quadruplica sua massa neste mesmo período, tendo um crescimento mais acelerado.

5.1.2. COMPOSIÇÃO CELULAR ABSOLUTA DO ENCÉFALO HUMANO DURANTE O DESENVOLVIMENTO

Para o cálculo do número total de células do encéfalo registramos um crescimento linear ao longo das idades do desenvolvimento estudadas. O número

absoluto de células mostrou uma correlação forte com o aumento da idade, com significância estatística ($n=10$; $r=0.916$, $p < 0.001$) (Figura 10, total).

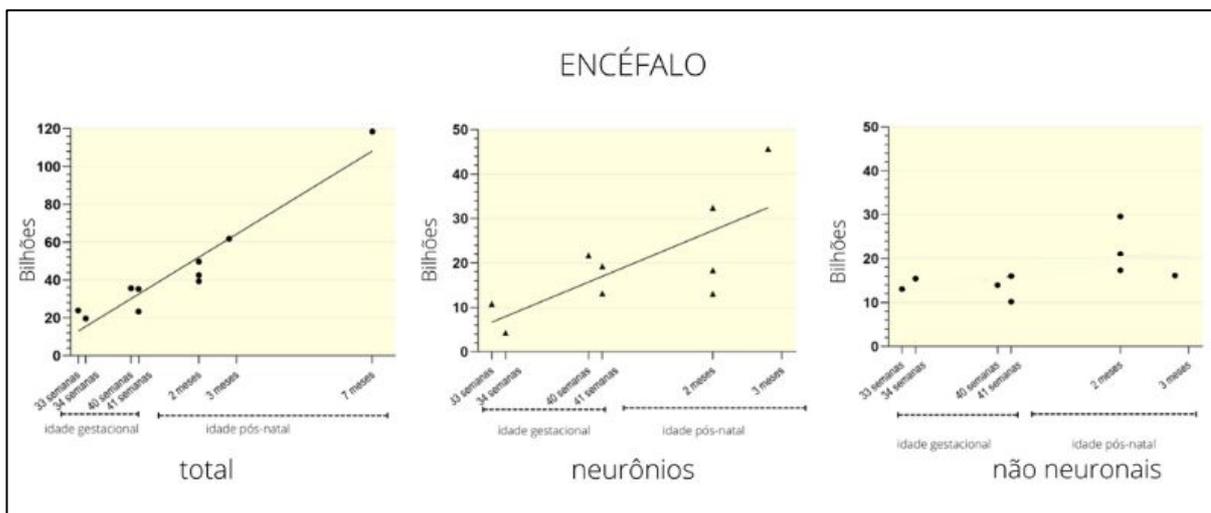


Figura 10 Número total de células, número de neurônios, número de células não-neuronais do encéfalo ($n=10$), em função da idade.

Em números absolutos, em idades a termo, temos, em média, 31,3 bilhões de células no encéfalo. Aos sete meses de vida pós-natal, este número chega a aproximadamente quatro vezes o seu valor, totalizando 118,52 bilhões de células.

Em relação ao número de neurônios, foi possível analisar nove casos, dos dez casos coletados. No caso J (Tabela 1), com a idade de 7 meses de vida pós-natal, não obtivemos sucesso na marcação com o anticorpo NeuN. Foi realizada uma tentativa de recuperação antigênica, também sem sucesso e, devido ao limite de tempo imposto para finalizar os experimentos durante o início da pandemia de COVID-19, o caso foi armazenado sem completar a análise com a marcação do anticorpo.

Quando avaliamos o comportamento do número de neurônios em função da idade, encontramos uma correlação positiva e forte com significância estatística ($n=9$, $r=0,541$, $p=0,023$) (Figura 10, neurônios). No terceiro trimestre da gestação há um aumento progressivo maior até o termo, quando comparado com as idades pós-natais. No período fetal das 33-34 semanas de gestação, temos em média, 7,53 bilhões de neurônios, e no período a termo, 18,05 bilhões, uma taxa de crescimento de 157% até o termo. Posteriormente, durante os primeiros 3 meses de vida o número de neurônios aumenta 50%, evidenciando uma taxa de crescimento menor que a fetal.

Quanto ao número de células não-neuronais, não foi encontrada uma correlação com a idade com significância estatística ($n=9$; $r=0,288$, $p=0,136$) (Figura 10, não neuronais). Do período pré-termo ao período a termo, estes números não apresentam uma variação expressiva (-6%): 14,26 bilhões e 13,38 bilhões, respectivamente. Já no primeiro trimestre pós-natal, o número de células não neuronais aumenta 61%, chegando a registrar 21,02 bilhões.

Com os valores registrados em nossas análises, calculamos as taxas de crescimento, conforme as médias dos números de células totais, neurônios e células não-neuronais ao longo do desenvolvimento, para melhorar a visualização das mudanças em números absolutos (Figura 11). Em relação ao número total de células, a maior taxa percentual de crescimento, se encontra em períodos do desenvolvimento pós-natal, aumentando 145% entre os 2-3 meses de vida e os 7 meses pós-natal. O número de neurônios mostra o maior crescimento no terceiro trimestre da gestação, aumentando 157%. Por outro lado, o número de células não neuronais apresenta um maior aumento no período pós-natal, até os 2-3 meses de idade pós-natal.

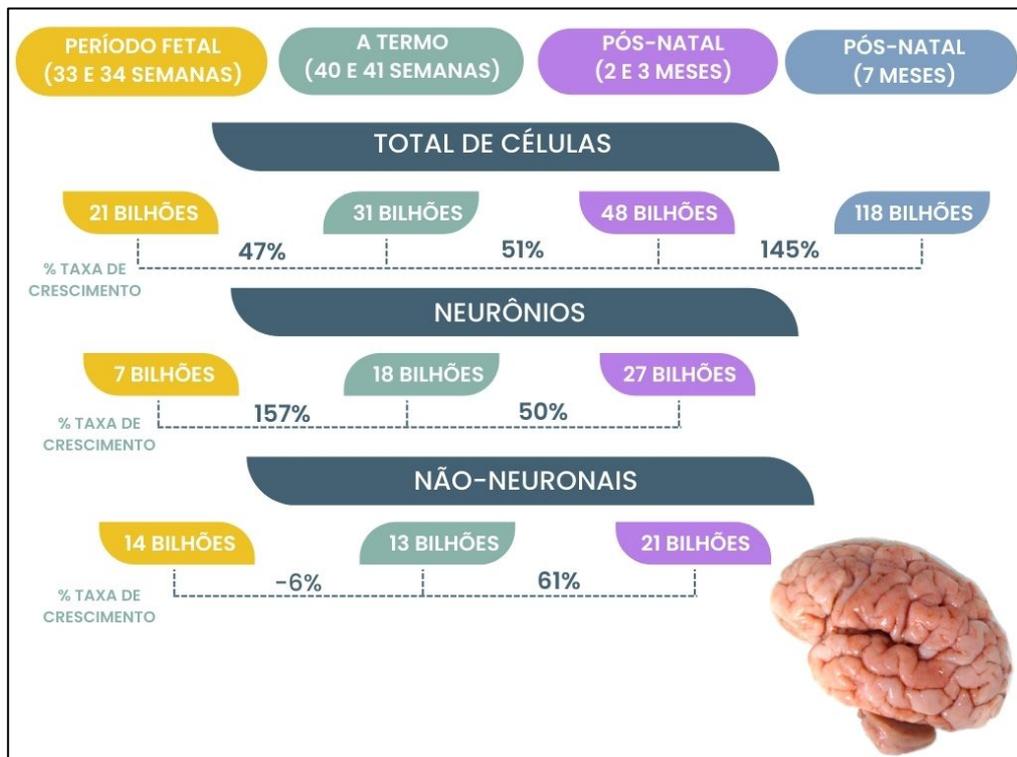


Figura 11 Taxa de crescimento, em porcentagem, da média do número total de células ($n=10$), número de neurônios ($n=9$), número de células não-neuronais ($n=9$) no encéfalo, com o aumento da idade.

5.1.2.1 COMPOSIÇÃO CELULAR ABSOLUTA DO TELENCEFALO HUMANO DURANTE O DESENVOLVIMENTO

Realizamos a contagem dos 10 casos e verificamos o crescimento linear com significância estatística do total de células do telencéfalo ao longo do desenvolvimento, ($r= 0,550$ e $p= 0,022$) (Figura 12). A média do número total de células no período fetal (33-34 semanas) e no período a termo (40-41 semanas) se equivalem (18.95 bilhões e 18.91 bilhões), esse valor aumenta 50% nos primeiros três meses de vida pós-natal.

Ao dividir o telencéfalo nos principais lobos cerebrais, nove casos foram analisados. Um dos casos do período pós-natal, caso H (*Tabela 1*), não foi possível realizar a separação em lobos para o fracionamento do telencéfalo por causa da textura friável. Os quatro lobos (Frontal, Parietal, Temporal e Occipital) apresentaram um crescimento linear do número de células totais com o incremento da idade. Calculamos as médias dos números totais de células no telencéfalo, dividido em lobos, ao longo do desenvolvimento evidenciando o aumento menor no último trimestre da gestação e mais significativo na vida pós-natal (*Tabela 2*).

Quanto ao número de neurônios e células não-neuronais do telencéfalo, analisamos 9 casos com marcação imunocitoquímica. Não foi observada correlação estatística do número de neurônios em função da idade, a exceção do lobo parietal que mostrou um crescimento linear nas idades analisadas ($r= 0,682$ e $p= 0,011$). A maior dispersão dos dados encontrada nestas idades pode explicar a ausência de significância estatística

No período a termo, temos 11,01 bilhões de neurônios em média no telencéfalo. No primeiro trimestre pós-natal este número sofre um pequeno ganho e alcança a média de 13,47 bilhões, valor que se aproxima ao descrito no cérebro adulto, ~16 bilhões de neurônios.

A correlação do número de células não-neuronais com a idade não apresentou significância estatística ($r= 0,023$ e $p= 0,719$), apesar de duplicar seu valor neste

período. No período a termo encontramos em média 7,89 bilhões, e pós-natalmente, 16,29 bilhões.

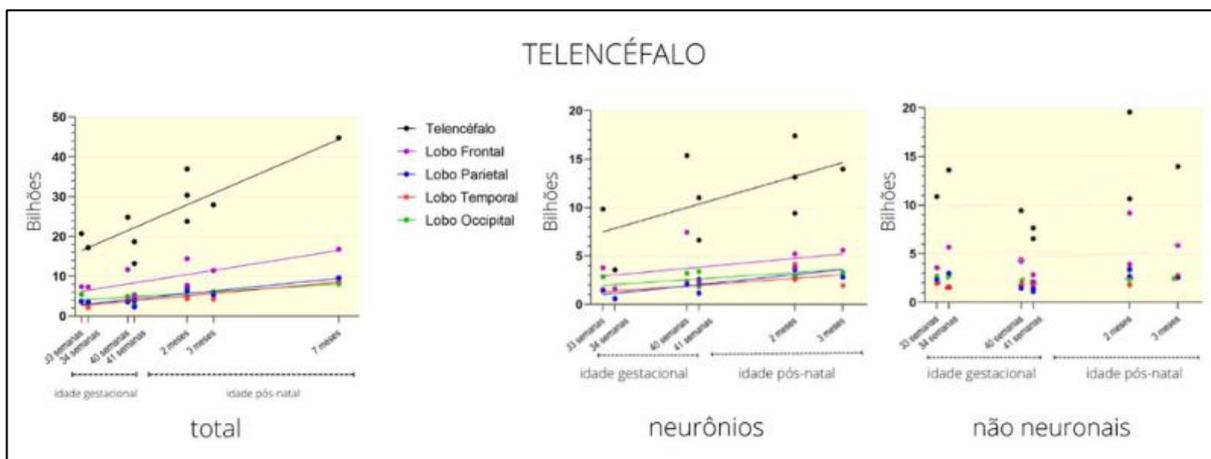


Figura 12 Número total de células ($n=10$) ($p= 0,022$ e $r= 0,550$); número de neurônios ($n=9$) ($p= 0,135$, $r= 0,331$), número de células não-neuronais ($n=9$) ($p= 0,719$ e $r=0,023$) no telencéfalo, em função da idade.

Ao calcularmos as médias dos números totais de células no telencéfalo dividido em lobos, ao longo do desenvolvimento, encontramos que o lobo frontal apresenta o maior número de células em relação aos outros lobos em todos os períodos.

Tabela 2 Médias dos valores absolutos do número total de células do telencéfalo, nos períodos do desenvolvimento, de acordo com os diferentes lobos ($n=9$).

	Período gestacional	A termo	Pós-natal primeiro trimestre	Pós-natal terceiro trimestre
Lobo Frontal	7,33 bilhões	7,08 bilhões	11,19 bilhões	16,78 bilhões
Lobo Parietal	3,67 bilhões	3,26 bilhões	6,25 bilhões	9,61 bilhões
Lobo Temporal	2,83 bilhões	3,51 bilhões	5,36 bilhões	8,76 bilhões
Lobo Occipital	4,43 bilhões	4,44 bilhões	6,01 bilhões	8,11 bilhões

Em relação a média da densidade celular do telencéfalo, observamos no período fetal uma média de 132.27 milhões de células/grama, esse valor reduziu quase a metade (48%) no período do nascimento a termo e estabilizou no período pós-natal (Tabela 3).

Tabela 3 Médias da densidade do número total de células do telencéfalo, nos diferentes períodos do desenvolvimento (n=10) e de acordo com os diferentes lobos (n=9).

	Média da densidade celular no telencéfalo			
	Período fetal	A termo	Pós-natal primeiro trimestre	Pós-natal terceiro trimestre
	132.27 milhões/g	68.60 milhões/g	68.68 milhões/g	67.64 milhões/g
 Lobo Frontal	121.83 milhões/g	66.96 milhões/g	58.92 milhões/g	59.07 milhões/g
 Lobo Parietal	111.96 milhões/g	72.15 milhões/g	59.88 milhões/g	69.03 milhões/g
 Lobo Temporal	152.42 milhões/g	69.67 milhões/g	61.04 milhões/g	69.46 milhões/g
 Lobo Occipital	168.18 milhões/g	74.92 milhões/g	101.49 milhões/g	86.48 milhões/g

O comportamento semelhante de queda da densidade celular no último trimestre da gestação e estabilização nos primeiros meses de vida pós-natal foi identificado para cada lobo (Tabela 3).

5.1.3. COMPOSIÇÃO CELULAR ABSOLUTA DO CEREBELO HUMANO DURANTE O DESENVOLVIMENTO

Foram analisados 9 casos. Um caso com idade pós-natal de 2 meses não teve o cerebelo captado para a pesquisa. Com os valores encontrados no cerebelo, vimos um aumento significativo do número total de células que segue até o período após o nascimento ($r= 0,922$, $p<0,001$) (Figura 13, total).

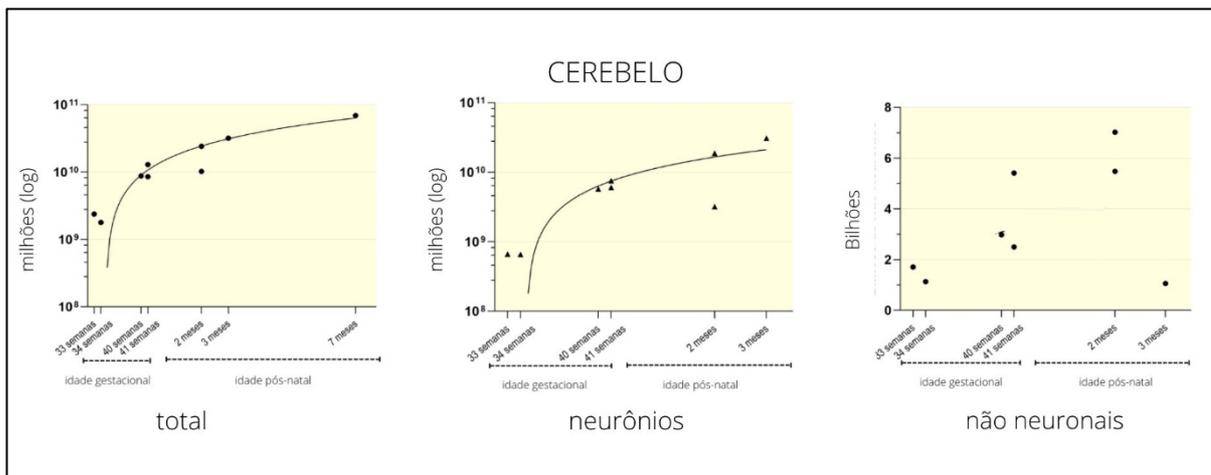


Figura 13 Número total de células ($n=9$) ($p<0,001$ e $r= 0,922$), número de neurônios, número de células não-neuronais ($n=8$) ($p= 0,312$, $r= 0,169$) no cerebelo, função da idade.

