

PUCRS

ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA MÉDICA
INSTITUTO DO CÉREBRO

FERNANDA MAJOLO

**CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS (iPSCs) DE INDIVÍDUOS COM
DISPLASIA CORTICAL FOCAL DO TIPO TAYLOR: BUSCANDO A COMPREENSÃO DA
PATOGÊNESE DURANTE O PROCESSO DE NEURODIFERENCIAÇÃO**

Porto Alegre
2018

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

FERNANDA MAJOLO

**CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS (iPSCs) DE INDIVÍDUOS
COM DISPLASIA CORTICAL FOCAL DO TIPO TAYLOR: BUSCANDO A
COMPREENSÃO DA PATOGÊNESE DURANTE O PROCESSO DE
NEURODIFERENCIAÇÃO**

Tese defendida como requisito para obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof. Dra. Denise Cantarelli Machado

Porto Alegre
2018

Ficha Catalográfica

M234c Majolo, Fernanda

Células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) de indivíduos com Displasia Cortical Focal do tipo Taylor : buscando a compreensão da patogênese durante o processo de neurodiferenciação / Fernanda Majolo . – 2018.

174 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado.

1. iPSCs. 2. Displasia Cortical Focal do tipo Taylor. 3. Patogênese. I. Machado, Denise Cantarelli. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecário responsável: Marcelo Votto Teixeira CRB-10/1974

Agradecimentos

Começo a agradecer à minha orientadora, Dra. Denise Cantarelli Machado que me ensinou muito ao longo destes quatro anos de pesquisa, corrigiu inúmeros trabalhos, além desta tese, e sempre estimulou os contatos e experiências com outros pesquisadores e instituições. Tenho orgulho de fazer parte do seu grupo de pesquisa, juntamente com o Dr. Douglas Kazutoshi Sato.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, pela possibilidade de integrar o grupo de alunos e aprender com seus professores. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa integral de estudos, assim como o financiamento dos estudos na University of Michigan.

Agradeço ao meu grande amigo e super orientador não oficial Daniel Rodrigo Marinowic, por me apresentar as fantásticas células iPSCs. Elas dão trabalho, mas é recompensador.

Às queridas amigas, colegas e amigos/as do grupo de pesquisa que o doutorado me presenteou. Agradeço pelos momentos de aprendizagem, de confraternização e por me ajudarem em diversos momentos.

Ao Dr. Vinícius Duval e à equipe do Programa de Cirurgia da Epilepsia em especial ao Dr. André Palmi, e ao Dr. Milton Paulo de Oliveira, pelo acesso a matéria basal dos experimentos.

Ao meu orientador no exterior, Dr. Jack M. Parent, pela atenção dedicada tanto antes da viagem quanto pela carinhosa acolhida durante meu estágio na University of Michigan, pelas oportunidades de aprendizagens e compartilhamento de experiências.

Agradeço ao meu marido, Guilherme, que com toda a atenção esteve disposto para a leitura, sugestões e correções deste trabalho. Também agradeço ao meu irmão Mariano, que me aguentou durante todo o Mestrado e Doutorado, dividindo o apartamento comigo. Finalmente, e não menos importante, quero agradecer aos meus pais, pelos conselhos e apoio nas minhas escolhas.

RESUMO

As Malformações do Desenvolvimento Cortical (MDC) reúnem uma ampla gama de patologias do Sistema Nervoso Central (SNC) relacionadas a um complexo processo de formação do córtex. A Displasia Cortical Focal (DCF), tipo comum de MDC, é relatada como a lesão cerebral estrutural mais frequente encontrada em crianças com epilepsia refratária ao tratamento medicamentoso submetidas à cirurgia. O tratamento cirúrgico, com a ressecção completa da lesão displásica, é capaz de cessar a convulsão resistente a drogas antiepiléticas, melhorando a qualidade de vida do indivíduo e diminuindo a morbidade. A DCF é caracterizada por múltiplos tipos de alterações tanto na arquitetura cortical quanto em anormalidades citológicas e sua patogênese ainda é desconhecida. Em 2004, Palmini e colaboradores classificaram as DCF de acordo com observações na substância branca e na arquitetura da camada cortical. A DCF do tipo Taylor é caracterizada por uma desorganização laminar e neurônios displásicos, comprometendo a organização do córtex em seis camadas histológicas tradicionalmente conhecidas. A compreensão dos mecanismos de ação das doenças neurológicas tem envolvido o uso de modelos animais. Porém, no caso do desenvolvimento cerebral das síndromes epiléticas muitas décadas de estudo não conseguiram fornecer uma visão conclusiva sobre seus mecanismos. Modelar doenças neurológicas é especialmente atraente para aplicação das células pluripotentes induzidas (iPSCs), possibilitando derivar neurônios específicos do próprio paciente para estudos *in vitro*, contribuindo para a investigação da doença. O objetivo do presente estudo foi investigar as possíveis diferenças na neurogênese e neurodiferenciação de iPSCs a partir de fibroblastos de indivíduos acometidos pela DCF do tipo Taylor e indivíduos normais. As iPSCs foram geradas a partir de fibroblastos de pele de dois indivíduos displásicos e dois indivíduos saudáveis, para compor o grupo controle. A reprogramação se deu através da exposição dos fibroblastos a vetores virais contendo os genes *OCT4*, *KLF4*, *SOX2*, e *c-MYC* e os clones gerados foram caracterizados por imunohistoquímica. As células iPSCs foram neurodiferenciadas e analisadas nos períodos de 14, 22 e 35 dias. Também foram analisados o tecido cerebral, fibroblastos e células iPSCs dos indivíduos. Através de qRT-PCR, a expressão de 14 genes envolvidos no processo de neurodiferenciação foram quantificados. Estes genes estão associados a migração e diferenciação neural,

aspectos sinápticos e sinalização Notch. Ambos os indivíduos foram diagnosticados com DCF do tipo Taylor, mais especificadamente, do tipo IIb. No geral, os indivíduos displásicos apresentaram alterações na quantificação relativa na maioria dos genes analisados comparados aos indivíduos controle, em todos os processos e grupos de estudo (fibroblastos, tecido cerebral, iPSCs e células neurodiferenciadas). Os genes envolvidos nos processos de migração e diferenciação neural, aspectos sinápticos e sinalização Notch apresentaram expressões bastante alteradas nos indivíduos displásicos, com o início da maioria dos processos precoces, antes do período fisiologicamente típico. A partir dos resultados encontrados, podemos inferir que durante o período embrionário, no processo de neurogênese e neurodiferenciação, indivíduos acometidos pela doença, possivelmente possuem neuroblastos mais sensíveis a estímulos, apresentando diferenças no desenvolvimento do Sistema Nervoso. Essas alterações podem estar diretamente relacionadas com a formação do cérebro displásico. Este trabalho amplia a compreensão do neurodesenvolvimento embrionário, abrindo portas para futuras investigações de forma mais aprofundada sobre o envolvimento e influência de cada um dos genes analisados na patogênese da DCF, bem como em cada mecanismo de ação envolvido na formação do cérebro.

ABSTRACT

Malformations of cortical development (MDC) include a wide spectrum of Central Nervous System (CNS) disorders related to a complex process of cortex formation. Focal Cortical Dysplasia (FCD), a common type of MDC, is reported as the most frequent structural brain lesion found in children with refractory epilepsy to drug treatment undergoing surgery. Surgical treatment, with complete resection of the dysplastic lesion, is able to stop the seizure resistant to antiepileptic drugs, improving the individual's quality of life and reducing morbidity. FCD is characterized by multiple types of alterations both in cortical architecture and in cytologic abnormalities and its pathogenesis is still unknown. In 2004, Palmini et al. classified DCF according to white matter and cortical layer architecture. Taylor-type FCD is characterized by cortical laminar disorganization and dysplastic neurons, compromising the organization of the cortex into six-layered traditionally known. Understanding the mechanisms of action of neurological diseases has involved the use of animal models. However, in the case of brain development of epileptic syndromes, many decades of study have failed to provide a conclusive insight of their mechanisms. Modeling neurological diseases is especially attractive for the application of induced pluripotent stem cells (iPSCs), making possible to derive specific neurons for *in vitro* studies, contributing to the investigation of the disease. The aim of the present study was to investigate the possible differences in neurogenesis and neurodifferentiation of iPSCs from fibroblasts of individuals affected by Taylor-type FCD and normal individuals. iPSCs were generated from skin fibroblasts of two FCD individuals and two healthy individuals, to form the control group. The reprogramming was done through the fibroblasts exposure to viral vectors containing the *OCT4*, *KLF4*, *SOX2*, and *c-MYC* genes and the clones were characterized by immunohistochemistry. iPSCs were neurodifferentiated and analyzed at the 14th, 22nd and 35th days. We also analyzed the brain tissue, fibroblasts and iPSCs cells from the individuals. Through qRT-PCR, the expression of 14 genes involved in the neurodifferentiation process were quantified. These genes are associated to neural migration and differentiation, synaptic aspects and Notch signaling. Both individuals were diagnosed with Taylor-type FCD, more specifically, type IIb. In general, individuals with dysplasia presented alterations in the relative quantification in the most genes analyzed compared to control individuals in all processes and study groups (fibroblasts, brain tissue, iPSCs

and neurodifferentiated cells). The genes involved in the neural migration and differentiation processes, as well as synaptic aspects and Notch signaling presented quite altered expressions in dysplastic individuals, with the beginning of the majority processes early, before the physiologically typical period. From the found results, we can infer that during the embryonic period, in the neurogenesis and neurodifferentiation process, individuals affected by the disease, possibly presents neuroblasts more sensitive to stimulus, presenting differences in the development of the Nervous System. These changes may be directly related to dysplastic brain development. This work extends the understanding of embryonic neurodevelopment, open up opportunities to further investigations of the involvement and influence of each genes analyzed in the pathogenesis of FCD, as well as in each mechanism of action involved in the brain development.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrativo da classificação de Palmيني	21
Figura 2. Fotomicrografia de um corte histológico do córtex cerebral	22
Figura 3. Peça cerebral com foco displásico e córtex esbranquiçado	22
Figura 4. Fotomicrografia de cortes histológicos de neocórtex corado com cresil violeta	23
Figura 5. Fotomicrografia de um corte histológico do córtex	23
Figura 6. Fotomicrografia de um corte histológico com neurônios dismórficos corados com Cresil violeta	24
Figura 7. Etapas de desenvolvimento do Sistema Nervoso Central	25
Figura 8. Representação simplificada da complexidade biológica celular do cérebro <i>in vivo</i> em desenvolvimento	26
Figura 9. Diagrama esquemático da geração de subtipos neuronais nas diferentes camadas corticais durante a neurogênese embrionária	26
Figura 10. Diagrama esquemático da aplicação das células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) na medicina regenerativa e na modelagem de doenças	29
Figura 11. Diagrama esquemático da diferenciação celular a partir de iPSCs humanas.....	31
Figura 12. Diagrama esquemático da reprogramação celular com o vetor do vírus SeV	32
Figura 13. Diagrama esquemático desde a coleta de amostra de pele humana até o teste para verificação de possível contaminação por <i>Mycoplasma spp.</i> nas células	35
Figura 14. Diagrama esquemático das etapas para geração de células iPSCs	38
Figura 15. Fotomicrografia de um corte histológico do córtex cerebral do Indiv. 01.	44
Figura 16. Eletroencefalograma do Indiv. 01	45
Figura 17. Fotomicrografia de um corte histológico do córtex cerebral do Indiv. 02.	46
Figura 18. Eletroencefalograma do Indiv. 02	47
Figura 19. Captura de imagem de clone de iPSCs	48
Figura 20. Captura de imagem da caracterização das iPSCs através de microscopia confocal	48

Figura 21. Captura de imagens das células iPSCs após protocolo de neurodiferenciação por 22 dias e marcação por imunofluorescência.....	49
Figura 22. Captura de imagem das células iPSCs após 36 dias de indução a neurodiferenciação	49
Figura 23. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene <i>ASCL1</i> e todos os grupos do estudo	50
Figura 24. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene <i>ASCL1</i> durante a neurodiferenciação das iPSCs	51
Figura 25. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene <i>NOTCH1</i> e todos os grupos do estudo.....	52
Figura 26. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene <i>NOTCH1</i> durante a neurodiferenciação das iPSCs.....	52
Figura 27. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene <i>HES1</i> e todos os grupos do estudo	53
Figura 28. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene <i>HES1</i> durante a neurodiferenciação das iPSCs	54
Figura 29. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene <i>NEUROG2</i> e todos os grupos do estudo.....	55
Figura 30. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene <i>NEUROG2</i> durante a neurodiferenciação das iPSCs.....	55
Figura 31. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene <i>DCX</i> e todos os grupos do estudo	56
Figura 32. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene <i>DCX</i> durante a neurodiferenciação das iPSCs	56
Figura 33. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene <i>DLG4</i> e todos os grupos do estudo	58
Figura 34. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene <i>DLG4</i> durante a neurodiferenciação das iPSCs	58
Figura 35. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene <i>FGF2</i> e todos os grupos do estudo	59
Figura 36. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene <i>FGF2</i> durante a neurodiferenciação das iPSCs	60
Figura 37. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene <i>HEY1</i> e todos os grupos do estudo	61

Figura 38. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene <i>HEY1</i> durante a neurodiferenciação das iPSCs	61
Figura 39. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene <i>NEUROD6</i> e todos os grupos do estudo	62
Figura 40. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene <i>NEUROD6</i> durante a neurodiferenciação das iPSCs.....	63
Figura 41. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene <i>NFL</i> e todos os grupos do estudo	64
Figura 42. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene <i>NFL</i> durante a neurodiferenciação das iPSCs	64
Figura 43. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene <i>NRCAM</i> e todos os grupos do estudo	65
Figura 44. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene <i>NRCAM</i> durante a neurodiferenciação das iPSCs	66
Figura 45. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene <i>PAX5</i> e todos os grupos do estudo	67
Figura 46. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene <i>PAX5</i> durante a neurodiferenciação das iPSCs	68
Figura 47. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene <i>STX1A</i> e todos os grupos do estudo	69
Figura 48. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene <i>STX1A</i> durante a neurodiferenciação das iPSCs	69
Figura 49. Visão interna do Biomedical Sciences Research Building (BSRB)	97
Figura 50. Biomedical Sciences Research Building (BSRB)	98
Figura 51. Biorreator SpinΩ utilizado em nossas pesquisas	99
Figura 52. Biorreator proposto por Lancaster 2014	100
Figura 53. Organóides cerebrais desenvolvidos a partir de iPSCs de indivíduos acometidos pela Síndrome de Pretzel. Da esquerda para a direita: com 10, 14, 22, 39 e 45 dias	101
Figura 54. À esquerda, organóides cerebrais de indivíduos acometidos pela Síndrome de Pretzel com 14 dias no SpinΩ e à direita, organóides cerebrais com 60 dias	101
Figura 55. Montagem das lâminas histológicas a partir dos organóides crebrais de indivíduo acometidos pela Síndrome de Pretzel	102

Figura 56. Imunohistologia realizadas dos organóides cerebrais de indivíduos acometidos pela Síndrome de Pretzel com 56 dias..... 103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Achados neuropatológicos em crianças submetidas à cirurgia de epilepsia (<16 anos)	19
Tabela 2. Anticorpos utilizados no estudo	38
Tabela 3. Padrões de expressão temporal de marcadores durante a neurogênese e neurodiferenciação	41
Tabela 4. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores empregados na PCR em tempo real e gene constitutivo	43
Tabela 5. Características clínicas e laboratoriais dos indivíduos com Displasia Cortical Focal do tipo Taylor	47