Quanto ao número de neurônios e células não-neuronais, foram analisados 8 casos - como descrito anteriormente, no caso J não foi realizada a marcação com anticorpo NeuN. Observou-se o crescimento do número de neurônios em relação ao período do desenvolvimento ($n=8$; $r= 0,626$, $p= 0,019$), sendo o maior aumento destes valores no terceiro trimestre da gestação, variando de 660,42 milhões de neurônios até 6,45 bilhões. É importante destacar que o crescimento continuou em idades pós-natais, atingindo 17,55 bilhões ainda no primeiro trimestre (Figura 13, neurônios).

Quanto às células não neuronais, não foi encontrada uma correlação com a idade com significância estatística ($n=8$; $r= 0,169$, $p= 0,312$) (Figura 13, não neuronais).

Quanto à densidade celular total do cerebelo, vimos que, no período fetal e ao nascimento, as médias dos valores encontrados sofrem pouca variação - 406.97 milhões/g no período pré-termo, e 478.62 milhões/g ao nascimento. Esses valores aumentam em 65% nos primeiros meses após o nascimento e estabilizam.

5.2. COMPOSIÇÃO CELULAR ABSOLUTA DO ENCÉFALO E SUAS REGIÕES (TELENCÉFALO E CEREBELO) DE NEONATOS HUMANOS NO PERÍODO A TERMO EM COMPARAÇÃO COM O ADULTO.

Para esta análise, utilizamos os números encontrados em estudo prévio sobre o encéfalo humano adulto (AZEVEDO et al., 2009). De acordo com este trabalho, o

encéfalo humano adulto possui 170.68 ± 13.86 bilhões de células, com aproximadamente 86.06 ± 8.12 bilhões de neurônios e 84.61 ± 9.83 bilhões de células não-neuronais.

No presente estudo, calculamos a média dos 3 casos do período a termo, correspondente ao período completo da gestação, e comparamos com o adulto. De acordo com os nossos resultados, encontramos que um encéfalo de um recém-nascido a termo (40 a 41 semanas de idade gestacional) tem em média 31,43 bilhões de células, sendo aproximadamente 18,05 bilhões neurônios e 13,38 bilhões células não-neuronais. Desta forma, o encéfalo a termo possui 18% do número total de células, 20% de neurônios e 15% de células não-neuronais, do esperado para um encéfalo adulto.

O telencéfalo do recém-nascido a termo tem em média 18,91 bilhões de células: 11,01 bilhões neurônios e 7,89 bilhões células não-neuronais. Comparativamente, o telencéfalo a termo possui 24% do número de células, 68% de neurônios e 12% de células não-neuronais em relação ao número esperado no adulto.

O cerebelo de um neonato a termo apresenta os menores valores em porcentagens na comparação com o adulto. O cerebelo de um neonato a termo possui em média 10,09 bilhões de células, sendo 6,45 bilhões neurônios e 3,64 bilhões células não-neuronais. Em relação ao adulto, o recém-nascido tem 11% do número esperado de células totais, 9% do número de neurônios e 22 % do número de células não-neuronais.

Os dados sugerem que a região com o número de neurônios mais próximo ao encontrado ao adulto é o telencéfalo, com 60%. No cerebelo o número de neurônios não chega a 10 % do valor do adulto, indicando que há uma grande neurogênese cerebelar pós-natal. Por outro lado, tanto no telencéfalo quanto no cerebelo espera-se uma grande proliferação de células não-neuronais após o nascimento.

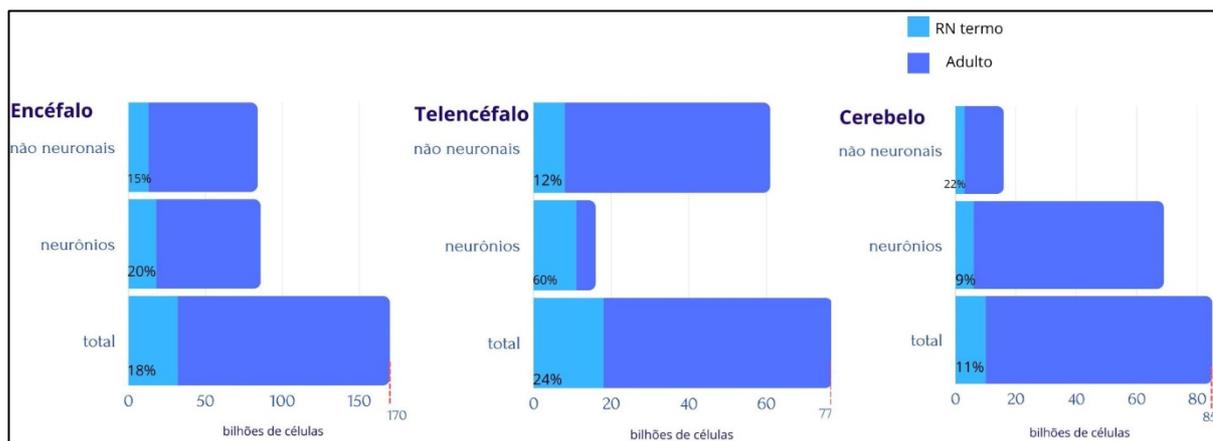


Figura 14 Média do número total de células, neurônios e células não-neuronais, no período a termo ($n=3$) em comparação com o adulto, no encéfalo, telencéfalo e cerebelo.

5.3. COMPOSIÇÃO CELULAR ABSOLUTA DE UM ENCÉFALO HUMANO TÍPICO E SUAS REGIÕES (TELENCÉFALO E CEREBELO) EM COMPARAÇÃO A UM CASO DE SÍFILIS CONGÊNITA DA MESMA IDADE.

Como resultado das coletas, obtivemos no período a termo dois casos com 41 semanas gestacionais, um dos casos com diagnóstico de sífilis congênita. Foi possível comparar as diferenças entre os dois casos com base nas informações contidas no prontuário e na análise do tecido encefálico.

O encéfalo do caso com sífilis congênita era de um recém-nascido a termo do sexo masculino. A mãe realizou 9 consultas de acompanhamento pré-natal. Apresentou exame anti-HIV negativo e exame VDRL positivo (1:64) na 18ª semana de gestação, foi iniciado tratamento medicamentoso com penicilina benzatínica. Em uma consulta posterior, após 54 dias, houve modificação do título de VDRL (1:16). Nas duas consultas subsequentes, o exame permaneceu inalterado (1:18) / (1:18), sendo necessário iniciar novo tratamento. Ao internar para o parto, em exame admissional, o título do VDRL foi (1:4). Não há relato no prontuário de tratamento do parceiro. O recém-nascido nasceu por parto cesariana, com 41 semanas de gestação, tendo como indicação pré-eclâmpsia, pesando 2.345 g, pequeno para idade gestacional, 32 cm de perímetro cefálico. Recebeu Apgar 1 e 3, no primeiro e quinto minuto, respectivamente. Foi intubado na sala de parto para suporte respiratório e encaminhado para a UTI neonatal. Resultado do exame VDRL positivo (1:2). Foi iniciado tratamento com ampicilina, gentamicina e penicilina cristalina. Não respondeu aos cuidados imediatos, teve o motivo do óbito descrito como sepse neonatal.

O recém-nascido do caso controle, era do sexo feminino, a mãe realizou 5 consultas de acompanhamento pré-natal, sem apresentar comorbidades durante o período, mantendo exames laboratoriais anti-HIV e VDRL negativos. Nasceu por parto cesariana, com 41 semanas e 4 dias de gestação, tendo como indicação pós-datismo gestacional, pesando 3.030 g, adequado para a idade gestacional, 33 cm de perímetro cefálico. Nasceu hipotônico, e apresentou dificuldades respiratórias. Recebeu Apgar 3 e 5, no primeiro e quinto minuto, respectivamente. Foi intubado na sala de parto para suporte respiratório. Realizado Raios-x de tórax, verificou-se a presença de hérnia diafragmática com pneumotórax. Após 2 dias de internação em UTI neonatal, apresentou parada cardiorrespiratória o que levou ao óbito.

Ao compararmos os números absolutos de células do encéfalo com sífilis congênita em relação ao caso da mesma idade, seu controle, verificamos uma diminuição de todos os números de células no caso com infecção congênita (Figura 15). O perímetro cefálico do caso de sífilis congênita foi considerado pequeno para a idade gestacional (Percentil 3, P3). O peso do cérebro foi 37% menor (271,92 g) do que o caso de controle (428,86 g). Também foi encontrada uma diminuição no número absoluto de células do encéfalo, enquanto o caso controle tinha 35,29 bilhões células, o caso de sífilis congênita tinha 23,33 bilhões, uma redução de 34%. Houve, ainda, uma redução de 32% dos neurônios e 37% das células não neuronais no encéfalo.

Regionalmente, o telencéfalo do caso infectado apresentou uma perda de 29% no número de células. O caso infectado teve 40% menos neurônios (6,64 vs 11,02 bilhões no controle). O número de células não neuronais apresentou redução de 15%.

No cerebelo, a quantidade total de células no controle foi de 12,95 bilhões, e apenas 8,55 bilhões no caso de sífilis congênita, uma redução de 34%. O número de neurônios diminuiu 20% (6,04 bilhões no caso de sífilis congênita vs. 7,54 bilhões no caso de controle), e o número de não-neurônios diminuiu 54% (Figura 15).

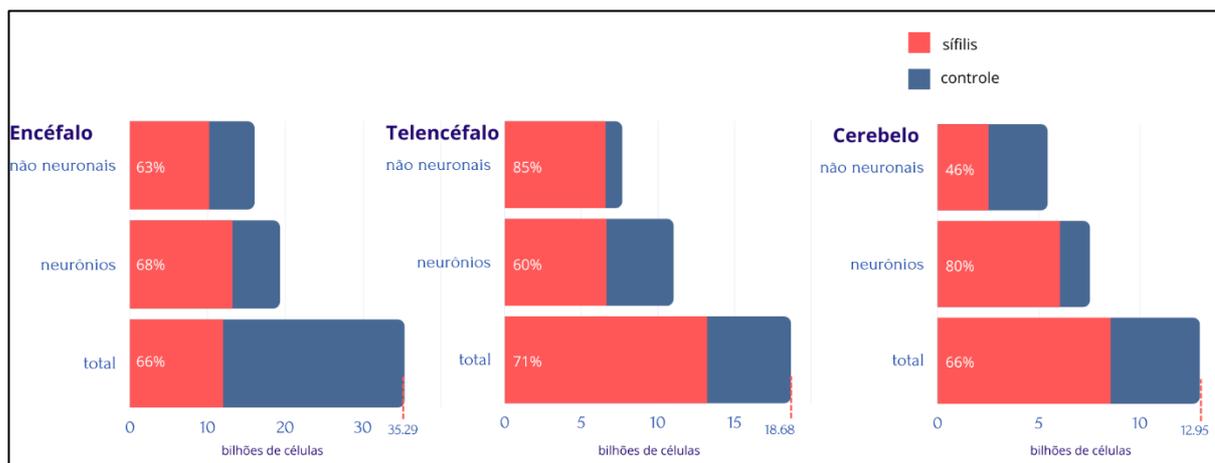


Figura 15 Comparação do número de células totais, neurônios e células não-neuronais de um encéfalo de um recém-nascido a termo com sífilis congênita e seu controle da mesma idade gestacional.

Tabela 4. Comparação em números absolutos e em porcentagem do caso com sífilis congênita e seu controle, na mesma etapa do desenvolvimento.

REGIÃO	TIPO DE CÉLULA	CASO CONTROLE (Bi)	CASO COM SÍFILIS CONGÊNITA (Bi)	DIFERENÇA (Bi)	PERCENTAGEM EM RELAÇÃO AO CONTROLE
ENCÉFALO	Totais	35,29	23,33	11,96	66%
	Neurônios	19,28	13,16	6,12	68%
	Não-neuronais	16,01	10,17	5,84	63%
TELENCÉFALO	Totais	18,68	13,21	5,47	71%
	Neurônios	11,02	6,64	4,38	60%
	Não-neuronais	7,66	6,57	1,09	85%
CEREBELO	Totais	12,95	8,55	4,40	66%
	Neurônios	7,54	6,04	1,48	80%
	Não-neuronais	5,41	2,51	2,92	46%

Bi: Bilhões.

Em colaboração com o Instituto Fernandes Figueira e o Instituto Estadual do Cérebro Paulo Niemeyer, um dos hemisférios foi utilizado para análise histopatológica, assim foi possível constatar, no caso de sífilis congênita, a presença do *Treponema pallidum*. Também foram identificados linfócitos nas meninges e ao redor de pequenos vasos. Foi demonstrada astrocitose, proliferação de macrófagos e microglia em: leptomeninges, substância branca periventricular, hipocampo e no plexo coroide. Foram identificados focos de necrose e calcificação na substância branca profunda próxima ao ventrículo lateral, polimicroglia, com laminação cortical neuronal desorganizada. A identificação da presença do treponema foi realizada com a amostra

de tecido dos gânglios da base, utilizando a reação em cadeia da polimerase quantitativa (q-PCR). (Figura 1, anexo 5). Com os dados expostos, foi possível a elaboração de um artigo em formato relato de caso (Anexo 5).

6. DISCUSSÃO

A duração da gestação pode ser contada a partir da data da última menstruação e a idade gestacional pode ser expressa pelo número de semanas completas após o início do último período menstrual (OMS, 2001). Recém-nascidos a termo têm o período gestacional compreendido entre 37 até 41 semanas. Porém, quando o número de semanas gestacionais é inferior a 37, este é considerado prematuro (OMS, 2001). Em nossa casuística, identificamos dois casos no período pré-termo, três casos no período a termo e cinco casos no período pós-natal, até os sete meses.

O tempo de desenvolvimento do SN em humanos é longo e se estende até a adolescência, o que permite que se molde, funcional e estruturalmente, de acordo com estímulos ambientais, interações sociais, influências emocionais e cognitivas (BAE; JAYARAMAN; WALSH, 2015).

O principal objetivo deste trabalho foi mapear, em diferentes períodos do desenvolvimento, o número absoluto de células no encéfalo humano. Foi possível analisar dez casos em diferentes etapas: pré-termo, a termo e pós-natal. Os dados expostos nesta amostra, apesar do número limitado, se encaixam para ilustrar, em números absolutos, a diversidade da modificação da estrutura celular do encéfalo nas etapas iniciais do desenvolvimento do SN.

6.1. Incremento da massa encefálica durante o desenvolvimento humano

Conforme o descrito na literatura, o recém-nascido a termo possui entre 300gr e 330gr de massa encefálica (MOURA-RIBEIRO, M., & GONÇALVES, V., 2009) e, com um ano, essa massa chega a 900gr (MOURA-RIBEIRO, M., & GONÇALVES, V., 2009).

Em nossa amostra, registramos a média de 331gr de massa do encéfalo dos casos do período a termo. Já no primeiro trimestre, observamos quase o dobro da massa em relação ao nascimento e registramos, no caso de 7 meses pós-natal, 807gr no encéfalo.