LISTA DE ABREVIATURAS

- AKT ou PKB – via de sinalização Proteína kinase B
- ASCL1* – do inglês *Achaete-scute family bHLH transcription factor 1*
- B27 – Suplementação para cultura de neurônios
- BDNF - Fator neurotrófico derivado de cérebro (do inglês Brain Derived Neurotropic Factor)
- cDNA – DNA complementar a um RNA
- CG - Células gliais
- CO₂ – Gás Carbônico
- CP - Placa cortical nascente
- CRISPR - do inglês Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
- CTE - Células-tronco embrionárias
- DAPI – Corante nuclear (do inglês 4',6-diamidino-2-phenilindol)
- DCF - Displasia Cortical Focal
- DCFT - Displasia Cortical Focal do tipo Taylor
- DCX* - do inglês *Doublecortin*
- DLG4* - do inglês *Discs, large homolog 4 (Drosophila)*
- DMEM – Meio de cultura de células (do inglês Dulbecco's Modified Eagle Medium)
- DNAse – Enzima que degrada Ácido Desoxirribonucleico (do inglês Deoxyribonucleic Acid)
- DPBS – Tampão salina (do inglês Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)
- EEBB - Banco Europeu de Epilepsia
- EEG – Eletroencefalograma
- EH - Esclerose hipocampal
- FGF – Fator de Crescimento de Fibroblastos (do inglês Fibroblast Growth Factor)
- FGF2* - do inglês *Fibroblast growth factor 2*
- FITC – Isotocinato Fluoresceína
- GR - Glia radial
- HES1* - do inglês *Hes family bHLH transcription factor 1*
- HEY1* - do inglês *Hes-related family bHLH transcription factor with YRPW motif 1*
- iPSCs – Células-Tronco Pluripotentes Induzidas (do inglês: Induced Pluripotent Stem Cell)
- iROCK – Inibidor de ROCK quinase

KSR – Soro para suplementação de meio de cultura (do inglês Knockout Serum Replacement)

LEAT - Tumores associados a epilepsia a longo prazo

MOI – Multiplicidade de Infecção (do inglês Multiplicity of Infection)

mTOR – via de sinalização (do inglês: Mammalian Target Rapamycin)

N5 – Meio de cultura para neurônios (do inglês Neurobasal Medium)

NE - Células neuroepiteliais

NeuN – Anti-núcleo neuronal (do inglês Neuronal Nuclear Antigen)

NEUROD6 - do inglês *Neuronal differentiation 6*

NEUROG2 - do inglês *Neurogenin 2*

NF-kB – Fator Nuclear Kappa B (do inglês Factor Nuclear Kappa B)

NFL - do inglês *Neurofilament light chain*

NRCAM - do inglês *Neuronal cell adhesion molecule*

PAX5 - do inglês *Paired box 5*

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês Polymerase Chain Reaction)

PI3K - via de sinalização Fosfoinosidido-3-kinase (do inglês phosphoinositide-3-dependent kinase)

PUCRS – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

RG - Glia radial

RM - Ressonância Magnética

RNA - Ácido Ribonucleico (do inglês Ribonucleic Acid)

SCNT - Transferência Nuclear de Células Somáticas (do inglês: Somatic Cell Nuclear Transfer)

SeV – Virus SENDAI (do inglês Sendai Virus)

SFB – Soro Fetal Bovino

SN – Sistema Nervoso

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

STX1A - do inglês *Syntaxin 1A*

WNT - Via de sinalização do inglês Wingless/integrated

ZSV - Zona subventricular

ZV - Zona ventricular

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	19
1.1. MALFORMAÇÕES DO DESENVOLVIMENTO CORTICAL (MDC)	19
1.2. DISPLASIA CORTICAL FOCAL (DCF)	19
1.2.1. Classificação das DCFs	20
1.2.2. Displasia Cortical Focal do tipo Taylor (DCFT)	21
1.2.3. Gênese da Displasia Cortical Focal (DCF).....	24
1.3. MARCADORES DA NEURODIFERENCIAÇÃO	28
1.4. CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS (iPSCs).....	28
1.4.1. Reprogramação de células diferenciadas em iPSCs	30
2. OBJETIVO	33
2.1. OBJETIVO GERAL	33
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3. METODOLOGIA	34
3.1. ASPECTOS ÉTICOS	34
3.2. AMOSTRA DE PELE HUMANA.....	34
3.3. OBTENÇÕES DE FIBROBLASTOS	35
3.4. TESTE DE CONTAMINAÇÃO PARA <i>MYCOPLASMA</i>	36
3.5. ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO DISPLÁSICO	36
3.6. GERAÇÃO DE iPSCs DOS FIBROBLASTOS DE PELE HUMANA (iPSCs) .	36
3.7. NEURODIFERENCIAÇÃO DAS iPSCs.....	39
3.8. AVALIAÇÃO DA NEURODIFERENCIAÇÃO POR IMUNOFLORESCÊNCIA	39
3.9. ANÁLISE MOLECULAR ATRAVÉS DE qRT-PCR.....	40
4. RESULTADOS.....	44
4.1. INDIVÍDUOS PARTICIPANTES DO ESTUDO.....	44
4.2. OBTENÇÃO DOS FIBROBLASTOS DE PELE	46
4.3. REPROGRAMAÇÃO CELULAR	48
4.4. NEURODIFERENCIAÇÃO DAS iPSCs.....	49
4.5. ANÁLISE MOLECULAR.....	50
4.5.1. <i>ASCL1</i>	50
4.5.2. <i>NOTCH1</i>	51

4.5.3. <i>HES1</i>	53
4.5.4. <i>NEUROG2</i>	54
4.5.5. <i>DCX</i>	56
4.5.6. <i>DLG4</i>	57
4.5.7. <i>FGF2</i>	59
4.5.8. <i>HEY1</i>	60
4.5.9. <i>NEUROD6</i>	62
4.5.10. <i>NFL</i>	63
4.5.11. <i>NRCAM</i>	65
4.5.12. <i>PAX5</i>	66
4.5.13. <i>STX1A</i>	68
5. DISCUSSÃO	70
6. CONCLUSÃO	101
CAPÍTULO II	
7. DOUTORADO-SANDUÍCHE: UNIVERSITY OF MICHIGAN	96
7.1. MONTAGEM SPINΩ.....	104
8. REFERÊNCIAS	105
ANEXOS	120
ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	120
ANEXO 2 - PROTOCOLO: SPINΩ FOREBRAIN ORGANIDS.....	124
ANEXO 3 - PEÇAS NECESSÁRIAS PARA A MONTAGEM DO SPINΩ	129
ANEXO 4 - APROVAÇÃO DO CEP.....	132
ANEXO 5 - ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO EM REVISTA INDEXADA	144
ANEXO 6 - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO	173

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1. MALFORMAÇÕES DO DESENVOLVIMENTO CORTICAL (MDC)

As Malformações do Desenvolvimento Cortical (MDC) reúnem uma ampla gama de patologias do Sistema Nervoso Central (SNC) relacionadas a um complexo processo de formação do córtex associadas à significativa morbidade neurológica, incluindo deficiência intelectual, epilepsia e disfunção motora (LEVENTER et al., 1999). Sua incidência na população permanece desconhecida por ser um grupo de anomalias composta por uma heterogeneidade de alterações, dificultando a obtenção de dados (GOLDEN, 2001). A lisencefalia, polimicrogiria, hemimegalencefalia (HME), complexo de esclerose tuberosa (TSC), diferentes formas da Displasia Cortical Focal (DCF) (ARONICA et al., 2012; BARKOVICH et al., 2012) são as diferentes anormalidades que compõem o espectro das MDC.

1.2. DISPLASIA CORTICAL FOCAL (DCF)

A DCF, tipo comum de MDC, provoca o início das crises comumente na infância (TASSI et al., 2001). Esta doença é relatada como a lesão cerebral estrutural mais frequente encontrada em crianças com epilepsia refratária ao tratamento medicamentoso submetidas à cirurgia (Tabela 1) (HARVEY et al., 2008; PALMINI et al., 2013). Sua incidência e prevalência atual na população é desconhecida (IFFLAND & CRINO, 2017).

Tabela 1 - Achados neuropatológicos em crianças submetidas à cirurgia de epilepsia (<16 anos).

Categoria	Números (%)	Idade OP¹	Início²	Duração³
MDC ⁴	395 (30,6)	7,6	2,1	5,4
LEAT ⁵	377 (29,3)	11,7	6,9	5,1
EH ⁶	194 (15)	12,6	4,3	8,9
Sem lesão	91 (7)	11,9	5,3	7,3
Patologia dupla	85 (6,6)	8,1	2,3	6,1
Cicatrizes gliais	76 (5,9)	9,7	3	7,2
Encefalite	41 (3,2)	9,1	6,5	4,1
Vascular	29 (2,3)	10,2	5,4	4,7

A cirurgia de epilepsia em crianças menores de 16 anos representou 24% da série total de casos do Banco Europeu de Epilepsia (1.288 crianças / 5.392 no total). Um total de 75,3% dos casos são representados pelo espectro de Displasia Cortical Focal. ¹Idade OP, idade

dos pacientes em cirurgia (em anos); ²Início, idade de início da atividade espontânea de convulsão (em anos) ³Duração, duração do transtorno convulsivo antes do tratamento cirúrgico (em anos); ⁴MDC, malformação do desenvolvimento cortical; ⁵LEAT, tumores associados a epilepsia a longo prazo; ⁶EH, esclerose hipocampal. Fonte: IFFLAND, P.H.; CRINO, P.B. Focal Cortical Dysplasia: Gene Mutations, Cell Signaling, and Therapeutic Implications. *Annu Rev Pathol Mech Dis*, v. 12, p. 547–71, 2017.

Apesar de ser o quadro mais comum, nem sempre as crises são resistentes aos fármacos (DEL GIUDICE et al., 2006). O tratamento cirúrgico, com a ressecção completa da lesão displásica, é capaz de cessar a convulsão resistente a drogas antiepilépticas causada pela DCF, visando a melhoria da qualidade de vida do indivíduo e a diminuição da morbidade (KRAL et al., 2007; FAUSER et al., 2015). O aprimoramento da ressecção cirúrgica foi beneficiado com o avanço da neuroimagem, aumentando a detecção de novos casos e delimitando a área displásica. Apesar do avanço, grande parte dos casos ainda é detectada no estudo anatomopatológico (PASCUAL-CASTROVIEJO et al., 2012).

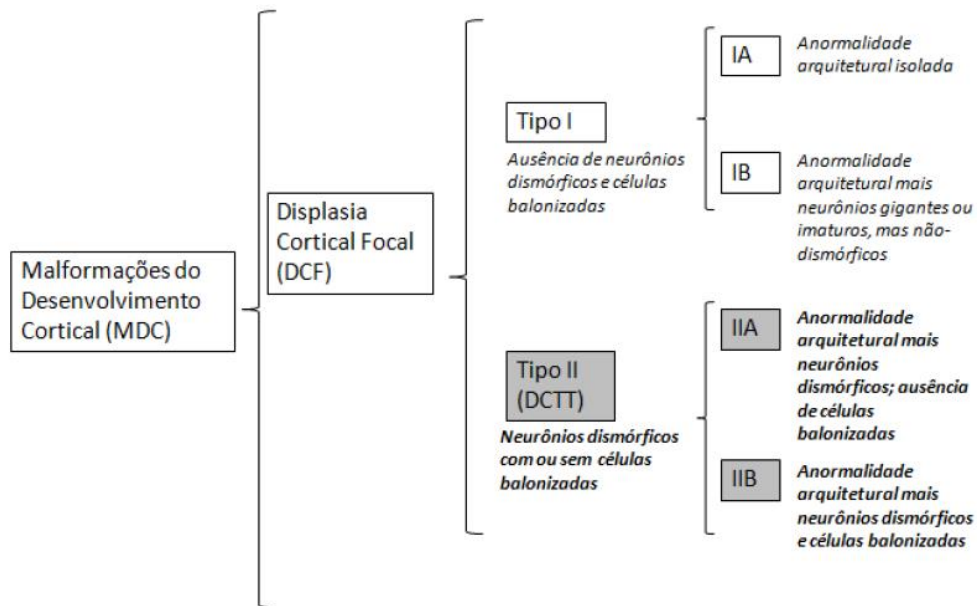
Na esperança de contribuir na identificação de novos alvos terapêuticos e compreender a sua fisiopatologia, esforços crescentes foram feitos para melhor definir os diferentes tipos de DCF. A DCF é formada por vários grupos heterogênicos de lesões corticais, englobando múltiplos tipos de alterações, divididas em dois principais tipos de anormalidades: (1) anormalidades da arquitetura cortical, onde há uma desorganização colunar, conferindo a formação de micro-colunas orientadas verticalmente, constituídas de, pelo menos, oito neurônios e, uma interrupção laminar pela alteração da composição da sexta camada tangencial do córtex; (2) anormalidades citológicas que apresentam células neuronais hipertróficas, fora do local anatômico, encontradas na camada V. Os neurônios imaturos se apresentam como células ovais ou redondas com grandes núcleos e membrana fina, normalmente ausente no córtex adulto. Os neurônios dismórficos são de tamanho anormal e morfologia de dendritos e axônio. Apresenta também acúmulo de proteínas de neurofilamentos. As células abalonadas possuem membrana mal definida com núcleo único ou múltiplos e citoplasma eosinofílico com características de células neuronais e linhagem glial (KABAT & KROL, 2012).

1.2.1. Classificação das DCFs

Taylor e colaboradores, em 1971, pela primeira vez introduziram o termo DCF para descrever anormalidades microscópicas identificadas em uma série de 10

indivíduos submetidos à cirurgia de epilepsia (TAYLOR et al., 1971). Diferentes sistemas de classificação para a DCF foram propostas. A classificação de Palmi e colaboradores (PALMINI et al., 2004) determina as DCF de acordo com observações na substância branca e na arquitetura da camada cortical, classificando a DCF em Tipo I e Tipo II (Figura 1).

Figura 1 - Esquema ilustrativo da classificação de Palmi.



Fonte: Palmi A, Najm I, Avanzini G, Babb T, Guerrini R, Foldvary-Schaefer N, et al. Terminology and classification of the cortical dysplasia. *Neurology*. 2004 Mar 23; 62 (6 supl 3): S2-8).

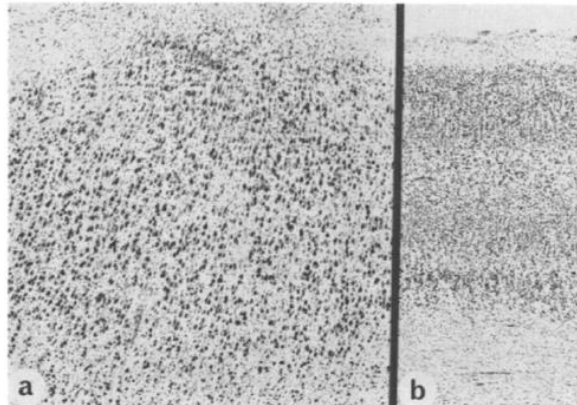
Em 2012, foi criada uma classificação que divide as DCF em três grupos baseada principalmente em achados histológicos, a qual é aceita pela Liga Internacional Contra a Epilepsia (BLÜMCKE et al., 2011). Esta classificação fornece evidências de diferenças na morfologia e expressão de proteínas confiáveis que diferenciam os subtipos da DCF. Apresenta uma associação entre as DCFs e outras lesões cerebrais, como tumores, esclerose do hipocampo, e malformações vasculares. Esta classificação é inteiramente descritiva e não considera as etiologias genéticas moleculares na DCF.

1.2.2. Displasia Cortical Focal do tipo Taylor (DCFT)

A DCF tipo II, também conhecida como DCF do tipo Taylor (DCFT), foi descrita pela primeira vez em 1971 como uma patologia distinta caracterizada por uma desorganização laminar e neurônios displásicos, comprometendo a

organização do córtex em seis camadas histológicas tradicionalmente conhecidas (Figura 2) (TAYLOR et al., 1971). A morfologia e/ou a localização das células podem estar alteradas na DCFT. Macroscopicamente, o córtex displásico, diferente do córtex normal, apresenta-se mais esbranquiçado, o qual pode ser devido à maior ocorrência de fibras gliais. Conseqüentemente, há perda de nitidez na transição entre as substâncias branca e cinzenta (Figura 3), característica macroscópica que auxilia na identificação tanto na peça anatômica, como também, no exame de imagem (OH et al., 2008).