Após o primeiro ano, o crescimento segue em ritmo mais lento, chegando até os 1.500gr na fase adulta (AZEVEDO et al., 2009). Registramos, assim, que o primeiro ano após o nascimento é um período crítico de incremento de massa do encéfalo.

Ao observar as regiões do encéfalo dos casos analisados, o telencéfalo dobra sua massa ainda dentro do primeiro ano de vida, enquanto o cerebelo aumenta em quatro vezes seu número.

6.2. Composição celular do encéfalo humano em desenvolvimento

Mesmo obtendo uma amostra heterogênea em relação ao motivo do óbito, conseguimos verificar, em números absolutos, um crescimento linear do número total de células do encéfalo em função da idade nas etapas iniciais do desenvolvimento humano, até os 7 meses de vida pós-natal. Segundo a literatura, já foi caracterizado o crescimento no número total de células com estudos que utilizam técnicas estereológicas, estes demonstraram um crescimento bifásico: exponencial da semana 13 até a 20 de gestação e linear da semana 20 até o período a termo (LARSEN, 2017). O primeiro ano de vida representa um crescimento rápido do encéfalo, que chega ao seu ápice por volta dos 6 anos (BETHLEHEM et al., 2022).

Neste estudo, não foi possível avaliar a quantificação celular nos primeiros dois trimestres da gestação, por falta de captação de casos nestas idades. De acordo com dados prévios, os primeiros neurônios detectados no córtex estão presentes na incipiente ínsula aos 51 dias pós-concepção (BYSTRON et al., 2006). Nossos dados mostram que durante o terceiro trimestre da gestação há um aumento de 157% no número total de neurônios. Estes dados evidenciam que a neurogênese contribui em maior parte com o incremento celular total da semana 33 até a semana 41 de gestação. No período pós-natal o aumento foi de 50% de neurônios.

Em relação ao número de células não-neuronais, obtivemos médias bem próximas no encéfalo em períodos fetais do início do terceiro trimestre da gestação até o termo, ~13 bilhões. Podemos concluir que não há uma mudança expressiva do número de células da glia neste período. Este número começa a aumentar significativamente, 61%, nos primeiros 3 meses de vida pós-natal, evidenciando que a gliogênese acontece preferencialmente no período pós-natal.

Quanto a morfologia dos neurônios, sabe-se que o tamanho dos neurônios piramidais e o comprimento dos dendritos aumentam durante o primeiro ano pós-natal e continuam, a uma taxa reduzida, até por volta do quinto ano pós-natal. (PETANJEK, et al., 2007). No período do desenvolvimento pós-natal também iniciam eventos de

maturação do SN, como mielinização de axônios, modulação das conexões sinápticas (YAMAZAKI et al., 2010) e interações neurovasculares (NEDERGAARD; RANSOM; GOLDMAN, 2003), funções atribuídas às células não-neuronais. Os oligodendrócitos, por exemplo, são gerados e migram de forma intensa durante os três primeiros anos de vida pós-natal (JAKOVCEVSKI et al., 2009).

Quanto ao número de neurônios por região, o telencéfalo possui em média 13.47 bilhões de neurônios aos 3 meses de vida, número aproximado ao registrado no adulto, 16 bilhões (AZEVEDO et al., 2009). O telencéfalo é a primeira estrutura durante o desenvolvimento a se estabelecer (SILBEREIS et al., 2016).

Conforme descrito em estudos prévios, nos primeiros 3 anos de vida, há um aumento linear significativo nos números de oligodendrócitos e astrócitos, mas nenhuma mudança no número total de neurônios (KJAER et al., 2017).

O cerebelo mostrou uma taxa de crescimento maior do número total de neurônios no períodos pós-natais. Estudos com técnicas de ressonância magnética, registraram um aumento do volume cerebelar ao final da gestação e lesões cerebelares associadas ao parto prematuro, mantendo sequelas neurológicas, atribuídas ao desenvolvimento cerebelar prejudicado (LIMPEROPOULOS et al., 2005).

6.3. Neurogênese pós-natal

Em nosso estudo, para realizar a contagem do número de neurônios no encéfalo durante o desenvolvimento utilizamos o marcador NeuN, que já foi demonstrado excelente marcador de núcleos neuronais (LYCK et al., 2008). No momento do nascimento a termo, verificamos que um encéfalo humano possui só 20% do número de neurônios de um encéfalo adulto. Esse resultado aponta um grande potencial neurogênico no período pós-natal. Diferenciando a composição neuronal por região, observamos que o telencéfalo já conta com 60% dos neurônios de um adulto, enquanto o cerebelo só 9%.

Em concordância com nossos achados, o córtex apresenta sua maior neurogênese durante o período gestacional, sendo gerada mais da metade dos neurônios até o período gestacional completo. Porém, encontramos estudos na

literatura que utilizam técnicas estereológicas, indicando que no recém-nascido a termo o número de neurônios para o neocortex é o mesmo número do adulto (LARSEN et al., 2006).

Os dados do cerebelo refletem que exista uma grande neurogênese, em que 90% dos neurônios do cerebelo serão formados após o nascimento. Zonas proliferativas do cerebelo, em humanos, permanecem ativas até os 9 meses após o nascimento (HALDIPUR et al., 2019). É bem estabelecido que a maturação do cerebelo se dá em etapas mais tardias do desenvolvimento (SILBEREIS et al., 2016). Estudos evidenciando o impacto das influências ambientais e possíveis insultos que podem refletir em defeitos na neurogênese desta região são muito relevantes.

A gênese de novos neurônios ocorre em diferentes espécies de animais após o nascimento (SPRITZER, ROY, 2020), demonstrada em aves (ALVAREZ-BUYLLA, KIRN, 1997) e diferentes tipos de mamíferos (LOIS, ALVAREZ-BUYLLA, 1994; AMREIN, 2015). Nos humanos, baseados em estudos post-mortem, a neurogênese em adultos está descrita, porém delimitada a certos nichos, como o hipocampo (ERNST, et al., 2014) e bulbo olfatório (BERGMANN, et al., 2012). A demonstração neurogênese pode ser possível através da visualização de marcadores de células neuroepiteliais, células da Glia Radial, progenitores intermediários e neurônios imaturos, tais como SOX-2, GFAP, TBR-2 e DCX, respectivamente. Estudos futuros mostrando o aumento do número absoluto de neurônios junto com a demonstração destes marcadores por imunohistoquímica poderão evidenciar com maior robustez a presença de neurogênese pós-natal, e em quais períodos será mais significativa, infância ou adolescência.

6.4. Impacto da sífilis congênita na celularidade do encéfalo humano em desenvolvimento

A incidência de sífilis congênita na população está associada com a dificuldade de acesso das gestantes às consultas pré-natais. Durante estas consultas, são realizadas ações preventivas que incluem a triagem sorológica direcionada, diagnóstico precoce e o tratamento oportuno da sífilis materna. A eficiência do cuidado prestado às gestantes exige o cumprimento de todos esses parâmetros para evitar a transmissão vertical (DOMINGUES et al., 2021). O sistema de saúde brasileiro, que segue as recomendações do pacto de eliminação global da sífilis congênita, proposto

pela Organização Mundial de Saúde, necessita adequar suas boas práticas em medidas preventivas para erradicar, ou pelo menos minimizar, a incidência da doença no país (HOSSAIN; BROUTET; HAWKES, 2007).

A sífilis congênita causa restrição do crescimento, tanto intrauterino quanto pós-natal. A associação de sífilis congênita com baixo peso reflete o efeito deletério da infecção (LAGO; VACCARI; FIORI, 2013), o que foi corroborado em nossas análises com menores valores do encéfalo infectado em relação ao controle.

Em nosso estudo verificamos, em números absolutos, que o desenvolvimento do encéfalo foi afetado em relação ao controle, com diminuição da massa encefálica, número total de células, neurônios e células não-neuronais no momento do nascimento a termo.

Como principal limitação temos o número amostral de apenas um caso com sífilis congênita. A infecção por sífilis congênita apresenta alto índice de anormalidades neurológicas, demonstradas no modelo animal com presença de treponemas no líquido cefalorraquidiano, assim como em seções do encéfalo, ainda descreve que a infecção pode cursar com hemorragia cerebral na região occipital (M. KENT FROBERG et al., 1993). Em humanos, em exames de imagem, é possível verificar calcificação cortical durante o período da gestação (TONNI, G. et al., 2022). Mais estudos durante o desenvolvimento podem auxiliar na delimitação da extensão do efeito da infecção na neurogênese e na gênese das células não-neuronais e possíveis efeitos na vida pós-natal.

6.5. Importância dos estudos quantitativos da celularidade encefálica durante o desenvolvimento humano

A fim de delimitar mudanças que ocorrem no desenvolvimento do encéfalo, um estudo com ressonância magnética mapeou encéfalos de diversas idades, desde casos em idade fetal até adultos em períodos mais tardios do envelhecimento. No total, 101.457 indivíduos foram pesquisados, tornando possível a geração de gráficos comparativos relacionados à idade e à observação das similaridades nas estruturas

encefálicas com identificação de marcos do crescimento encefálico (BETHLEHEM et al., 2022).

Nosso estudo mapeou o número de células do encéfalo em apenas 10 casos de idades em desenvolvimento, o que pode ser um ponto de partida para que futuras análises consigam correlacionar os achados da celularidade, como o número de neurônios ao nascimento, com os gráficos propostos no estudo de imagem e, assim, elucidar mecanismos comuns e entender sobre alterações que possam ocorrer ao longo deste período.

Apesar de estudos com animais se tornarem importantes para a pesquisa, estes podem não fornecer informações de aspectos que são exclusivamente humanos (LUHMANN; FUKUDA, 2020). Em determinados pontos, o cérebro do camundongo, pode se assemelhar grosseiramente ao de recém-nascidos humanos, como o início da formação do neocortex, por volta do 16º dia de gestação em humanos, e no 7º dia embrionário (E7) em camundongos (CHINI; HANGANU-OPATZ, 2021). No entanto, novos estudos destacaram diferenças entre os circuitos cerebrais destas espécies (HORVÁT et al., 2016). Não só os camundongos nascem prematuramente, mas também a sinaptogênese é menos prolongada do que em humanos, e a poda sináptica ocorre em um estágio anterior (CHINI; HANGANU-OPATZ, 2021). O número absoluto de células do encéfalo humano em desenvolvimento nos fornece dados que permitem combinar o conjunto de pesquisa no modelo animal com as pesquisas em humanos. Estes dados, atualmente, são necessários para entender os processos intrincados do neurodesenvolvimento.

Historicamente, técnicas como o fracionador óptico, que utiliza a estereologia, têm sido a escolha para determinar a composição celular de regiões específicas do encéfalo (WEST, 1999). No entanto, aplicar estereologia a um encéfalo inteiro é complexo e trabalhoso, requer amostragem de várias estruturas diferentes, que tenham densidade celular homogênea e limites bem estabelecidos. Dada a heterogeneidade da distribuição celular no encéfalo, esse processo pode ser exaustivo e requer muito tempo a ser investido. O Fracionamento Isotrópico já é comprovadamente tão eficaz quanto as técnicas que utilizam estereologia (BAHNEY; VON BARTHELD, 2014) e se torna uma alternativa mais econômica e que consome menos tempo para estudos de números absolutos do encéfalo (NEVES et al., 2019).

7. LIMITAÇÕES

O encéfalo humano é um material muito nobre para a pesquisa. Com isso, o nosso número amostral se limitou a apenas 10 casos, em diferentes etapas do desenvolvimento. Não foi realizada distinção entre gênero e causa do óbito em nossos cálculos de estatística. O crescimento celular encefálico durante o período de desenvolvimento é tão complexo e rápido que qualquer interrupção pode desviar sutilmente o processo típico e suas interações predeterminadas, causando, muitas vezes, déficits anatômicos e funcionais que persistem até a idade adulta (LARSEN, 2017). Com a limitação da heterogeneidade em relação a causa do óbito, obtivemos alguns casos com possível comprometimento no desenvolvimento da celularidade do encéfalo. Já é descrito por exemplo, que crianças com nascimento prematuro apresentam alterações de volume das substâncias branca e cinzenta, também atraso no desenvolvimento de giros cerebrais (HÜPPI et al., 1998). Para a comparação de controle e caso com sífilis, apenas 2 casos foram utilizados. Para a comparação de controle e caso com sífilis, apenas 2 casos foram utilizados.

Como forma de contagem neuronal, apenas o anticorpo NeuN foi utilizado nesta etapa da pesquisa. O anticorpo identifica a proteína Fox-3, responsável pelo splicing alternativo de mRNA (KIM et al., 2009), que pode ser encontrada em diferentes tipos de neurônios, em diversas espécies de vertebrados (MULLEN et al., 1992). Por outro lado, a proteína Fox-3 não está presente em um conjunto específico de células, como as de Purkinje no cerebelo, os neurônios do núcleo olivar inferior do tronco encefálico e do núcleo denteado do cerebelo, as células mitrais no bulbo olfatório, as células neurais da substância negra do mesencéfalo de certos roedores e os fotorreceptores da retina (WOLF et al., 1996.; KUMAR e BUCKMASTER, 2007.; SARNAT et al., 1998). Porém, ao realizarmos a comparação com o número total de células no encéfalo, essas células têm uma contribuição quantitativa pouco significativa em suas principais regiões (HERCULANO-HOUZEL; LENT, 2005; HERCULANO-HOUZEL et al., 2006).

A fim de tornar nossos achados mais robustos, a coleta de novos casos deve continuar. Marcadores neuronais, como o anticorpo HuC/D, que já se mostrou eficiente em pesquisas animais, em células de estágios iniciais do desenvolvimento (MOONEY; MILLER, 2007), deve ser incluído para demonstrar a eficiência da marcação de neurônios não maduros.

8. CONCLUSÃO

Com a nossa amostra, utilizando a técnica de fracionamento isotrópico, foi possível obter, em valores absolutos, as variações do número total de células do encéfalo humano, das 33 semanas de gestação até os 7 meses de vida. O número de neurônios, células não neuronais e células totais mostraram um crescimento linear durante este período.

Em comparação com o adulto, ao nascimento temos o correspondente a somente 18% do número total de células com 20% do número de neurônios. Regionalmente evidenciamos que no telencéfalo a neurogênese acontece principalmente no período fetal, enquanto no cerebelo acontece preferencialmente no período pós-natal. O crescimento de células não neuronais acontece de forma mais acentuada no período pós-natal em ambas as regiões.

Em um caso de sífilis congênita, comparado com seu controle da mesma etapa de desenvolvimento, verificamos o efeito deletério do treponema durante o período gestacional. Mesmo com tratamento materno para a infecção, houve redução de todos os números absolutos de células do encéfalo, e alterações histológicas cerebrais.