Figura 2 - Fotomicrografia de um corte histológico do córtex cerebral. a) Desorganização laminar e presença de neurônios anômalos; b) Córtex normal em mesmo aumento.



Fonte: Taylor DC, Falconer MA, Bruton CJ, Corsellis JAN. Focal dysplasia of the cerebral cortex in epilepsy. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1971 Aug; 34(4): 369-87.

Figura 3 – Peça cerebral com foco displásico e córtex esbranquiçado (esquerda), levando à perda da diferenciação entre substância branca e cinzenta na região acometida.

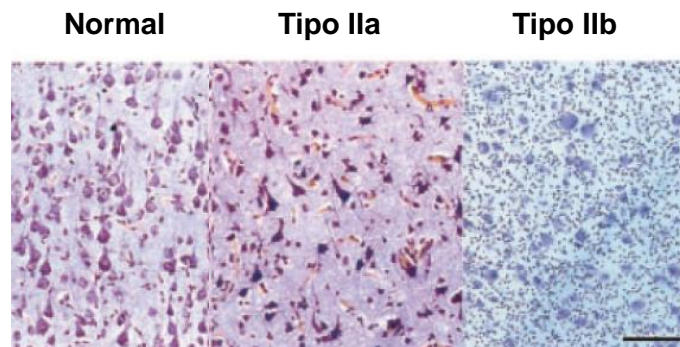


Fonte: Site didático de Anatomia Patológica, Neuropatologia e Neuroimagem. Disponível em: <http://anatpat.unicamp.br/>. Acessado em 27 de outubro de 2016.

Tanto na DCF tipo IIa como na IIb há presença de neurônios dismórficos. Já as células abalonadas, ou seja, células anormais de membrana fina, núcleo(s) excêntrico(s), citoplasma abundante, eosinofílico e homogêneo, são exclusivas do tipo IIb. A Figura 4 mostra as anormalidades citológicas específicas das áreas de dislaminação cortical.

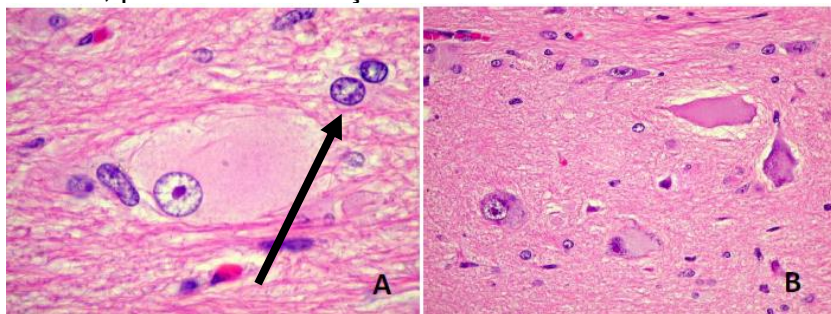
No menor aumento, é possível observar uma desorganização laminar cortical na área displásica, com muitas células abalonadas de tamanho aumentado na transição córtex-substância branca (Figura 5) (TASSI et al., 2002). A DCFT apresenta alterações tanto nas células gliais como nos neurônios. Os neurônios dismórficos são caracterizados por apresentar orientação anormal, alteração do formato piramidal refletindo anormalidade do citoesqueleto e aumento de tamanho (Figura 6) (PALMINI et al., 2004).

Figura 4 - Fotomicrografia de cortes histológicos de neocórtex corado com cresil violeta.



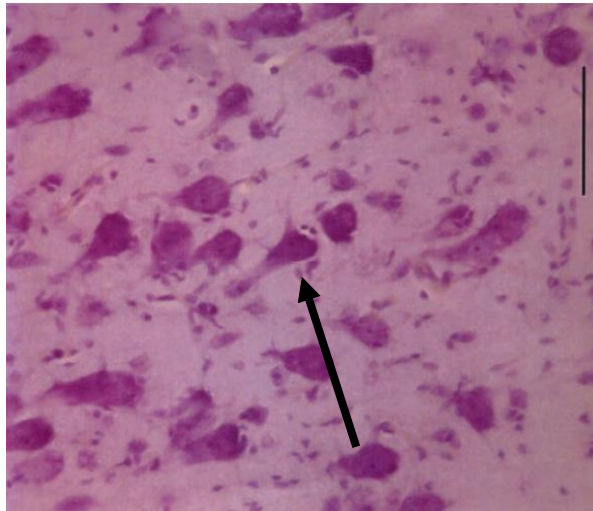
Fonte: Palmiini A, Najm I, Avanzini G, Babb T, et al. Terminology and classification of the cortical dysplasia. *Neurology*. 2004 Mar 23; 62 (6 supl 3): S2-8.

Figura 5 – Fotomicrografia de um corte histológico do córtex. a) Célula abalonada em detalhe; b) células abalonadas em menor aumento nas camadas corticais inferiores, próximo à transição córtex-substância branca.



Fonte: Site didático de Anatomia Patológica. Disponível em: <http://anatpat.unicamp.br>. Acessado em 27 de outubro de 2016.

Figura 6 - Fotomicrografia de um corte histológico com neurônios dismórficos corados com Cresil violeta. Destaque para as direções variadas dos neurônios.



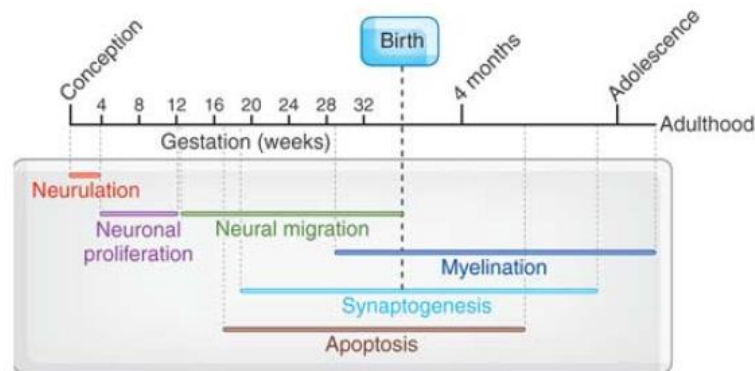
Fonte: Palmini A, Najm I, Avanzini G, Babb T, Guerrini R, Foldvary-Schaefer N, et al. Terminology and classification of the cortical dysplasia. *Neurology*. 2004 Mar 23; 62 (6 supl 3): S2-8.

1.2.3. Gênese da Displasia Cortical Focal (DCF)

O cérebro humano representa um dos, ou o mais complexo órgão produzido durante o desenvolvimento embrionário em todo o reino animal, tanto estrutural como funcionalmente (KELAVA, et al., 2016). Bilhões de neurônios e células gliais formam um elaborado circuito neuronal no indivíduo adulto durante o desenvolvimento embrionário e fetal (MALIK et al., 2013).

Certas anomalias do neurodesenvolvimento podem ser atribuídas aos estágios de citogênese e histogênese. Estas anomalias podem ocorrer durante a formação do neuroblasto, migração celular, organização cortical, diferenciação neuronal, formação de conectividade e morte celular no primeiro trimestre de gestação ou no crescimento e diferenciação, que ocorrem no segundo e terceiro trimestres de gestação (Figura 7) (WICHTERLE et al., 2001).

Figura 7 - Etapas de desenvolvimento do Sistema Nervoso Central.