9. REFERÊNCIAS

ABITZ, M. et al. Excess of neurons in the human newborn mediodorsal thalamus compared with that of the adult. **Cerebral Cortex**, v. 17, n. 11, 2007. DOI: [10.1093/cercor/bhl163](https://doi.org/10.1093/cercor/bhl163)

ABUELO, D. Microcephaly Syndromes. **Seminars in Pediatric Neurology**, v. 14, n. 3, 2007. DOI: [10.1016/j.spen.2007.07.003](https://doi.org/10.1016/j.spen.2007.07.003)

ADAMS, J. W.; CUGOLA, F. R.; MUOTRI, A. R. Brain organoids as tools for modeling human neurodevelopmental disorders. **Physiology**, v. 34, n. 5, p. 365–375, 2019. DOI: [10.1152/physiol.00005.2019](https://doi.org/10.1152/physiol.00005.2019)

ALVAREZ-BUYLLA, A.; KIRN, J. R. Birth, migration, incorporation, and death of vocal control neurons in adult songbirds. **Journal of Neurobiology**, v. 33, n. 5, p. 585–601,

5 nov. 1997. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4695(19971105)33:5<585::AID-NEU7>3.0.CO;2-0

AMREIN, I. Adult Hippocampal Neurogenesis in Natural Populations of Mammals. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 5, p. a021295, maio 2015. DOI: 10.1101/cshperspect.a021295

ANDERSEN, S. L. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 27, n. 1–2, p. 3–18, 2003. DOI: 10.1016/s0149-7634(03)00005-8

ANDRADE-MORAES, C. H. et al. Cell number changes in Alzheimer's disease relate to dementia, not to plaques and tangles. **Brain: a journal of neurology**, v. 136, n. Pt 12, 2013. DOI: 10.1093/brain/awt273

ANDRUS, J. K. et al. Measles and rubella eradication in the Americas. **Vaccine**, v. 29, p. D91–D96, dez. 2011. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.04.059

AVELLEIRA, J. C. R.; BOTTINO, G. Sífilis: diagnóstico, tratamento e controle. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, n. 2, p. 111–126, mar. 2006. DOI: 10.1590/S0365-05962006000200002

AVINO, T. A. et al. Neuron numbers increase in the human amygdala from birth to adulthood, but not in autism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 14, 2018. DOI: 10.1073/pnas.1801912115

AZEVEDO, F. A. C. et al. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 513, n. 5, 2009. DOI: 10.1002/cne.21974

AZEVEDO, F. A. C. et al. Automatic isotropic fractionation for large-scale quantitative cell analysis of nervous tissue. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 212, n. 1, 2013. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2012.09.015

BAE, B. IL; JAYARAMAN, D.; WALSH, C. A. Genetic changes shaping the human brain. **Developmental Cell**, v. 32, n. 4, p. 423-434, 2015. DOI: 10.1016/j.devcel.2015.01.035

BAHNEY, J.; VON BARTHELD, C. S. Validation of the isotropic fractionator: Comparison with unbiased stereology and DNA extraction for quantification of glial cells. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 222, p. 165–174, 30 jan. 2014. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2013.11.002

BANDEIRA, F.; LENT, R.; HERCULANO-HOUZEL, S. Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 33, 2009. DOI: 10.1073/pnas.0804650106

BAR KOVICH, A. J. et al. Normal maturation of the neonatal and infant brain: MR imaging at 1.5 T. **Radiology**, v. 166, n. 1, p. 173–180, 1988. DOI: 10.1148/radiology.166.1.3336675

BERGMANN, O. et al. The Age of Olfactory Bulb Neurons in Humans. **Neuron**, v. 74, n. 4, p. 634–639, maio 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.030>

BETHLEHEM, R. A. I. et al. Brain charts for the human lifespan. **Nature**, v. 604, n. 7906, p. 525–533, 2022. DOI: 10.1038/s41586-022-04554-y

BLASCHKE, A. J.; STALEY, K.; CHUN, J. Widespread programmed cell death in proliferative and postmitotic regions of the fetal cerebral cortex. **Development**, v. 122, n. 4, p. 1165–1174, 1996. DOI: 10.1242/dev.122.4.1165

BLOM, H. J. et al. Neural tube defects and folate: case far from closed. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 9, p. 724–731, set. 2006. DOI: 10.1038/nrn1986

BOLDRINI, M. et al. Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. **Cell Stem Cell**, v. 22, n. 4, 2018. DOI: 10.1016/j.stem.2018.03.015

BOLTSHAUSER, E. Cerebellum—small brain but large confusion: a review of selected cerebellar malformations and disruptions. **American journal of medical genetics Part A**, v. 126, n. 4, p. 376–385, 2004. DOI: 10.1002/ajmg.a.20662

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico – Sífilis 2022**. Ano 6. Número 01. Brasília, outubro, 2022. www.aids.gov.br

BRODMANN, K. Brodmann's Localisation in the Cerebral Cortex. Translated from German by Laurence J. Garey. **World Scientific**. Imperial College Press, London, 1909.

BRODY, B. A. et al. Sequence of central nervous system myelination in human infancy. I. An autopsy study of myelination. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 46, n. 3, p. 283–301, 1987. DOI: 10.1097/00005072-198705000-00005

BYSTRON, I. et al. The first neurons of the human cerebral cortex. **Nature Neuroscience**, v. 9, n. 7, 2006. DOI: 10.1038/nn1726

CADDY, S. C. et al. Pregnancy and Neonatal Outcomes of Women With Reactive Syphilis Serology in Alberta, 2002 to 2006. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada**, v. 33, n. 5, 2011. DOI: 10.1016/S1701-2163(16)34878-2

CAMPBELL, A. W. Histological Studies on the Localisation of Cerebral Function. **Journal of Mental Science**, v. 50, n. 211, p. 651–662, out. 1904. DOI: 10.1192/bjp.50.211.651

CHALMERS, B.; MANGIATERRA, V.; PORTER, R. WHO Principles of Perinatal Care: The Essential Antenatal, Perinatal, and Postpartum Care Course. **Birth**, v. 28, n. 3, p. 202–207, set. 2001. DOI: 10.1046/j.1523-536x.2001.00202.x

CHI, J. G.; DOOLING, E. C.; GILLES, F. H. Gyral development of the human brain. **Annals of Neurology**, v. 1, n. 1, p. 86–93, 1977. DOI: 10.1002/ana.410010109

CHINI, M.; HANGANU-OPATZ, I. L. Prefrontal cortex development in health and disease: lessons from rodents and humans. **Trends in Neurosciences**, v. 44, n. 3, p. 227–240, 2021. DOI: 10.1016/j.tins.2020.10.017

COWAN, W. M. et al. Regressive events in neurogenesis. **Science**, v. 225, n. 4668, p. 1258–1265, 1984. DOI: 10.1126/science.6474175

DE GRAAF-PETERS, V. B.; HADDERS-ALGRA, M. Ontogeny of the human central nervous system: what is happening when? **Early human development**, v. 82, n. 4, p. 257–266, 2006. DOI: 10.1016/j.earlhumdev.2005.10.013

DE LA ROSA, E. J.; DE PABLO, F. Cell death in early neural development: beyond the neurotrophic theory. **Trends in neurosciences**, v. 23, n. 10, p. 454–458, 2000. DOI: 10.1016/s0166-2236(00)01628-3

DEKABAN, A. S.; SADOWSKY, D. Changes in brain weights during the span of human life: relation of brain weights to body heights and body weights. **Annals of Neurology**, v. 4, n. 4, p. 345–356, 1978. DOI: 10.1002/ana.410040410

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–520, set. 1952. DOI: 10.1016/0035-9203(52)90042-4

DOBBING, J.; SANDS, J. Quantitative growth and development of human brain. **Archives of Disease in Childhood**, v. 48, n. 10, 1973. DOI: 10.1136/adc.48.10.757

DOMINGUES, C. S. B. et al. Brazilian protocol for sexually transmitted infections, 2020: Congenital syphilis and child exposed to syphilis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, 2021. DOI: 10.1590/0037-8682-597-2020

ERNST, A. et al. Neurogenesis in the Striatum of the Adult Human Brain. **Cell**, v. 156, n. 5, p. 1072–1083, fev. 2014. DOI: 10.1016/j.cell.2014.01.044

ESSEN, D. C. VAN. A tension-based theory of morphogenesis and compact wiring in the central nervous system. **Nature**, v. 385, n. 6614, p. 313–318, 1997. DOI: 10.1038/385313a0

EYRE, J. A. et al. Evidence of activity-dependent withdrawal of corticospinal projections during human development. **Neurology**, v. 57, n. 9, p. 1543–1554, 2001. DOI: 10.1212/wnl.57.9.1543

FARAHANY, N. A. et al. The ethics of experimenting with human brain tissue. **Nature**, p. 429-432, 2018. DOI: 10.1038/d41586-018-04813-x

FELTEN, D.L., MAIDA, M.E., NETTER, F.H., O'BANION, M.K. **Netter's Atlas of Neuroscience**. Chap.13. Telencephalon, P.336. 3rd. ed. USA. 2016. Doi.org/10.1016/c2013-0-13970-0

FOGLIARINI, C. et al. Assessment of cortical maturation with prenatal MRI. Part I: normal cortical maturation. **European radiology**, v. 15, n. 8, p. 1671–1685, 2005. DOI: 10.1007/s00330-005-2782-1

FREITAS, D. A. et al. Congenital Zika syndrome: A systematic review. **PLoS ONE**, v.

15, n. 12, p. e0242367, 15 dez. 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0242367

FURTADO, J. et al. Toxoplasmosis: A global threat. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 3, n. 3, p. 281, 2011. DOI: 10.4103/0974-777X.83536

GAREL, C. et al. Fetal cerebral cortex: normal gestational landmarks identified using prenatal MR imaging. **American Journal of Neuroradiology**, v. 22, n. 1, p. 184–189, 2001.

GASPAR, P. C. et al. Protocolo Brasileiro para Infecções Sexualmente Transmissíveis 2020: testes diagnósticos para sífilis. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 30, n. spe1, 2021. DOI: 10.1590/s1679-4974202100006.esp1

GENÇ, M.; LEDGER, W. J. Syphilis in pregnancy. **Sexually Transmitted Infections**, v. 76, n. 2, p. 73 LP – 79, 1 abr. 2000. DOI: 10.1136/sti.76.2.73

GLASER, A. P.; SCHAEFFER, A. J. Urinary Tract Infection and Bacteriuria in Pregnancy. **Urologic Clinics of North America**, v. 42, n. 4, p. 547–560, nov. 2015. DOI: 10.1016/j.ucl.2015.05.004

GÖTZ, M.; BARDE, Y.-A. Radial glial cells: Defined and major intermediates between embryonic stem cells and CNS neurons. **Neuron**, v. 46, n. 3, p. 369–372, 2005. DOI: 10.1016/j.neuron.2005.04.012

GRILLNER, L. et al. Outcome of Rubella during Pregnancy with Special Reference to the 17th-24th Weeks of Gestation. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 321–325, 1 dez. 1983. DOI: 10.3109/inf.1983.15.issue-4.01

GRIMPREL, E. et al. Use of polymerase chain reaction and rabbit infectivity testing to detect *Treponema pallidum* in amniotic fluid, fetal and neonatal sera, and cerebrospinal fluid. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 8, 1991. DOI: 10.1128/jcm.29.8.1711-1718.1991

HALDIPUR, P. et al. Spatiotemporal expansion of primary progenitor zones in the developing human cerebellum. **Science**, v. 366, n. 6464, p. 454–460, 25 out. 2019. DOI: 10.1126/science.aax7526

HAMPSON, D. R.; BLATT, G. J. Autism spectrum disorders and neuropathology of the cerebellum. **Frontiers in Neuroscience**, 2015. DOI: 10.3389/fnins.2015.00420

HERCULANO-HOUZEL, S. Not all brains are made the same: New views on brain

- scaling in evolution. **Brain, Behavior and Evolution**. 2011. DOI: 10.1159/000327318
- HERCULANO-HOUZEL, S. et al. How to count cells: the advantages and disadvantages of the isotropic fractionator compared with stereology. **Cell and Tissue Research**, 2015. DOI: 10.1007/s00441-015-2127-6
- HERCULANO-HOUZEL, S.; LENT, R. Isotropic fractionator: A simple, rapid method for the quantification of total cell and neuron numbers in the brain. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 10, p. 2518–2521. 2005. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4526-04.2005
- HERCULANO-HOUZEL, S.; MOTA, B.; LENT, R. Cellular scaling rules for rodent brains. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 32, p. 12138–12143, 31 jul. 2006. DOI: 10.1073/pnas.0604911103
- HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, n. 10, p. 634–640, out. 2002. DOI: 10.1046/j.1469-0691.2002.00485.x
- HORVÁT, S. et al. Spatial embedding and wiring cost constrain the functional layout of the cortical network of rodents and primates. **PLoS biology**, v. 14, n. 7, p. e1002512, 2016. DOI: 10.1371/journal.pbio.1002512
- HOSSAIN, M.; BROUTET, N.; HAWKES, S. The elimination of congenital syphilis: A comparison of the proposed world health organization action plan for the elimination of congenital syphilis with existing national maternal and congenital syphilis policies. **Sexually Transmitted Diseases**, 2007. DOI: 10.1097/01.olq.0000261049.84824.40
- HÜPPI, P. S. et al. Quantitative magnetic resonance imaging of brain development in premature and mature newborns. **Annals of Neurology**, v. 43, n. 2, 1998. DOI: 10.1002/ana.410430213
- HUTTENLOCHER, P. R. Morphometric study of human cerebral cortex development. **Neuropsychologia**, v. 28, n. 6, p. 517–527, 1990. DOI: 10.1016/0028-3932(90)90031-i
- IOOS, S. et al. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Medecine Et Maladies Infectieuses**, v. 44, n. 7, p. 302–307, 1 jul. 2014. DOI: 10.1016/j.medmal.2014.04.008
- JAKOVCEVSKI, I. et al. Oligodendrocyte development and the onset of myelination in

the human fetal brain. **Frontiers in Neuroanatomy**, 2009. DOI: 10.3389/neuro.05.005.2009

JONES, E. G. Cellular structure of the human cerebral cortex. **Brain**, v. 133, n. 3, p. 945–946, 27 out. 2009.

KABANI, N.; ROSS, S. A. Congenital Cytomegalovirus Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 221, n. Supplement_1, p. S9–S14, 5 mar. 2020. DOI: 10.1093/infdis/jiz446

KATZ, L. C.; SHATZ, C. J. Synaptic activity and the construction of cortical circuits. **Science**, v. 274, n. 5290, p. 1133–1138, 1996. DOI: 10.1126/science.274.5290.1133

KEEFE, M. G.; NOWAKOWSKI, T. J. Evolutionary Expansion of Human Cerebellar Germinal Zones. **Trends in Neurosciences**, 2020. DOI: 10.1016/j.tins.2019.12.005

KERNS, K. A. et al. Neuropsychological Profile of Treated Children with Congenital Toxoplasmosis. **Psychology**, v. 05, n. 09, p. 1079–1089, 2014. DOI: 10.1016/B0-72-160537-0/50033-5

KIESSLING, M. C. et al. Cerebellar granule cells are generated postnatally in humans. **Brain Structure and Function**, v. 219, n. 4, p. 1271–1286, 2014. DOI: 10.1007/s00429-013-0565-z

KIM, K. K.; ADELSTEIN, R. S.; KAWAMOTO, S. Identification of Neuronal Nuclei (NeuN) as Fox-3, a New Member of the Fox-1 Gene Family of Splicing Factors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 45, p. 31052–31061, 27 ago. 2009. DOI: 10.1074/jbc.M109.052969

KIMBERLIN, D. W. et al. Valganciclovir for Symptomatic Congenital Cytomegalovirus Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 10, p. 933–943, 5 mar. 2015. DOI: 10.1056/NEJMoa1404599

KJÆR, M. et al. Neocortical Development in Brain of Young Children - A Stereological Study. **Cerebral Cortex**, v. 27, n. 12, 2017. DOI: 10.1093/cercor/bhw314

KNICKMEYER, R. C. et al. A structural MRI study of human brain development from birth to 2 years. **Journal of neuroscience**, v. 28, n. 47, p. 12176–12182, 2008. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3479-08.2008

KOSTOVIĆ, I. et al. Ontogenesis of goal-directed behavior: anatomo-functional considerations. **International Journal of Psychophysiology**, v. 19, n. 2, p. 85–102, 1995. DOI: 10.1016/0167-8760(94)00081-o

KOSTOVIC, I.; GOLDMAN-RAKIC, P. S. Transient cholinesterase staining in the mediodorsal nucleus of the thalamus and its connections in the developing human and monkey brain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 219, n. 4, p. 431–447, 1983. DOI: 10.1002/cne.902190405

KUMAR, S. S.; BUCKMASTER, P. S. Neuron-specific nuclear antigen NeuN is not detectable in gerbil substantia nigra pars reticulata. **Brain Research**, v. 1142, p. 54–60, abr. 2007. DOI: 10.1016/j.brainres.2007.01.027

LAGO, E. G.; VACCARI, A.; FIORI, R. M. Clinical features and follow-up of congenital syphilis. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 40, n. 2, 2013. DOI: 10.1097/OLQ.0b013e31827bd688

LAMBERT, N. et al. Rubella. **The Lancet**, v. 385, n. 9984, p. 2297–2307, jun. 2015. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60539-0

LARSEN, C. C. et al. Total number of cells in the human newborn telencephalic wall. **Neuroscience**, v. 139, n. 3, 2006. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2006.01.005

LARSEN, K. B. Using the optical fractionator to estimate total cell numbers in the normal and abnormal developing human forebrain. **Frontiers in Neuroanatomy**, 2017. DOI: 10.3389/fnana.2017.00112

LENT, R. et al. How many neurons do you have? Some dogmas of quantitative neuroscience under revision. **European Journal of Neuroscience**, 2012. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2011.07923.x

LEVITT, P. Structural and functional maturation of the developing primate brain. **The Journal of pediatrics**, v. 143, n. 4, p. 35–45, 2003. DOI: 10.1067/s0022-3476(03)00400-1

LIMPEROPOULOS, C. et al. Late gestation cerebellar growth is rapid and impeded by premature birth. **Pediatrics**, v. 115, n. 3, 2005. DOI: 10.1542/peds.2004-1169

LOIS, C.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. **Science**, v. 264, n. 5162, p. 1145–1148, 20 maio 1994.

LOSSI, L.; MERIGHI, A. In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS. **Progress in neurobiology**, v. 69, n. 5, p. 287–312, 2003. DOI: 10.1016/s0301-0082(03)00051-0

LUHMANN, H. J. et al. Early brain activity: Translations between bedside and laboratory. **Progress in Neurobiology**, v. 213, p. 102268, jun. 2022. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2022.102268

LUHMANN, H. J.; FUKUDA, A. Can we understand human brain development from experimental studies in rodents? **Pediatrics International**, v. 62, n. 10, p. 1139–1144, 2020. DOI: 10.1111/ped.14339

LUI, J. H.; HANSEN, D. V.; KRIEGSTEIN, A. R. Development and evolution of the human neocortex. **Cell**, v. 146, n. 1, p. 18-36, 2011. DOI: 10.1016/j.cell.2011.06.030

LYCK, L. et al. Immunohistochemical Markers for Quantitative Studies of Neurons and Glia in Human Neocortex. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 56, n. 3, p. 201–221, 1 mar. 2008. DOI: 10.1369/jhc.7A7187.2007

M. KENT FROBERG et al. Pathology of congenital syphilis in rabbits. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 11, p. 4743–4749, 1 nov. 1993. DOI: 10.1128/iai.61.11.4743-4749.1993.

MALINGER, G.; LEV, D.; LERMAN-SAGIE, T. The fetal cerebellum. Pitfalls in diagnosis and management. **Prenatal Diagnosis**, v. 29, n. 4, p. 372–380, 2009. DOI: 10.1002/pd.2196

MARCOS, A. C. et al. Toxoplasma gondii infection impairs radial glia differentiation and its potential to modulate brain microvascular endothelial cell function in the cerebral cortex. **Microvascular Research**, v. 131, 2020. DOI: 10.1016/j.mvr.2020.104024

MATSUZAWA, J. et al. Age-related volumetric changes of brain gray and white matter in healthy infants and children. **Cerebral cortex**, v. 11, n. 4, p. 335–342, 2001. DOI: 10.1093/cercor/11.4.335

MILLER, E.; CRADOCK-WATSON, J. E.; POLLOCK, T. M. Consequences of confirmed maternal rubella at successive stages of pregnancy. **Lancet (London, England)**, v. 2, n. 8302, p. 781–784, 9 out. 1982. DOI: 10.1016/s0140-6736(82)92677-0

MILLER, J. A. et al. Transcriptional landscape of the prenatal human brain. **Nature**, v. 508, n. 7495, p. 199–206, 2014. DOI: 10.1038/nature13185

MING, G. LI; SONG, H. Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. **Neuron**, 2011. DOI: 10.1016/j.neuron.2011.05.001

MLAKAR, J. et al. Zika virus associated with microcephaly. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 10, p. 951–958, 2016. DOI: 10.1056/NEJMoa1600651

MONIER, A. et al. Distribution and differentiation of microglia in the human encephalon during the first two trimesters of gestation. **Journal of Comparative Neurology**, v. 499, n. 4, p. 565–582, 2006. DOI: 10.1002/cne.21123

MOONEY, S. M.; MILLER, M. W. Postnatal Generation of Neurons in the Ventrobasal Nucleus of the Rat Thalamus. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 19, p. 5023–5032, 9 maio 2007. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1194-07.2007

MOURA-RIBEIRO, M., & GONÇALVES, V. **Neurologia do desenvolvimento**. Cap 2. 2. ed. São Paulo: Thieme Revinter, 2009.

MULLEN, R. J.; BUCK, C. R.; SMITH, A. M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. **Development**, v. 116, n. 1, p. 201–211, 1 set. 1992.

DOI: 10.1242/dev.116.1.201

NEDERGAARD, M.; RANSOM, B.; GOLDMAN, S. A. New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. **Trends in Neurosciences**, v. 26, n. 10, p. 523–530, 1 out. 2003. DOI: 10.1016/j.tins.2003.08.008

NESS, J. K. et al. Perinatal hypoxia-ischemia induces apoptotic and excitotoxic death of periventricular white matter oligodendrocyte progenitors. **Developmental neuroscience**, v. 23, n. 3, p. 203–208, 2001. DOI: 10.1159/000046144

NEVES, K. et al. The reliability of the isotropic fractionator method for counting total cells and neurons. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 326, 1 out. 2019. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2019.108392

NOCTOR, S. C. et al. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. **Nature neuroscience**, v. 7, n. 2, p. 136–144, 2004. DOI: 10.1038/nn1172

NOCTOR, S. C. et al. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. **Nature**, v. 409, n. 6821, p. 714–720, 2001. DOI: 10.1038/35055553

NOCTOR, S. C.; MARTÍNEZ-CERDEÑO, V.; KRIEGSTEIN, A. R. Contribution of intermediate progenitor cells to cortical histogenesis. **Archives of neurology**, v. 64, n. 5, p. 639–642, 2007. DOI: 10.1001/archneur.64.5.639

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guideline on Syphilis screening and treatment for pregnant women**. Geneva, Switzerland, 2017. ISBN: 9789241565691. www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/syphilis-ANCscreenandtreat-guidelines/en/

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), Reproductive, Maternal and Child Health European Regional Office. **Definitions and Indicators in Family Planning Maternal & Child Health and Reproductive Health**. WHO/EURO, 2001.

PAUL, L. K. et al. Agenesis of the corpus callosum: genetic, developmental and functional aspects of connectivity. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 4, p. 287–

299, abr. DOI: 10.1038/nrn2107

PAUS, T. et al. Maturation of white matter in the human brain: a review of magnetic resonance studies. **Brain research bulletin**, v. 54, n. 3, p. 255–266, 2001. DOI: 10.1016/s0361-9230(00)00434-2

PETANJEK, Z. et al. Lifespan Alterations of Basal Dendritic Trees of Pyramidal Neurons in the Human Prefrontal Cortex: A Layer-Specific Pattern. **Cerebral Cortex**, v. 18, n. 4, p. 915–929, 25 jul. 2007. DOI: 10.1093/cercor/bhm124

PILZ, D. T. et al. LIS1 and XLIS (DCX) mutations cause most classical lissencephaly, but different patterns of malformation. **Human molecular genetics**, v. 7, n. 13, p. 2029–2037, 1998. DOI: 10.1093/hmg/7.13.2029

PURVES, D. The Changing Brain. Unit IV, Chap.22 Early Brain Development. LaMantia, Anthony-Samuel. P.489-493, **Neuroscience**. sixth ed. New York, 2018.

QUADRATO, G.; BROWN, J.; ARLOTTA, P. The promises and challenges of human brain organoids as models of neuropsychiatric disease. **Nature Medicine**, v. 22, n. 11, p. 1220–1228, 26 out. 2016. DOI: 10.1038/nm.4214

RAKIC, P. Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex. **Brain research**, v. 33, n. 2, p. 471–476, 1971. DOI: 10.1016/0006-8993(71)90119-3

RAKIC, P. Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 1, p. 65–71, 2002. DOI: 10.1038/nrn700

RAPER, J.; MASON, C. Cellular strategies of axonal pathfinding. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 9, p. a001933, 2010. DOI: 10.1101/cshperspect.a001933

REZAIE, P.; MALE, D. Differentiation, ramification and distribution of microglia within the central nervous system examined. **Neuroembryology**, v. 1, n. 1, p. 29–43, 2002. DOI: 10.1159/000051020

SARNAT, H. B.; NOCHLIN, D.; BORN, D. E. Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in the early human fetal nervous system. **Brain and**

Development, v. 20, n. 2, p. 88–94, mar. 1998. DOI: 10.1016/s0387-7604(97)00111-3

SCHENKEL, D. F.; DALLÉ, J.; ANTONELLO, V. S. Prevalência de uropatógenos e sensibilidade antimicrobiana em uroculturas de gestantes do Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 36, n. 3, p. 102–106, mar. 2014. DOI: 10.1590/S0100-72032014000300002

SCHMAHMANN, J. D. The cerebellum and cognition. **Neuroscience Letters**, v. 688, p. 62-75, 2019.2019. DOI: 10.1016/j.neulet.2018.07.005

SCHMITZ, C.; HOF, P. R. Design-based stereology in neuroscience. **Neuroscience**, v. 130, n. 4, p. 813-831, 2005. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2004.08.050

SCHOENWOLF, G. C. et al. Desenvolvimento do Sistema Nervoso Central. **Larsen's Embriologia Humana**. Cap. 9 p. 323- 337. 5ª ed. Elsevier Health Sciences, 2020.

SERAFINI, T. et al. Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. **Cell**, v. 87, n. 6, p. 1001–1014, 1996. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81795-x

SHEFFIELD, J. S. et al. Congenital syphilis after maternal treatment for syphilis during pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 186, n. 3, 2002. DOI: 10.1067/mob.2002.121541

SIDMAN, R. L.; RAKIC, P. Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. **Brain research**, v. 62, n. 1, p. 1–35, 1973. DOI: 10.1016/0006-8993(73)90617-3

SILBEREIS, J. C. et al. The Cellular and Molecular Landscapes of the Developing Human Central Nervous System. **Neuron**, 2016. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.12.008

SMART, I. H. M. et al. Unique morphological features of the proliferative zones and postmitotic compartments of the neural epithelium giving rise to striate and extrastriate cortex in the monkey. **Cerebral cortex**, v. 12, n. 1, p. 37–53, 2002. DOI: 10.1093/cercor/12.1.37

SPRITZER, M. D.; ROY, E. A. Testosterone and Adult Neurogenesis. **Biomolecules**, v. 10, n. 2, p. 225, 3 fev. 2020. DOI: 10.3390/biom10020225

STAGNI, F. et al. Timing of therapies for downsyndrome: The sooner, the better. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, 2015. DOI: 10.3389/fnbeh.2015.00265

STERNBERGER, N. H. et al. Immunocytochemical method to identify basic protein in myelin-forming oligodendrocytes of newborn rat C.N.S. **Journal of Neurocytology**, v. 7, n. 2, p. 251–263, abr. 1978. DOI: 10.1007/BF01217922

STILES, J.; JERNIGAN, T. L. The basics of brain development. **Neuropsychology Review**, v. 20, n. 4, p. 327–348, 3 nov. 2010. DOI: 10.1007/s11065-010-9148-4

TAVANO, A. et al. Disorders of cognitive and affective development in cerebellar malformations. **Brain**, v. 130, n. 10, p. 2646–2660, 2007. DOI: 10.1093/brain/awm201

TONNI, G. et al. Congenital Syphilis Presenting with Brain Abnormalities at Neuroscan: A Case Report and a Brief Literature Review. **Microorganisms**, v. 10, n. 8, p. 1497, 1 ago. 2022. DOI: 10.3390/microorganisms10081497.

VAN DER KNAAP, M. S. et al. Age-dependent changes in localized proton and phosphorus MR spectroscopy of the brain. **Radiology**, v. 176, n. 2, p. 509–515, 1990. DOI: 10.1148/radiology.176.2.2164237

VELASCO, S. et al. Individual brain organoids reproducibly form cell diversity of the human cerebral cortex. **Nature**, v. 570, n. 7762, p. 523–527, 2019. DOI: 10.1038/s41586-019-1289-x

VOLPE, J. J. Human brain development. Unit I, Chap 6, p. 120, Chap 7, p.145, Intracranial Infections. Unit IX, Chap 7, P.971. **Neurology of the Newborn**. sixth edit ed. Philadelphia: Elsevier, 2018.

WALLON, M. et al. Congenital toxoplasmosis: systematic review of evidence of efficacy of treatment in pregnancy. **BMJ**, v. 318, n. 7197, p. 1511–1514, 5 jun. 1999. DOI: 10.1136/bmj.318.7197.1511

WANG, SAMUEL S.-H.; KLOTH, ALEXANDER D.; BADURA, A. The Cerebellum, Sensitive Periods, and Autism. **Neuron**, v. 83, n. 3, p. 518–532, ago. 2014.

DOI: 10.1016/j.neuron.2014.07.016

WEST, M. J. Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. **Trends in Neurosciences**, v. 22, n. 2, p. 51–61, fev. 1999. DOI: 10.1016/s0166-2236(98)01362-9

WOLF, H. K. et al. NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 44, n. 10, p. 1167–1171, out. 1996. DOI: 10.1177/44.10.8813082

WOODS, C. R. Syphilis in children: Congenital and acquired. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 16, n. 4, 2005. DOI: 10.1053/j.spid.2005.06.005

WYNshaw-BORIS, A. et al. Lissencephaly: Mechanistic insights from animal models and potential therapeutic strategies. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 21, n. 8, p. 823–830, out. 2010.

YAMAZAKI, Y. et al. Oligodendrocytes: Facilitating Axonal Conduction by More Than Myelination. **The Neuroscientist**, v. 16, n. 1, p. 11–18, 8 maio 2009. DOI: 10.1177/1073858409334425

ZABRISKIE, E. G. Certain factors in development of neurosyphilitic lesions in late congenital syphilis. **Journal of the American Medical Association**, v. 81, n. 7, 1923. DOI: 10.1001/jama.1923.02650070007004

ZECEVIC, N. Specific characteristic of radial glia in the human fetal telencephalon. **Glia**, v. 48, n. 1, p. 27–35, 2004. DOI: 10.1002/glia.20044

ZECEVIC, N. Synaptogenesis in layer I of the human cerebral cortex in the first half of gestation. **Cerebral Cortex**, v. 8, n. 3, p. 245–252, 1 abr. 1998. DOI: 10.1093/cercor/8.3.245

10. ANEXOS

Anexo 1

Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Escola da UFRJ

Parecer N° 1.705.903



MATERNIDADE ESCOLA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO DE JANEIRO/ ME-UFRJ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento da celularidade cerebral humana em condições normais ou patológicas.

Pesquisador: Roberto Lent

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 59131416.3.0000.5275

Instituição Proponente: Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro

Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ
FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP
CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO
Hospital Copa DOr

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.705.093

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo quantitativo, observacional e transversal com crianças recém-nascidas de qualquer idade gestacional e idade pós-natal inferior a 5 anos, que vão a óbito na Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro do ano 2016 a 2021. Serão colhidas informações clínicas fornecidas pela equipe médica através dos prontuários e de entrevista com as mães e será realizada a análise morfológica e anatomopatológica a partir de tecido encefálico post mortem. Em todos os casos será solicitada a autorização da doação do encéfalo por parte do parente mais próximo presente, que assinará o termo de consentimento livre e esclarecido aceitando a participação do caso para fins de pesquisa. O trabalho justifica-se porque, muito embora existam grandes avanços em técnicas de estudo, ainda continuam em aberto conhecimentos normativos fundamentais da neurociência básica, como por exemplo, como nosso cérebro é composto em termos de quantidade absoluta de células nas diversas etapas da vida.