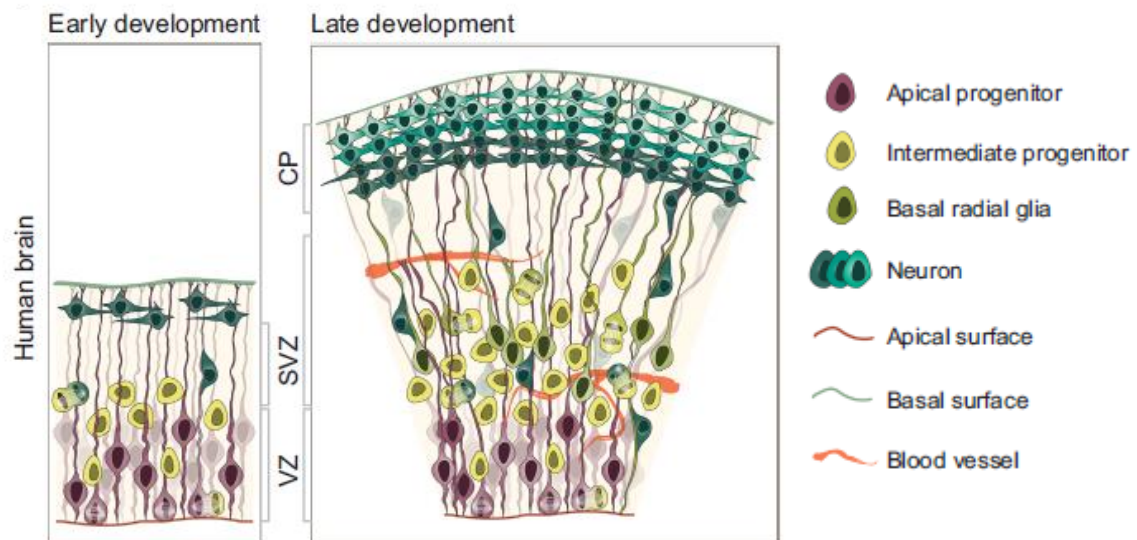


A partir do tubo neural começa o desenvolvimento do cérebro humano que se encontra povoado por células neuroepiteliais (NE), ou seja, células precursoras de todas as outras populações progenitoras (GÖTZ & HUTTNER, 2005). O tubo neural se desenvolve em ventrículos cerebrais, e a camada constituída por células NE está localizada na zona ventricular (ZV) (Figura 8) (TAVERNA & HUTTNER, 2010). Pouco antes do nascimento do primeiro neurônio, ou seja, antes da neurogênese, as células NE transformam-se em glia radial (GR) (GÖTZ & HUTTNER, 2005). Estas alternam seu modo de divisão de simétrico e proliferativo, para uma divisão simétrica e auto-renovadora (LANCASTER & KNOBLICH, 2012), embora ainda mantenha planos verticais de divisão (KOSODO et al., 2004).

No desenvolvimento humano, a neurogênese acontece relativamente cedo, entre a quinta e sexta semana de gestação (HOWARD et al., 2008). Os neurônios pós-mitóticos surgem na ZV adjacente aos ventrículos que então irão residir no córtex. É a partir da migração, ao longo das GRs, que se dá a formação das várias camadas do córtex cerebral. A grande maioria dos neurônios utiliza o arcabouço da GR para migrar, porém 1/3 deles migram de forma tangencial na direção cortical (RAKIC, 1978).

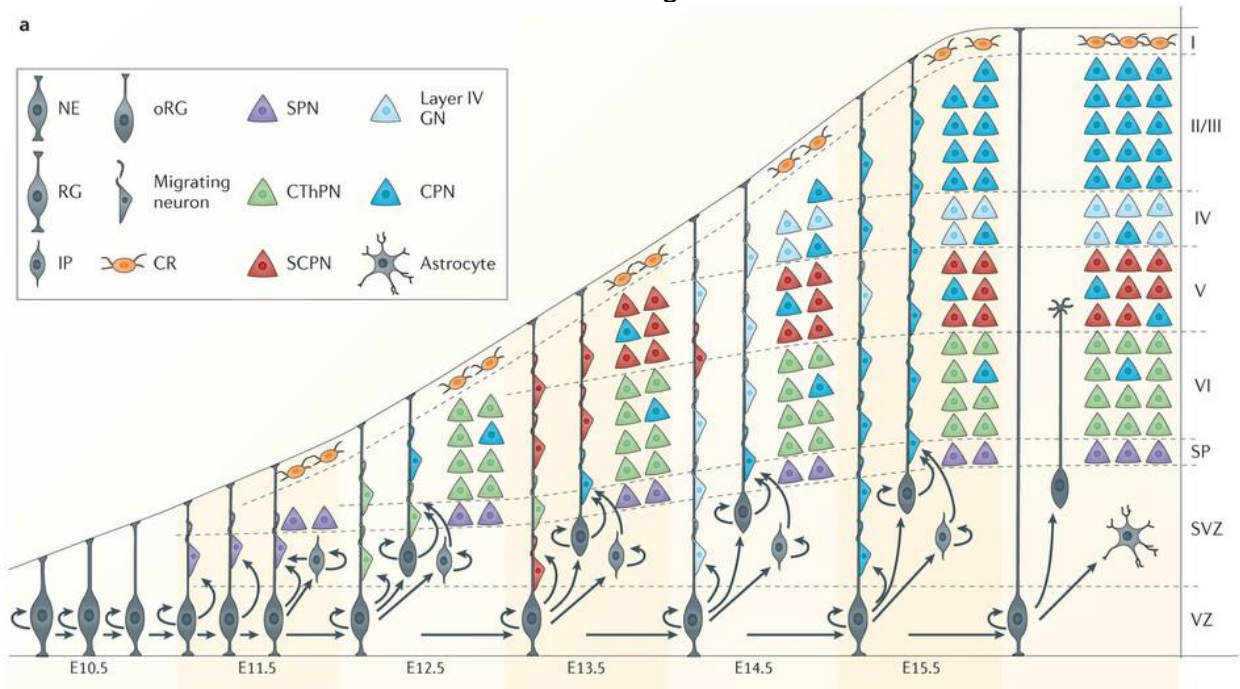
Os neurônios que estão migrando precisam passar pelos neurônios que já se encontram em posição no córtex, formando uma laminação, onde o neurônio recém-chegado a zona cortical, reside na superfície mais externa do córtex já formado (Figura 9). Ao final, a organização, em apenas seis camadas histologicamente distintas, compõe uma grande diversidade de subtipos neuronais, que servem como blocos para um eficiente circuito neural (GREIG et al., 2013).

Figura 8 - Representação simplificada da complexidade biológica celular do cérebro humano *in vivo* em desenvolvimento. À esquerda, estágios iniciais e complexidade do nível morfológico. À direita, fases posteriores mostrando o tamanho da parede cortical e a diversidade de progenitoras neuronais.



Fonte: Kelava I, Lancaster M A. Dishing out mini-brains: Current progress and future prospects in Brain organoid research. *Developmental Biology*. 2016; 199–209.

Figura 9 - Diagrama esquemático da geração de subtipos neuronais nas diferentes camadas corticais durante a neurogênese embrionária.



Na zona ventricular (ZV), a glia radial (RG) serve de arcabouço para os neurônios de projeção em torno de 11,5 dias do período embrionário (E11,5). Juntamente, são geradas células progenitoras intermediárias (IP) e outras células gliais (CG), estabelecendo a zona subventricular (ZSV), interferindo no aumento da produção neuronal. Após a neurogênese

estar completa, as células progenitoras neuronais passam para o modo gliogênico, gerando os astrócitos e oligodendrócitos. As células Cajal-Retzius migram principalmente da camada neocortical I. Outros neurônios, nascidos na zona ventricular (ZV) ou subventricular (ZSV), migram ao longo dos processos gliais para chegar aos seus destinos finais laminares. Fonte: Greig LC, et al. Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. Nature reviews Neuroscience.

Durante a corticogênese, vários genes podem estar associados ao fenótipo doente nas patologias associadas à alteração celular, porém em alguns casos os aparecimentos são esporádicos. Fatores ambientais como exposição materna durante o período gestacional a agentes como etanol, alguns ácidos, mercúrio, radiação e agentes virais também já foram associados a alterações no neurodesenvolvimento das MDC (GOLDEN, 2001).

A patogênese das MDC, em geral, é multifatorial uma vez que diversos fatores influenciam na corticogênese, como as mutações genéticas, injúrias pré e pós-natais (PASCUAL-CASTROVIEJO et al., 2012; SISODYA 2004). Entre as malformações corticais, incluindo as DCFs, um subconjunto de patologias tem sido associado principalmente a alterações na migração celular e neurodiferenciação. Segundo Rowland e colaboradores, a DCF resulta de um distúrbio precoce na migração e arranjo final da arquitetura cortical de neurônios imaturos, mas a patogênese dessas malformações ainda não foi totalmente esclarecida (ROWLAND et al., 2012).