Objetivo da Pesquisa:

Endereço: Rua das Laranjeiras, 180
Bairro: Laranjeiras **CEP:** 22.240-003
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2556-9747 **Fax:** (21)2205-9064 **E-mail:** cep@me.ufrj.br



**MATERNIDADE ESCOLA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO DE JANEIRO/ ME-UFRJ**



Continuação do Parecer: 1.705.093

Objetivo primário:

Pretende-se revelar o número absoluto de neurônios, células não-neuronais e células totais no encéfalo humano e em regiões de interesse, em diferentes idades perinatais, tanto em condições normais como patológicas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos desse estudo são mínimos, uma vez que a coleta do material será efetuada após o nascimento e óbito da criança. E os dados tabulados dos pacientes não permitirão a identificação dos participantes, sendo devidamente codificados assegurando a confidencialidade das informações.

Além disso, a equipe de pesquisa tomará todas as medidas de biossegurança disponíveis e relacionadas com a manipulação de tecido humano. Serão utilizados os equipamentos de proteção individual para evitar risco de infecções ou contaminação. O descarte do material posterior ao processamento será realizado de acordo com o protocolo institucional.

Benefícios:

A família obterá um laudo de necropsia com a determinação da causa da morte da criança. Isto será benéfico para o histórico clínico da mãe em determinar riscos patológicos de futuras gestações ou para outros filhos que já nasceram.

Este projeto também ajudará a determinar como a composição celular do cérebro muda no desenvolvimento fetal e nas primeiras etapas pós-natais do desenvolvimento normal e em condições patológicas, revelando assim o impacto destas alterações sobre a sua morfologia.

Com as informações do estudo, será possível comparar o cérebro adulto com o do neonato, e avaliar como diversas condições patológicas que afetam o desenvolvimento cerebral durante a gestação podem impactar a composição celular do cérebro destas crianças.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é de extrema relevância, pois poderá ser o primeiro passo para o entendimento de como condições patológicas na gestação podem afetar o desenvolvimento e composição cerebral após o nascimento.

Endereço: Rua das Laranjeiras, 180

Bairro: Laranjeiras

CEP: 22.240-003

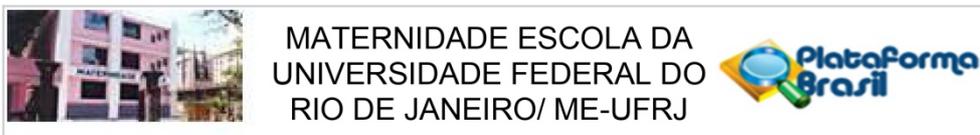
UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2556-9747

Fax: (21)2205-9064

E-mail: cep@me.ufrj.br



Continuação do Parecer: 1.705.093

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Presente todos os termos de apresentação obrigatória, muito embora seja ainda necessário a apresentação do currículo de todos os pesquisadores.

Recomendações:

Acrescentar um arquivo com os currículos de todos os pesquisadores, já que essa é uma determinação da própria CONEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pendência em relação ao currículo dos demais pesquisadores não é fator impeditivo da aprovação do projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Parecer do relator mantido.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_773197.pdf	23/08/2016 14:11:04		Aceito
Outros	Termo_compromisso_utilizacao_dados.pdf	23/08/2016 14:04:17	Jaqueline Rodrigues Robaina	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto_assinada.pdf	23/08/2016 13:57:21	Jaqueline Rodrigues Robaina	Aceito
Outros	Termo_anuencia_ICB.pdf	16/08/2016 13:27:26	Jaqueline Rodrigues Robaina	Aceito
Outros	Termo_anuencia_IDOR.pdf	16/08/2016 13:27:03	Jaqueline Rodrigues Robaina	Aceito
Outros	FRC_final.pdf	16/08/2016 13:26:10	Jaqueline Rodrigues Robaina	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_final.pdf	16/08/2016 13:25:36	Jaqueline Rodrigues Robaina	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	16/08/2016 13:25:24	Jaqueline Rodrigues Robaina	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua das Laranjeiras, 180
 Bairro: Laranjeiras CEP: 22.240-003
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)2556-9747 Fax: (21)2205-9064 E-mail: cep@me.ufrj.br



MATERNIDADE ESCOLA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO DE JANEIRO/ ME-UFRJ



Continuação do Parecer: 1.705.093

RIO DE JANEIRO, 31 de Agosto de 2016

Assinado por:
Ivo Basílio da Costa Júnior
(Coordenador)

Endereço: Rua das Laranjeiras, 180
Bairro: Laranjeiras **CEP:** 22.240-003
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2556-9747 **Fax:** (21)2205-9064 **E-mail:** cep@me.ufrj.br

Anexo 2
Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de
Medicina da USP
Parecer Nº 5.235.830



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento da celularidade cerebral humana em condições normais ou patológicas.

Pesquisador: Roberto Lent

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 59131416.3.3005.0065

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ
CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLOGICO
FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP
Hospital Copa DOr

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.235.830

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de celularidade cerebral humana onde serão utilizados os materiais constantes do banco de cérebros da FM, agora como centro colaborador do projeto com aprovação de seus membros. Também é alterado o cronograma para corrigir os efeitos da pandemia sobre o projeto principal.

Objetivo da Pesquisa:

Desenvolvimento da celularidade cerebral humana em condições normais ou patológicas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos mínimos, projeto abrangente de benefícios de difícil avaliação.

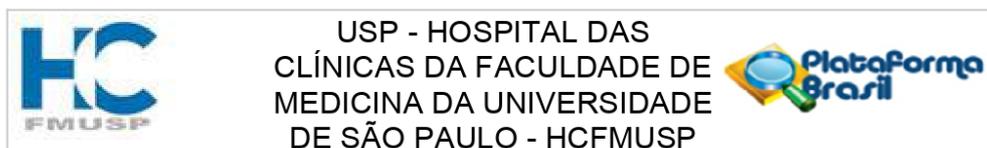
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Abrangente

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 5.235.830

Recomendações:

Aprovação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

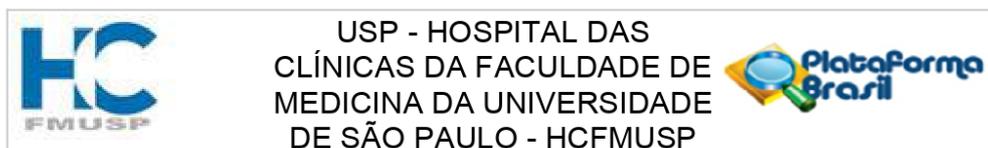
Nenhuma

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	Emenda8_alteracao_cronograma_.docx	07/12/2021 15:12:56	Jaqueline Rodrigues Robaina	Aceito
Outros	Emenda7_inclusao_SP.docx	23/01/2019 16:00:28	Jaqueline Rodrigues Robaina	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_atualizado_Jan19.pdf	23/01/2019 15:57:30	Jaqueline Rodrigues Robaina	Aceito
Outros	Carta_Anuencia_SVOC.pdf	23/01/2019 15:56:29	Jaqueline Rodrigues Robaina	Aceito
Outros	Carta_Anuencia_Banco_encefalos.pdf	23/01/2019 15:55:40	Jaqueline Rodrigues Robaina	Aceito
Outros	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_2887380.pdf	19/09/2018 16:22:23	Jaqueline Rodrigues Robaina	Aceito
Outros	Termo_anuencia_LeilaDiniz.pdf	19/09/2018 16:21:50	Jaqueline Rodrigues Robaina	Aceito
Outros	Emenda6_inclusao_Leila_Diniz.docx	19/09/2018 16:21:17	Jaqueline Rodrigues Robaina	Aceito
Outros	Emenda5.docx	11/07/2018 17:08:46	Jaqueline Rodrigues Robaina	Aceito
Outros	TERMO_DE_ANUENCIA_HMFM.pdf	13/11/2017 16:52:03	Jaqueline Rodrigues Robaina	Aceito
Outros	Emenda2_assinada.pdf	13/11/2017 16:47:35	Jaqueline Rodrigues Robaina	Aceito
Outros	Emenda_assinada.PDF	20/09/2016 12:49:33	Jaqueline Rodrigues Robaina	Aceito
Outros	Termo_compromisso_utilizacao_dados.pdf	23/08/2016 14:04:17	Jaqueline Rodrigues Robaina	Aceito
Outros	Termo_anuencia_ICB.pdf	16/08/2016 13:27:26	Jaqueline Rodrigues Robaina	Aceito
Outros	Termo_anuencia_IDOR.pdf	16/08/2016 13:27:03	Jaqueline Rodrigues Robaina	Aceito
Outros	FRC_final.pdf	16/08/2016	Jaqueline Rodrigues	Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 5.235.830

Outros	FRC_final.pdf	13:26:10	Robaina	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_final.pdf	16/08/2016 13:25:36	Jaqueline Rodrigues Robaina	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 10 de Fevereiro de 2022

**Assinado por:
Joel Faintuch
(Coordenador(a))**

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo 3

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido





**Hospital Maternidade
Fernando Magalhães**
 Rua General José Cristino, 87
 Rio de Janeiro, RJ
 Tel: (21)3878-2327

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Maternidade-Escola
 Rua das Laranjeiras, 180- Rio de Janeiro, RJ
 Tel: (21) 2205-9064

**Maternidade Leila Diniz
(Hospital Municipal
Lourenço Jorge)**
 Av. Ayrton Senna, 2000
 Rio de Janeiro, RJ
 Tel: (21) 3111-4900/3111-4923

**Serviço de Verificação de
Óbitos da Capital - USP**
 Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 250
 São Paulo, SP
 Tel: (11) 3061-8740/3061-8300



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA REALIZAÇÃO DE NECRÓPSIA E DOAÇÃO DE ÓRGÃOS PARA PESQUISA CIENTÍFICA

Título do Protocolo: **Desenvolvimento da celularidade cerebral humana em condições normais ou patológicas**

Pesquisador Responsável: **ROBERTO LENT, MD, PHD**
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS (ICB-UFRJ)

Leia este documento cuidadosamente

Estamos solicitando seu consentimento para realizar a **necropsia de seu bebê**, recentemente falecido, e obter a **doação do encéfalo para realização de estudos científicos**. A sua participação é voluntária. Pergunte a equipe da pesquisa quaisquer dúvidas que você possa ter.

OBJETIVO DO ESTUDO: Estudar o desenvolvimento normal e patológico do cérebro humano durante o período gestacional e após o nascimento.

EXPLICAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS: Os procedimentos que iremos realizar serão explicados a seguir. Eles obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no. 466/2012, do Conselho Nacional de Saúde. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos a sua dignidade ou de sua criança.

Sabemos que há o risco de ficar constrangida(o) com este pedido, mas esta necropsia poderá ajudar a identificar as causas associadas com o falecimento da sua criança. Gostaríamos ainda que você(s) autorizasse(m) a doação do encéfalo, para estudos e pesquisas. Este gesto, esta doação de órgãos para estudos, aumentará o conhecimento científico sobre diversos assuntos e poderá ajudar na evolução da medicina, com benefícios futuros para toda a sociedade.

Coleta de dados da gestação e do recém-nascido - Colheremos alguns dados registrados no prontuário, como informações demográficas, sinais e sintomas apresentados e resultados de alguns exames. Também faremos algumas perguntas a você sobre a sua saúde e a gestação atual. Respeitaremos a confidencialidade e o sigilo das informações colhidas.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Pais/Responsável Legal, Versão 2 de 11 de julho de 2018.

Rubrica Participante / Representante Legal

Rubrica do Pesquisador




**Hospital Maternidade
Fernando Magalhães**
 Rua General José Cristino, 87
 Rio de Janeiro, RJ
 Tel: (21)3878-2327

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Maternidade-Escola
 Rua das Laranjeiras, 180- Rio de Janeiro, RJ
 Tel: (21) 2205-9064

**Maternidade Leila Diniz
(Hospital Municipal
Lourenço Jorge)**
 Av. Ayrton Senna, 2000
 Rio de Janeiro, RJ
 Tel: (21) 3111-4900/3111-4923

**Serviço de Verificação de
Óbitos da Capital - USP**
 Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 250
 São Paulo, SP
 Tel: (11) 3061-8740/3061-8300



Necropsia (autopsia) - Após o falecimento do seu bebê será realizada uma necropsia por um médico patologista. **Você receberá um laudo desta necropsia.** Durante a necropsia, o cérebro do seu bebê será retirado para se proceder aos estudos objeto desta pesquisa, quais sejam a realização de uma Ressonância Magnética e a contagem do número de neurônios, através de um método laboratorial específico.

RISCOS E BENEFÍCIOS: Não há riscos envolvidos. Também não haverá benefícios diretos, mas ele será muito importante para ajudar a compreender algumas das doenças que ocorrem no cérebro dos bebês, algumas de causas desconhecidas, outras causadas por agentes infecciosos como vírus, bactérias e outros. Além disso, será fornecido um laudo de necropsia com a determinação da causa da morte de seu bebê.

CONFIDENCIALIDADE: O seu prontuário médico e o de sua criança poderão ser consultados pelos profissionais envolvidos no estudo. Entretanto, em nenhum momento da pesquisa vocês serão identificados. Ou seja, quando os resultados deste estudo tornarem-se públicos, os médicos não usarão seu nome ou de sua criança e não deixarão ninguém saber sobre seus dados pessoais.

ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS: As amostras do encéfalo que serão colhidas para estudos serão armazenadas no Laboratório do Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino (IDOR) ou no Laboratório de Neuroplasticidade do Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ. Se no futuro houver necessidade da dosagem de outras substâncias nestas amostras de soro/plasma ou realização de novos estudos, você está dando o seu consentimento.

OUTROS ESCLARECIMENTOS:

- Você não terá nenhum custo ou será pago pela sua concordância em participar desta pesquisa.
- Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Maternidade Escola da UFRJ. O Comitê de Ética em Pesquisa é um grupo de pessoas que se reúne para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade. Ele é responsável por avaliar e acompanhar os aspectos éticos de pesquisas com seres humanos. Ao final da pesquisa, todo material será mantido em arquivo, por pelo menos 5 anos, conforme Resolução 466/2012 e orientações do CEP ME-UFRJ.
- Se você tiver alguma pergunta sobre a pesquisa, favor entrar em contato com:
 - Dr. Joffre Amin Junior – Vice-diretor da Maternidade Escola da UFRJ – Rua das Laranjeiras 180 – Tel: (21) 2205-9064

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Pais/Responsável Legal, Versão 2 de 11 de julho de 2018.

Rubrica Participante / Representante Legal

Rubrica do Pesquisador



**Hospital Maternidade
Fernando Magalhães**
Rua General José Cristino, 87
Rio de Janeiro, RJ
Tel: (21)3878-2327

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Maternidade-Escola
Rua das Laranjeiras, 180- Rio de Janeiro, RJ
Tel: (21) 2205-9064

**Maternidade Leila Diniz
(Hospital Municipal
Lourenço Jorge)**
Av. Ayrton Senna, 2000
Rio de Janeiro, RJ
Tel: (21) 3111-4900/3111-4923

**Serviço de Verificação de
Óbitos da Capital - USP**
Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 250
São Paulo, SP
Tel: (11) 3061-8740/3061-8300



- Dr. Roberto Lent – Pesquisador Responsável - Av. Carlos Chagas Filho 373 Bloco F sala 1-31 – Tel: (21) 3938-6469
- Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Escola da UFRJ – Rua das Laranjeiras 180 - Tel e Fax - 21- 2556-9747 - E-Mail: cep@me.ufrj.br e <http://www.me.ufrj.br>

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A sua assinatura neste termo significa que você leu este formulário, ou que ele foi lido para você, que lhe foram dadas todas as explicações sobre o estudo, que você teve tempo para fazer perguntas e discutir qualquer preocupação que você possa ter sobre o estudo, que você sabe que sua criança será incluída na pesquisa, que você recebeu todas as respostas para as suas dúvidas, que está satisfeito com as informações que lhe foram dadas e concordou com a participação de sua criança no estudo.

A qualquer momento, durante a pesquisa, ou posteriormente, você poderá solicitar do pesquisador informações sobre a participação de seu bebê e/ou sobre a pesquisa, o que poderá ser feito através dos meios de contato explicitados neste Termo.

Você está assinando porque você concorda livre e espontaneamente com a participação de sua criança neste estudo. Esse termo é emitido em duas vias: uma fica com o pesquisador e a outra com você ou outro responsável pelo bebê, que concordou e autorizou a participação nesta pesquisa.

Eu declaro que estou recebendo uma via deste documento, assinado por mim e/ou representante legal da criança e pelo pesquisador, que também representa a instituição de pesquisa. Todas as páginas deste documento foram rubricadas por nós. O pesquisador manterá a outra via original em seu arquivo.

Nome Completo do Recém-nascido Participante da Pesquisa, em letra legível (caso disponível)

Nome Completo da Mãe / Responsável Legal do Participante da Pesquisa, em letra legível

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Pais/Responsável Legal, Versão 2 de 11 de julho de 2018.

Rubrica Participante / Representante Legal

Rubrica do Pesquisador



**Hospital Maternidade
Fernando Magalhães**
Rua General José Cristino, 87
Rio de Janeiro, RJ
Tel: (21)3878-2327

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Maternidade-Escola
Rua das Laranjeiras, 180- Rio de Janeiro, RJ
Tel: (21) 2205-9064

**Maternidade Leila Diniz
(Hospital Municipal
Lourenço Jorge)**
Av. Ayrton Senna, 2000
Rio de Janeiro, RJ
Tel: (21) 3111-4900/3111-4923

**Serviço de Verificação de
Óbitos da Capital - USP**
Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 250
São Paulo, SP
Tel:(11) 3061-8740/3061-8300



Assinatura da Mãe / Representante Legal

Data (dd/mmm/aaaa)

Telefone de contato

Em caso de assinatura pelo Representante Legal, especificar a relação com o Participante da Pesquisa

PESQUISADOR

Confirmando que expliquei a natureza e objetivos desta pesquisa a mãe e/ou ao representante legal da criança. Declaro que cumprirei as exigências contidas na resolução 466/12.

Nome Completo do Pesquisador

Assinatura do Pesquisador

Data
(dd/mmm/aaaa)

TESTEMUNHA IMPARCIAL (A presença de pelo menos uma testemunha **imparcial** é obrigatória quando o participante ou responsável legal não puder ler ou escrever. Uma testemunha **imparcial** deve estar presente durante toda a discussão do consentimento livre e esclarecido.)

Confirmando que as informações contidas neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foram precisamente explicadas e aparentemente compreendidas pelo Participante e/ou seu Representante Legal e que o consentimento foi fornecido voluntariamente pelo Participante e/ou seu Representante Legal.

Nome Completo da Testemunha Imparcial, em letra legível

Assinatura da Testemunha Imparcial

Data dd/mmm/aaaa)

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Pais/Responsável Legal, Versão 2 de 11 de julho de 2018.

Rubrica Participante / Representante Legal

Rubrica do Pesquisador

Anexo 4
Ficha de Relato de Caso

Diagnóstico laboratorial de alguma doença infecciosa no Recém-Nascido? Sim Não – Se sim, qual:

<input type="checkbox"/> Toxoplasmose	<input type="checkbox"/> HIV
<input type="checkbox"/> Rubéola	<input type="checkbox"/> Dengue
<input type="checkbox"/> Citomegalovírus	<input type="checkbox"/> Chikungunya
<input type="checkbox"/> Sífilis	<input type="checkbox"/> Zika
<input type="checkbox"/> Herpes simples	<input type="checkbox"/> Outras. Especificar:
<input type="checkbox"/> Parvovírus	_____

Outros exames

Tomografia craniana: Sim Não Aguardando – Se sim, data da realização: ___/___/___

Resultado: Normal calcificações lisencefalia atrofia cerebral ventriculomegalia

suturas calcificadas outras, especificar: _____

Ressonância magnética craniana: Sim Não Aguardando – Se sim, data da realização: ___/___/___

Resultado: Normal calcificações lisencefalia atrofia cerebral ventriculomegalia

suturas calcificadas outras, especificar: _____

Ultrassom transfontanela: Sim Não Aguardando – Se sim, data da realização: ___/___/___

Resultado: Normal calcificações lisencefalia atrofia cerebral ventriculomegalia

suturas calcificadas outras, especificar: _____

Ultrassom abdominal: Sim Não Aguardando – Se sim, data da realização: ___/___/___

Foi encontrada alguma alteração: Sim Não – Se sim, especificar: _____

Ecocardiograma: Sim Não Aguardando – Se sim, data da realização: ___/___/___

Foi encontrada alguma alteração: Sim Não – Se sim, especificar: _____

Fundo do olho: Sim Não – Se sim, data da realização: ___/___/___

Foi encontrada alguma alteração: Sim Não – Se sim, especificar: _____

Entrevista com a mãe

Identificação e dados sócio demográficos

Nome: _____

Data de nascimento: ___/___/___ Idade: _____ anos

Raça/Cor: Branca Preta Amarela Parda Indígena Ignorado

Escolaridade (considerar o maior nível completo): Sem escolaridade Fundamental I

Fundamental II Médio Superior Ignorado

Estado civil: Solteira Casada Viúva Separada/Divorciada União estável Ignorado

Ocupação: _____

Quantas pessoas moram na sua casa: _____

Qual é a renda familiar mensal: _____ reais

Endereço atual

Estado: _____ Município: _____

Logradouro: _____ Número: _____

Bairro: _____ Telefones: _____

Antecedentes

Há algum grau de parentesco com o seu companheiro? Sim Não – Se sim, qual: _____

Você possui alguma malformação congênita? Sim Não – Se sim, qual: _____

Há alguém na sua família, ou na do seu companheiro, que nasceu com microcefalia? Sim Não

Você fazia uso de algum medicamento de uso contínuo? Sim Não – Se sim, especificar: _____

Teve diagnóstico de alguma doença pré-existente? Sim Não – Se sim, qual(is):

Diabetes Outras doenças metabólicas Hipertensão arterial sistêmica Cardiopatia crônica Doença renal crônica Pneumopatias crônicas Hemoglobinopatia Câncer Doença auto imune Doença neuroléptica Outras, especificar: _____

Teve diagnóstico ou recebeu tratamento para alguma doença sexualmente transmissível?

Sim Não

Se sim, qual (is): HIV Sífilis Gonorreia Clamídia Hepatites B e/ou C Herpes simples

Outras, especificar: _____

Histórico obstétrico/ginecológico

Primeira gestação? Sim Não – Se sim, pular para dados da gestação. Se não, continuar:

Quantas vezes você já engravidou (considerar abortos e natimortos)? _____

Quantos filhos nasceram vivos? _____ Quantos filhos nasceram mortos? _____

Já teve algum aborto? Sim Não – Se sim, quantos: _____

Algum destes nasceu com alguma malformação congênita? Sim Não – Se sim, qual(is): _____

Qual é a data de nascimento do seu último filho? ____/____/____

Durante a gestação

Teve contato com pesticidas? Sim Não – Se sim, especificar: _____

Teve contato com agrotóxicos? Sim Não – Se sim, especificar: _____

Teve contato com algum produto químico? Sim Não – Se sim, especificar: _____

Realizou algum exame de raio-X? Sim Não – Se sim: 1º trimestre 2º trimestre 3º trimestre

Você fez uso de algum destes medicamentos?

Ácido fólico: Sim Não – Se sim, data que iniciou o tratamento: ____/____/____

Ferro: Sim Não – Se sim, data que iniciou o tratamento: ____/____/____

Outros: Sim Não - Se sim: Quais:

Medicamento 1: _____ data que iniciou o tratamento: ____/____/____

Medicamento 2: _____ data que iniciou o tratamento: ____/____/____

Medicamento 3: _____ data que iniciou o tratamento: ____/____/____

Medicamento 4: _____ data que iniciou o tratamento: ____/____/____

Hábitos durante a gestação

Álcool

Fez uso de bebida alcoólica durante a gestação?

Sim Não – Se não, pular para tabagismo. Se sim, continuar.

Com que frequência você utilizava bebidas alcoólicas por semana?

Uma duas três quatro cinco seis sete ou mais

Quantas doses ou drinks você costumava tomar nesses dias?

Uma duas três ou mais

Com que frequência tomava mais que três doses ou drinks na mesma ocasião?

Nunca mensalmente ou menos Mensalmente Semanalmente Diariamente Ignorada

Tabagismo

Em relação ao cigarro, você diria que:

Nunca fumei

Fumei no passado, mas na gestação não

Fumei de menos que 10 cigarros por dia

Fumei de 10 a 20 cigarros por dia

Fumei mais de 20 cigarros por dia

Não soube responder

Se fumante, há quantos anos fuma diariamente? _____

Se ex-fumante, parou de fumar há quanto tempo? _____ dias semanas meses anos

Drogas ilícitas - Agora vamos falar sobre o uso de substâncias estimulantes ou calmantes.

Durante esta gravidez, você usou:

Maconha - Nunca 1x/por mês pelo menos mais ou menos uma vez por semana todos os dias

Cocaína - Nunca 1x/mês pelo menos mais ou menos uma vez por semana todos os dias

Qualquer droga injetável - Nunca 1x/mês pelo menos mais ou menos 1x/semana todos os dias

Crack - Nunca uma vez por mês pelo menos mais ou menos uma vez por semana todos os dias

Ecstasy - Nunca Nenhuma vez no último ano antes de ficar grávida uma vez por mês pelo

menos mais ou menos uma vez por semana todos os dias

Anfetamina ou remédios para emagrecer - Nunca Nenhuma vez no último ano antes de ficar

grávida uma vez por mês pelo menos mais ou menos uma vez por semana todos os dias

Outras, quais? _____

uma vez por mês pelo menos mais ou menos uma vez por semana todos os dias

Dados do pré-natal (cartão da gestante e outros registros)

Realizou pré-natal: Sim Não. Se sim, continuar:

Unidade de saúde que realizou pré-natal: _____

Município de realização do pré-natal: _____

Número de consultas: 1º trimestre: _____ 2º trimestre: _____ 3º trimestre: _____ Total: _____

Desenvolveu alguma complicação durante a gestação? Sim Não – Se sim, qual:

Infecção do trato urinário Anemia Diabetes gestacional Pré-eclampsia

Hipertensão arterial sistêmica gestacional Placenta prévia Oligodrâmnio Polidrâmnio

Insuficiência do colo uterino Hiperemese gravídica Anomalias anatômicas do útero

Deslocamento de placenta Crescimento intrauterino restrito Incisura

Diagnóstico laboratorial de alguma doença infecciosa? [] Sim [] Não – Se sim, qual:

<input type="checkbox"/> Toxoplasmose <input type="checkbox"/> Rubéola <input type="checkbox"/> Citomegalovírus <input type="checkbox"/> Sífilis <input type="checkbox"/> Herpes simples <input type="checkbox"/> Parvovírus	<input type="checkbox"/> HIV <input type="checkbox"/> Dengue <input type="checkbox"/> Chikungunya <input type="checkbox"/> Zika <input type="checkbox"/> Outras. Especificar: _____	Ocasião do diagnóstico: 1º. Trimestre [] 2º. Trimestre [] 3º. Trimestre []
---	--	---

Em caso de sífilis, recebeu tratamento? [] Sim [] Não

Se sim, foi adequado? [] Sim [] Não Parceiro tratado? [] Sim [] Não

Em caso de toxoplasmose, recebeu tratamento? [] Sim [] Não

Se sim, foi adequado? [] Sim [] Não

Encerramento do caso

Data e hora do óbito: ____/____/____ às ____:____

O corpo foi mantido em geladeira? [] Sim [] Não – Se sim, data e hora: ____/____/____ às ____:____

Data e hora da remoção do encéfalo: ____/____/____ às ____:____ Peso do encéfalo: _____g

Data e hora de colocação do encéfalo em para formaldeído a 2%: ____/____/____ às ____:____

Data e hora de passagem do encéfalo para solução fisiológica: ____/____/____ às ____:____

O encéfalo foi mantido em geladeira? () Sim () Não

Data e hora da saída da ME para o IDOR: ____/____/____ às ____:____

Data e hora da realização da RM do encéfalo: ____/____/____ às ____:____

Data e hora do envio para o ICB? ____/____/____ às ____:____

Data e hora da chegada ao ICB? ____/____/____ às ____:____

Preenchido por: _____

Observações:

Anexo 5

Artigo: Pronounced decline of absolute cell numbers in the brain of a newborn with congenital syphilis.

Letter to the Editor

Pronounced decline of absolute cell numbers in the brain of a newborn with congenital syphilis

Emily Castro-Fonseca, MD, PhD^{1,2}, Barbara Rosa, MSc¹, Viviane R. Silva, MSc³,
 Cecilia V. Andrade, MD, PhD³, Inês Praxedes, MD⁴, Andréa B. Guastavino, MD, MSc⁵,
 Claudia G. Esteves, MD⁵, Georgia Chalfun, MD, PhD⁵, Arnaldo Prata-Barbosa, MD^{5,6},
 Leila Chimelli , MD⁷, Patricia P. Garcez, PhD¹, Roberto Lent, MD, PhD^{1,2,*}

¹Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

²D'Or Institute for Research and Education, Rio de Janeiro, Brazil

³Fernandes Figueira Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

⁴Department of Pathology, Maternity School, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁵Department of Neonatology, Maternity School, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁶Department of Pediatrics, D'Or Institute for Research and Education, Rio de Janeiro, Brazil

⁷Laboratory of Neuropathology, Rio de Janeiro State Brain Institute, Rio de Janeiro, Brazil

*Send correspondence to: Roberto Lent, MD, PhD, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Rio de Janeiro, CEP: 21941-902, Rio de Janeiro, Brazil;
 E-mail: rilent@icb.ufrj.br

Emily Castro-Fonseca and Barbara Rosa contributed equally to this work.

To the Editor:

Syphilis is a sexually transmitted infection caused by the spirochaete bacterium *Treponema pallidum*, which has recently re-emerged in several world regions (1). In 2018, the World Health Organization estimated that every year 6 million new cases of syphilis occur worldwide among adults (2). The disease is divided into stages with different clinical and pathological manifestations. With no or inadequate treatment, the *T. pallidum* can be vertically transmitted from the mother to the fetus at any time during pregnancy, leading to congenital syphilis. According to the US Centers for Disease Control and Prevention, congenital syphilis increased by 15% in 2020 relative to 2019 and 254% relative to 2016 (3). In Brazil, according to the Ministry of Health, the number of deaths caused by congenital syphilis increased by 39.9% from 2011 to 2021 (4).

Congenital syphilis has broad clinical variability, from asymptomatic cases to patients with cutaneous lesions, visceral manifestations, intrauterine growth restriction, abortion, stillbirth, or neonatal death (5). In the central nervous system, congenital syphilis can be associated with microcephaly (6). Moreover, it may result in acute and subacute meningitis and chronic meningovascular syphilis. Symptoms include intellectual disabilities, seizures, cranial nerve palsies, hydrocephalus, signs of increased intracranial pressure (e.g. bulging anterior fontanelle), and focal neurological deficits (7).

Despite being an ancient disease, little is known about how *T. pallidum* fetal infection affects the developing brain cells.

The case reported here contributes to unraveling quantitative brain cellularity alterations due to congenital syphilis. Besides morphological and immunohistochemical analyses to demonstrate and characterize *T. pallidum* infection in the brain, we measured the absolute number of brain cells using the Isotopic Fractionator technique (8, 9), showing a pronounced reduction in the number of cells of the developing brain of a deceased full-term newborn diagnosed with congenital syphilis compared to an age-matched control case.

The congenital syphilis case was a male neonate born from cesarean delivery at 41 weeks of gestation, which was indicated after pre-eclampsia and fetal heart rate decelerations. The mother was 20 years old and tested positive for syphilis at 20 gestational weeks (GW) (Venereal Disease Research Laboratory [VDRL] = 1:64). Treatment was done with benzathine penicillin, extended as long as the VDRL was still positive (1:16 at 23 GW; 1:8 at 26 and 34 GW; 1:4 at birth). The neonate weighed 2345 g with a head circumference of 32 cm (third percentile). The Apgar scores were 1 and 3 in the first and fifth minutes. He developed meconium aspiration and asphyxia, was intubated for respiratory support, and referred to the neonate intensive care unit (NICU). The newborn had a positive VDRL (1:2), and antibiotic therapy was initiated with crystal-line penicillin. The patient did not respond to immediate care and died of neonatal sepsis 34 hours after birth.