As causas ainda desconhecidas da DCF provavelmente estão relacionadas a mutações somáticas clonais que afetam vias de sinalização semelhantes em determinados indivíduos (BLACKMON, 2015). HSU e colaboradores, verificaram um aumento na sinalização da via mTOR em indivíduos portadores de DCF com base nas moléculas fosforiladas como as proteínas ribossomais S6. Achado particularmente pertinente a DCF tipo IIb onde de 80% a 90% dos neurônios abalonados e neurônios gigantes presentes no córtex desses indivíduos apresentam um aumento na fosforilação dessas proteínas (HSU et al., 2011). Já ZHOU e colaboradores, em 2009, verificaram a ativação de moléculas relacionadas à fosforilação da via fosfoinositídeo-3-quinase (PI3K – do inglês *phosphoinositide-3-dependent kinase*) e da via proteína quinase B (AKT ou PKB) nos tecidos displásicos, em alguns casos de DCF (ZHOU et al., 2009). A fosforilação da via PI3K em resposta a algum estímulo, está relacionada a um conjunto coordenado de

eventos que controlam o crescimento celular, início do ciclo celular, migração e sobrevivência celular (CANTLEY, 2002).

1.3. MARCADORES DA NEURODIFERENCIAÇÃO

Células em condições normais ou em processo de neurodiferenciação possuem marcadores específicos. Na linhagem neuronal, o marcador, ou seja, uma molécula endógena, é expresso nas células durante a neurogênese e nas células diferenciadas como os neurônios, permitindo detectar neurônios em diferentes estágios (REDWINE & EVANS, 2002). Vários marcadores, dentre eles *ASCL1*, *DCX*, *DLG4*, *FGF2*, *HES1*, *HEY1*, *NEUROD6* e *NEUROG2*, são induzidos de forma ordenada e sequencial durante a neurogênese e neurodiferenciação. O gene *ASCL1*, por exemplo, é um fator proneural que controla múltiplos passos da neurogênese no cérebro embrionário, incluindo a divisão dos progenitores e a migração neuronal (GARCEZ et al., 2014).

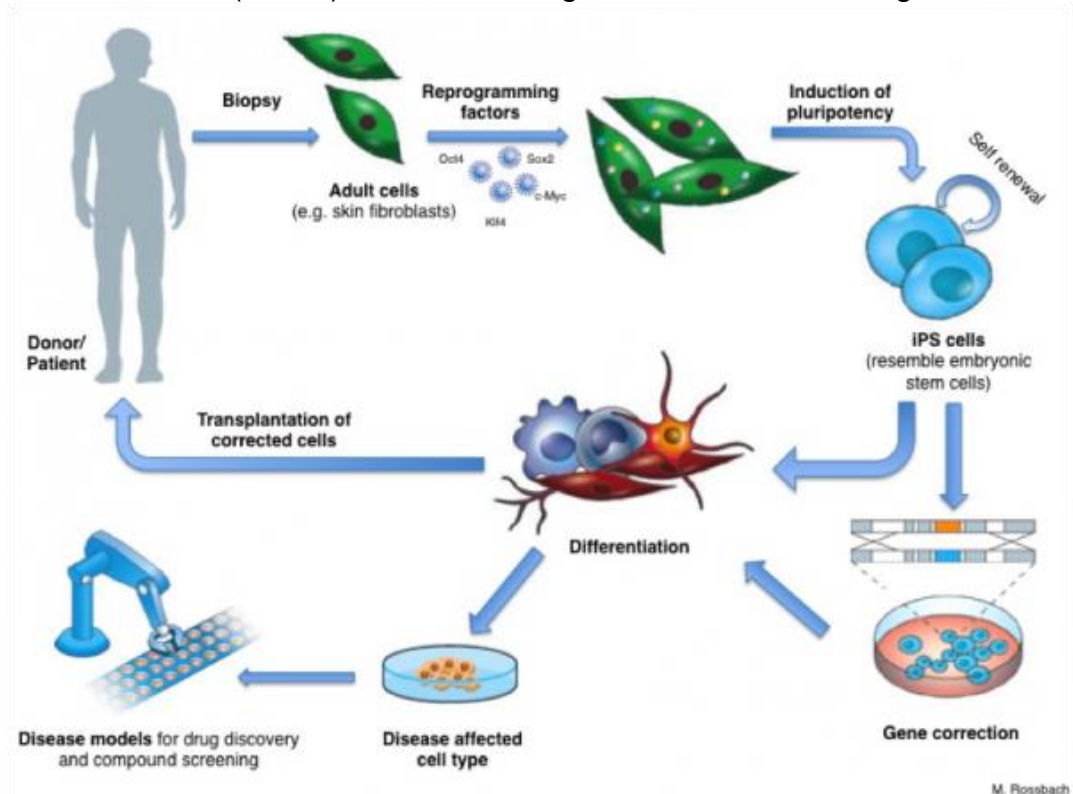
1.4. CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS (iPSCs)

Em 2006, os cientistas Kazutoshi Takahashi e Shinya Yamanaka fizeram algo inédito ao reprogramar células somáticas para um estado pluripotente novamente através da técnica de reprogramação de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). O advento rendeu a Yamanaka, juntamente com John B. Gurdon, o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 2012, apresentando uma mudança no paradigma referente à compreensão da diferenciação celular e da plasticidade de células diferenciadas. Os primeiros experimentos foram realizados em ratos e foram rapidamente seguidos pela geração de iPSCs humanas (TAKAHASHI et al., 2007; THOMSON et al., 1998).

Modelar doenças neurológicas é especialmente atraente para aplicação das iPSCs. Hoje já se tem diversos modelos de iPSCs a partir de indivíduos acometidos por diversas doenças (DIMOS et al., 2008; PARK et al., 2008), possibilitando derivar neurônios específicos para estudos *in vitro*, contribuindo para a investigação da doença (PASCA et al., 2014; PARENT & ANDERSON 2015; MARCHETTO et al., 2011; DOLMETSCH & GESCHWIND 2011). Até então, este feito era quase impossível durante a vida do indivíduo. A partir da identificação dos fenótipos a serem tratados, a tecnologia das iPSCs também pode ser aplicada na identificação de drogas potenciais e na medicina regenerativa (Figura 10). Estes modelos de

"*Disease in a dish*" fornecem a oportunidade única de compreender a progressão da patologia, pois a capacidade de neurodiferenciar células iPSCs permite estudar o desenvolvimento de células derivadas do indivíduo ao longo do tempo à medida que amadurecem e manifestam fenótipos de doença neurológica.

Figura 10 – Diagrama esquemático da aplicação das células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) na medicina regenerativa e na modelagem de doenças.



Fonte: Peitz M & Rossbach M. Life and Brain, Bonn. Disponível em: <http://www.eurostemcell.org/pt-pt/image/iPSCs-cells-derivation-and-applications> Acessado em: 28 de Novembro de 2016.

Tradicionalmente, a compreensão dos mecanismos de ação das doenças neurológicas tem envolvido o uso de modelos animais, tipicamente roedores e o uso de tecido *post mortem*. Porém, no caso do desenvolvimento cerebral das síndromes epiléticas, caracterizada pela presença de sinais e sintomas complexos, muitas décadas de estudo não conseguiram fornecer uma visão conclusiva sobre seus mecanismos. Já o tecido *post mortem*, além de ser de difícil obtenção, em geral, representam fases tardias da doença oferecendo informações limitadas.