The control case was a female neonate born from cesarean delivery at 41 weeks of gestation, weighing 3030 g and 33 cm

of head circumference (15th to 50th percentile). At birth, she was hypotonic and displayed respiratory distress. The Apgar scores were 3 and 5 in the first and fifth minutes. She was intubated for respiratory support. After performing a thorax X-ray, the presence of a diaphragmatic hernia with pneumothorax was confirmed. After 2 days in the NICU, she developed a cardiorespiratory arrest leading to death. The 27-year-old mother had an uncomplicated prenatal history and had a negative VDRL.

All procedures followed the Helsinki Declaration 2008. The brains were obtained by donation for research upon anonymization. Written informed consent was given by their relatives as appropriate. All procedures were in accordance with local regulations and approved by the Federal University of Rio de Janeiro Maternity School Ethics Committee (N^o 1.705.093/2016). Brains were removed <14 hours after death and fixed with 2% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline for 40 hours. One hemisphere was used for macroscopic and histopathological analysis, the other for absolute counting of cell numbers. In the first case, representative areas were processed for paraffin embedding, and 5 μ m sections were stained with

hematoxylin and eosin (H&E). Immunohistochemistry was performed using antibodies to the following: GFAP, NeuN, and *Treponema* (rabbit polyclonal antibody). Infected fetal liver tissue was used as a positive control. The primary antibody was replaced with phosphate-buffered saline as a negative control.

Macroscopically, both brains were covered by transparent leptomeninges; gyri and sulci were preserved. Sections of the cortex and the white matter had a normal appearance, except in focal areas of the congenital syphilis case, where small whitish dots were seen in the deep white matter adjacent to the lateral ventricle. The deep gray nuclei, brainstem, and cerebellum looked normal. Microscopic analysis of the congenital syphilis case showed rare lymphocytes in the meninges and around small vessels. Immunohistochemistry also showed astrocytosis, perivascular T lymphocytes, and macrophages/microglial proliferation, particularly in the leptomeninges, periventricular white matter, hippocampus, and in the choroid plexus (Fig. 1A–E). Small foci of necrosis and calcification were observed in the deep white matter close to the lateral ventricle (Fig. 1F), and some narrow and fused gyri (polymicrogyria) (Fig. 1F), and some narrow and fused gyri (polymicrogyria)

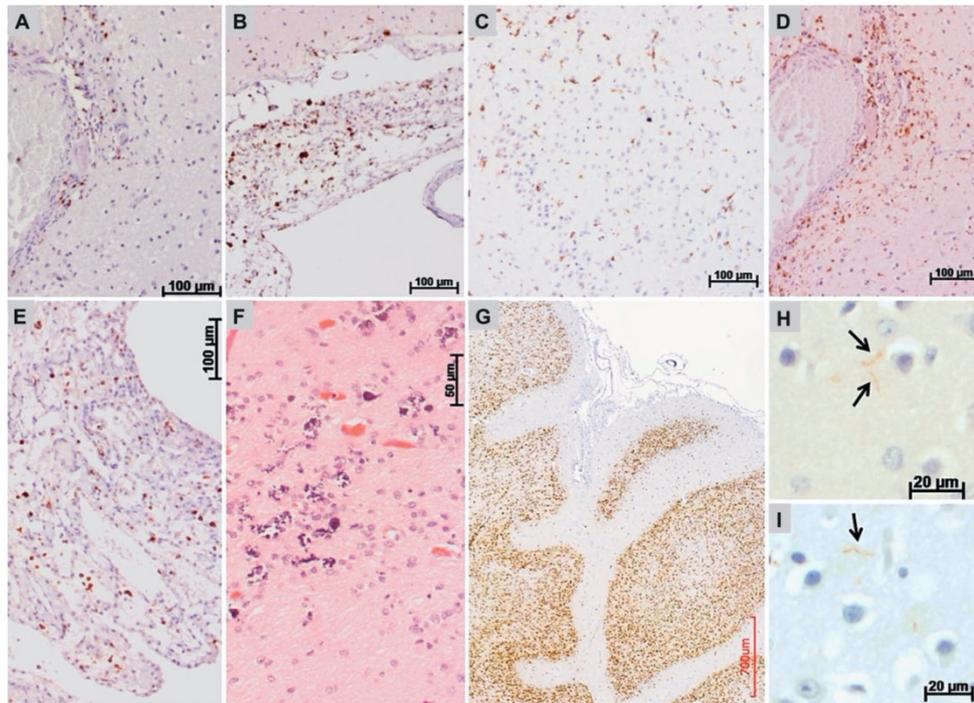


Figure 1. Immunohistochemistry of brain regions of the congenital syphilis case. (A) CD3-positive (1:1000; Cell Marque) perivascular T lymphocytes. (B–E) CD68-positive (1:1000; Cell Marque) macrophage/microglial proliferation in leptomeninges, hippocampus, perivascular and choroid plexus, respectively. (F) Necrosis and calcification in the deep white matter close to the lateral ventricle (H&E). (G) Polymicrogyria with disorganized cortical lamination of the neurons (NeuN, 1:15 000; Zeta-Biogen). (H, I) Immunopositive *Treponemas*, indicated by arrows (polyclonal antibody, 1:100; Cell Marque). Scale bars are indicated in each figure.

with disorganized cortical lamination of the neurons (Fig. 1G). *Treponema* organisms were identified by immunohistochemistry (Fig. 1H, I). No alterations were identified in the control brain.

For *T. pallidum* detection by quantitative polymerase chain reaction (q-PCR), eight 5- μ m sections were subjected to: (1) deparaffinization with 1 mL xylene for 3 minutes at 50°C, (2) centrifugation at maximum speed for 2 minutes, (3) solvent removal, (4) vortexing of pellets in absolute ethanol, (5) centrifugation at maximum speed for 2 minutes, (6) removal of ethanol and drying of pellets at room temperature for approximately 20 minutes, (7) vortexing of pellets in 800 mL TRIzol Reagent followed by 2 incubation cycles for 30 minutes in the dry bath at 80°C, passing in the L-Beader after each 30-minute incubation, and (8) centrifugation at maximum speed for 3 minutes. q-PCR was performed with 50 mL of the sample using BD MAX ExK TNA-3 and TaqMan Gene Expression Assay Ba04646237_s1 according to the recommended instructions. Through q-PCR it was possible to detect the *T. pallidum* in a basal ganglia sample (CT-36). Other samples were negative.

The other hemispheres of both cases were processed for cell quantification using the protocol for Isotropic Fractionation, as

previously described (8, 9). Briefly, the brain areas of interest (frontal, temporal, parietal and occipital lobes, and the cerebellum) were dissected and dissociated (10). A suspension of nuclei was obtained and kept homogenous under constant agitation. A fluorescent DNA intercalant (2% of 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride [DAPI]) was added to identify and count all nuclei in a specific volume (10- μ L aliquots) of a Neubauer chamber. Absolute numbers of cells were calculated by multiplying the mean density of nuclei by the final volume of the nuclei suspension. To differentiate neuronal from non-neuronal nuclei, immunocytochemistry was performed with the anti-NeuN monoclonal antibody. Proportions of NeuN-positive nuclei were calculated and used to obtain the absolute numbers of neuronal and non-neuronal cells. The absolute brain numbers were estimated by doubling single hemisphere numbers inasmuch as no significant differences in cell quantities were detected previously between hemispheres (9).

The head circumference of the congenital syphilis case was small for gestational age (third percentile). Brain weight was 37% lower (271.92 g) than the control case (428.86 g) (Fig. 2B). We found a reduction in absolute brain cell numbers. The control case had 35.29 billion (bi) cells, while the congenital syphilis case had 23.33 billion cells, a reduction

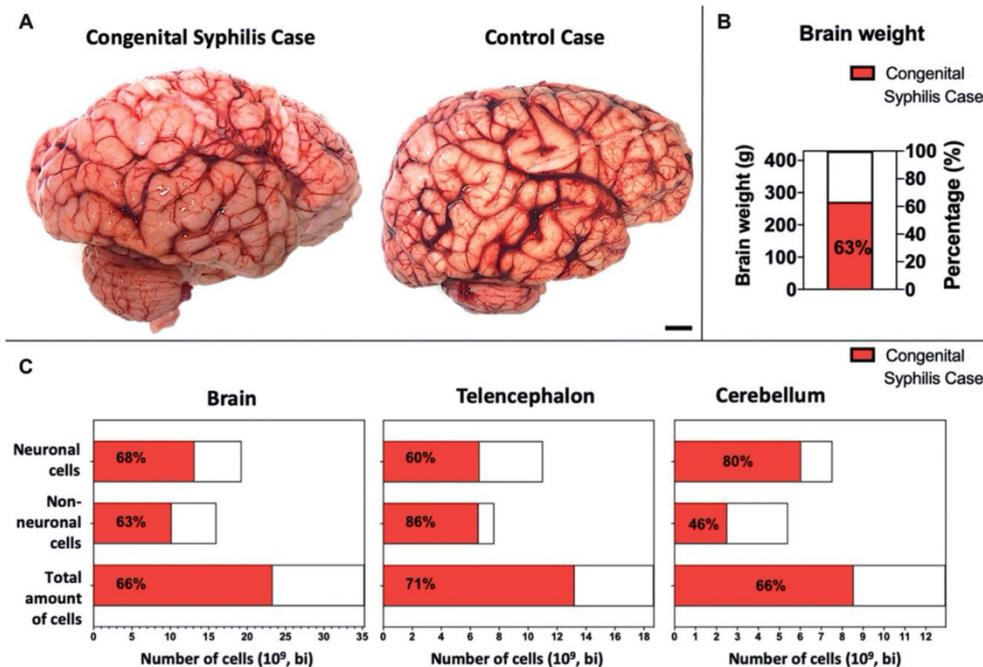


Figure 2. Congenital syphilis and control case, quantitative comparisons. (A) Gross appearances of brains at autopsy. Scale bar: 1 cm. (B) Brain weight. (C) Number of neuronal, non-neuronal, and total amount of cells for the brain, telencephalon, and cerebellum. The histograms denote the relative and absolute amounts of cells in the syphilis case (red), as compared with the corresponding parameters in the control brain (white).

of 34%. There was also a reduction of 32% of neurons and 37% of non-neuronal cells in the brain (Fig. 2C).

Regionally, the telencephalon of the infected case showed a loss of 29% in the number of cells. The infected case had 40% fewer neurons than the control case (6.64 and 11.02 billion, respectively). The number of non-neuronal cells showed a reduction of 14%. In the cerebellum, the total amount of cells in the control was 12.95 billion, and only 8.55 in the congenital syphilis case, a reduction of 34%. The number of neurons decreased 20% (6.04 billion in the congenital syphilis case vs 7.54 billion in the control case), and the number of non-neurons decreased 54% (Fig. 2C).

Congenital syphilis is part of the TORCH complex of perinatal infectious diseases, with potential risk to the fetus. TORCH infections classically include (T)oxoplasmosis, (R)ubella, (C)ytomegalovirus, (H)erpes virus, and other infectious diseases such as Syphilis, Zika and hepatitis virus, HIV and Varicella (11, 12). Evidence suggests that the neural progenitors are directly affected by the TORCH complex of diseases that lead to malformations in the cerebral cortex, such as microcephaly, mainly by interrupting the generation of neural cells (13). Most studies exploring the impact on neuronal progeny have been performed for Zika virus, *T. gondii*, Herpes, Rubella and Cytomegalovirus infections, but few comparable studies have addressed *T. pallidum*. The possible impact of these infections on neural stem cells might explain the reduction of neuronal and glial cells, despite the regional histochemical findings that revealed an increase in microglia and astrocytes. Oligodendrocytes, the most abundant type of glial cell, were not explored. A possible influence of neonatal hypoxia cannot be entirely excluded, but this possibility was considered unlikely both because the newborns died shortly after birth and because neonatal hypoxia would likely have impacted both cases equally.

A significant reduction of neuronal and non-neuronal cells was also observed in the telencephalon. The immunohistochemistry results showed fusion and disorganization of the cortex (polymicrogyria), both focally associated with periventricular calcification, suggesting intrauterine hypoxia, most likely due to placental infection, a possible secondary cause for the loss of cells.

Regionally, the percent reduction of neurons in the cerebellum was less than that for the telencephalon (20% and 40%, respectively). The cerebellum develops later than the cerebral cortex, and cerebellar neurogenesis continues after birth. Around 85% of cerebellar granule cells (the most numerous neurons in this region), are generated mainly in the first year of life (14). Hence, the final impact of congenital syphilis infection on reducing cerebellar neurons must be investigated at later ages.

To the best of our knowledge, this is the first study to compare the absolute numbers of neuronal and non-neuronal cells in the brain between a newborn with congenital syphilis and a control case of the same gestational age. It reveals a pronounced loss of cells—neurons and non-neurons—in the brain as a whole, the telencephalon and the cerebellum, in particular.

FUNDING

This work was funded by Brazilian National Research Council (CNPq No. 402990/2016-1), Rio de Janeiro Foundation for the Support of Science (FAPERJ Nos. E-26/203.024/2015 and E-26/202.892/2018), and the National Institute of Translational Neuroscience (INNT No. 303883/2021-9).

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no duality or conflicts of interest to declare.

DATA AVAILABILITY

All original data will be made available upon reasonable request.

REFERENCES

1. Stamm LV. Syphilis: Re-emergence of an old foe. *Microb Cell* 2016;3:363–70
2. World Health Organization (WHO). *Report on Global Sexually Transmitted Infection Surveillance*; 2018. Available at: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/277258/9789241565691-eng.pdf?ua=1>
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Sexually Transmitted Disease Surveillance* 2020. Available at: <https://www.cdc.gov/std/statistics/2020/overview.htm#Syphilis>
4. Ministério da Saúde. *Boletim Epidemiológico de Sífilis - Número Especial | Out. 2022; 2022*. Available at: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2022/boletim-epidemiologico-de-sifilis-numero-especial-out-2022/view>
5. Keuning MW, Kamp GA, Schonenberg-Meinema D, et al. Congenital syphilis, the great imitator—Case report and review. *Lancet Infect Dis* 2020;20:e173–9
6. Herber S, Silva AA, Sanserverino MV, et al. Prevalence and causes of congenital microcephaly in the absence of a Zika virus outbreak in southern Brazil. *J Pediatr (Rio J)* 2019;95:600–6
7. Arnold SR, Ford-Jones EL. Congenital syphilis: A guide to diagnosis and management. *Paediatr Child Health* 2000;5:463–9
8. Herculano-Houzel S, Lent R. Isotropic fractionator: A simple, rapid method for the quantification of total cell and neuron numbers in the brain. *J Neurosci* 2005;25:2518–21
9. Azevedo FAC, Carvalho LRB, Grinberg LT, et al. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol* 2009;513:532–41
10. Azevedo FAC, Andrade-Moraes CH, Curado MR, et al. Automatic isotropic fractionation for large-scale quantitative cell analysis of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 2013;212:72–8
11. Neu N, Duchon J, Zachariah P. TORCH infections. *Clin Perinatol* 2015;42:77–103, viii
12. Schwartz DA. The origins and emergence of Zika virus, the newest TORCH infection: What's old is new again. *Arch Pathol Lab Med* 2017;141:18–25
13. Marcos AC, Siqueira M, Alvarez-Rosa L, et al. Toxoplasma gondii infection impairs radial glia differentiation and its potential to modulate brain microvascular endothelial cell function in the cerebral cortex. *Microvasc Res* 2020;131:104024
14. Kiessling MC, Büttner A, Butti C, et al. Cerebellar granule cells are generated postnatally in humans. *Brain Struct Funct* 2014;219:1271–86