Os modelos de iPSCs humanos a partir de doenças do SNC apresentam diferentes vantagens em relação aos modelos de roedores. Aproximadamente 20% dos genes do SNC mostram padrões de expressão cortical distinto entre humanos e

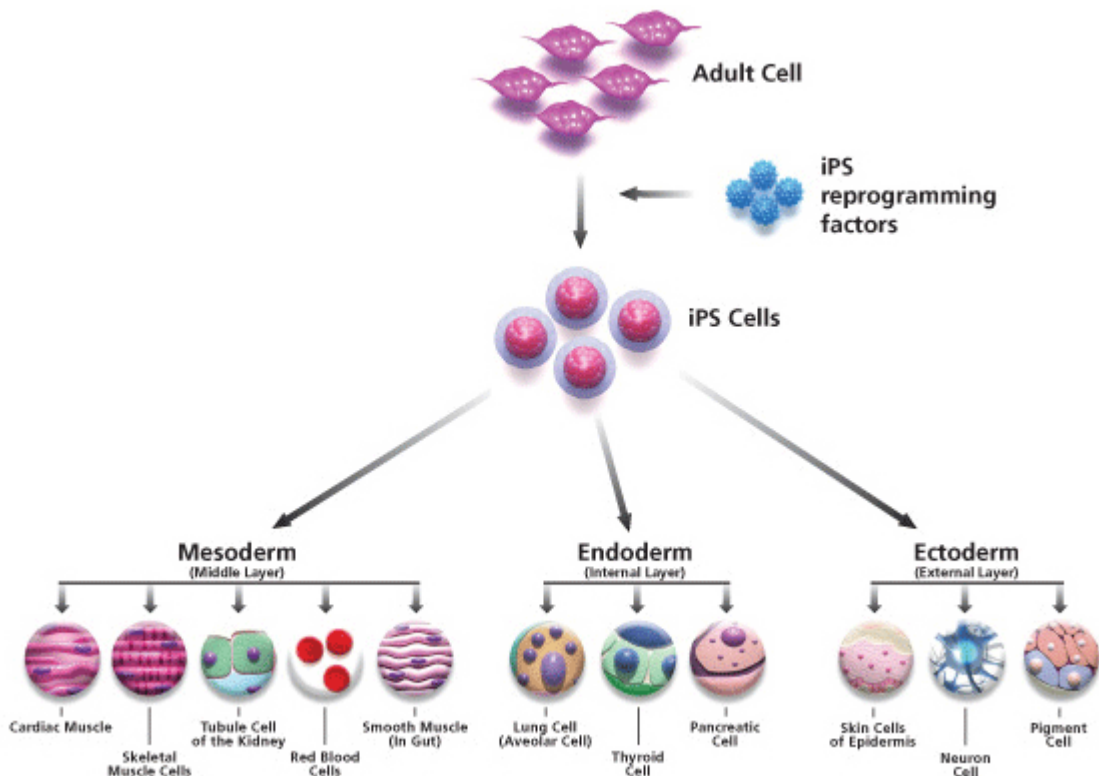
roedores (ZENG et al., 2012). Nas epilepsias, os modelos animais permanecem críticos para estudar os aspectos comportamentais e de rede dos distúrbios, já para estudar vias celulares e moleculares *in vitro* e para plataformas de rastreio de drogas de alto rendimento, as iPSCs estão rapidamente provando ser valiosas (DU & PARENT, 2015). Além disso, as iPSCs recapitulam o desenvolvimento embrionário prolongado dos neurônios no cérebro humano. Até à data, já foram geradas mais de 20 diferentes tipos de iPSCs a partir de distúrbios do SNC, desde o neurodesenvolvimento até doenças neurodegenerativas (MARCHETTO et al., 2011; SRIKANTH P & YOUNG-PEARSE et al., 2014).

1.4.1. Reprogramação de células diferenciadas em iPSCs

Dentre os diferentes métodos de reprogramação de células diferenciadas a nível pluripotente, existe a introdução e expressão forçada de fatores de transcrição específicos, por exemplo, OCT3/4, KLF4, SOX2 e C-MYC, em células somáticas. As células geradas pela transfecção são semelhantes às CTEs, apresentando as mesmas características de auto-renovação e potencial de diferenciação em linhagens dos três folhetos embrionários (Figura 11) (FRIES et al., 1994; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). Os fibroblastos dérmicos são a fonte primária de células somáticas mais utilizadas, embora também seja viável utilizar fontes menos invasivas como células hematopoiéticas ou células epiteliais de rim derivadas da urina (WANG et al., 2013; ZHOU et al., 2011).

Aproximadamente, de 3 a 5 semanas de cultura após a reprogramação, uma pequena fração das células somáticas iniciais (0,1 a 1%) é convertida em colônias de células-tronco pluripotentes que compartilham semelhanças notáveis com as CTEs humanas, obtendo-se uma fonte infinita de clones dos quais muitos tipos de células podem ser derivados (TAKAHASHI et al., 2007).

Figura 11 – Diagrama esquemático da diferenciação celular a partir de iPSCs humanas.



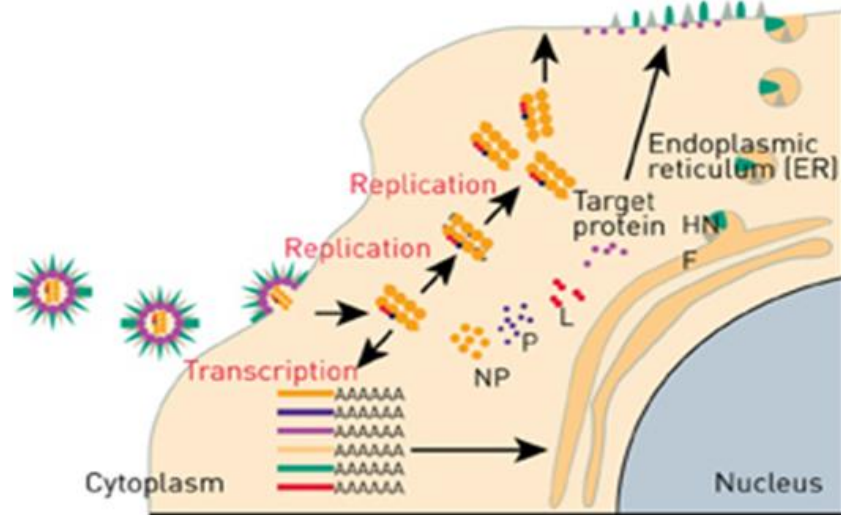
As iPSCs humanas têm a capacidade única de se diferenciar em qualquer tipo de célula do corpo, incluindo: *Mesoderma*: hematopoiéticas, células endoteliais, cardiomiócitos, células musculares lisas, células musculares esqueléticas, células renais, adipócitos, condrócitos e osteócitos. *Endoderma*: hepatócito, célula β -pancreática, célula epitelial intestinal, células alveolares de pulmão. *Ectodérmica*: neurônio, astrócito, oligodendrócito, epitélio pigmentar retiniano, epidermal, cabelo e queratinócitos. Fonte: Sigma Aldrich Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/iPSCsc-differentiation.html> Acessado em: 23 de Setembro de 2016.

O Vírus Sendai (SeV) é comumente usado como vetor para a reprogramação. Este é um vírus respiratório de camundongos e ratos, classificado como vírus *parainfluenza* de rato tipo I pertencente à família Paramyxoviridae. A reprogramação utiliza vetores baseados numa forma modificada e não transmissível do SeV para transmitir de forma segura e eficaz, e expressar os fatores genéticos chave necessários para a reprogramação das células somáticas em iPSCs.

O vírus SeV pode infectar uma grande variedade de células de diferentes espécies de animais, pois este vírus infecta células anexando-se ao receptor de ácido siálico presentes na superfície de muitas células diferentes. É necessária a ativação da proteína F por uma protease para que ocorra o processo de fusão vírus-célula. Após a infecção, o vírus passa pela replicação do genoma e síntese protéica,

e então, as partículas do vírus filha são montadas e liberadas (Figura 12) (CytoTune®-iPSCs Reprogramming Kit User Guide, 2014).

Figura 12 – Diagrama esquemático da reprogramação celular com o vetor do vírus SeV.



Fonte: CytoTune®-iPSCs Reprogramming Kit User Guide, 2014.

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL:

Investigar as possíveis diferenças na neurogênese e neurodiferenciação de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) a partir de fibroblastos de indivíduos acometidos pela Displasia Cortical Focal do tipo Taylor e indivíduos normais.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) Reprogramar em nível embrionário fibroblastos de pele de indivíduos com displasia cortical e indivíduos normais;
- b) Neurodiferenciar as iPSCs de indivíduos com displasia cortical e indivíduos normais;
- c) Quantificar a expressão de genes envolvidos no processo de neurodiferenciação durante diferentes períodos da neurogênese e neurodiferenciação de iPSCs de indivíduos com displasia cortical e indivíduos normais através de qRT-PCR.

3. METODOLOGIA

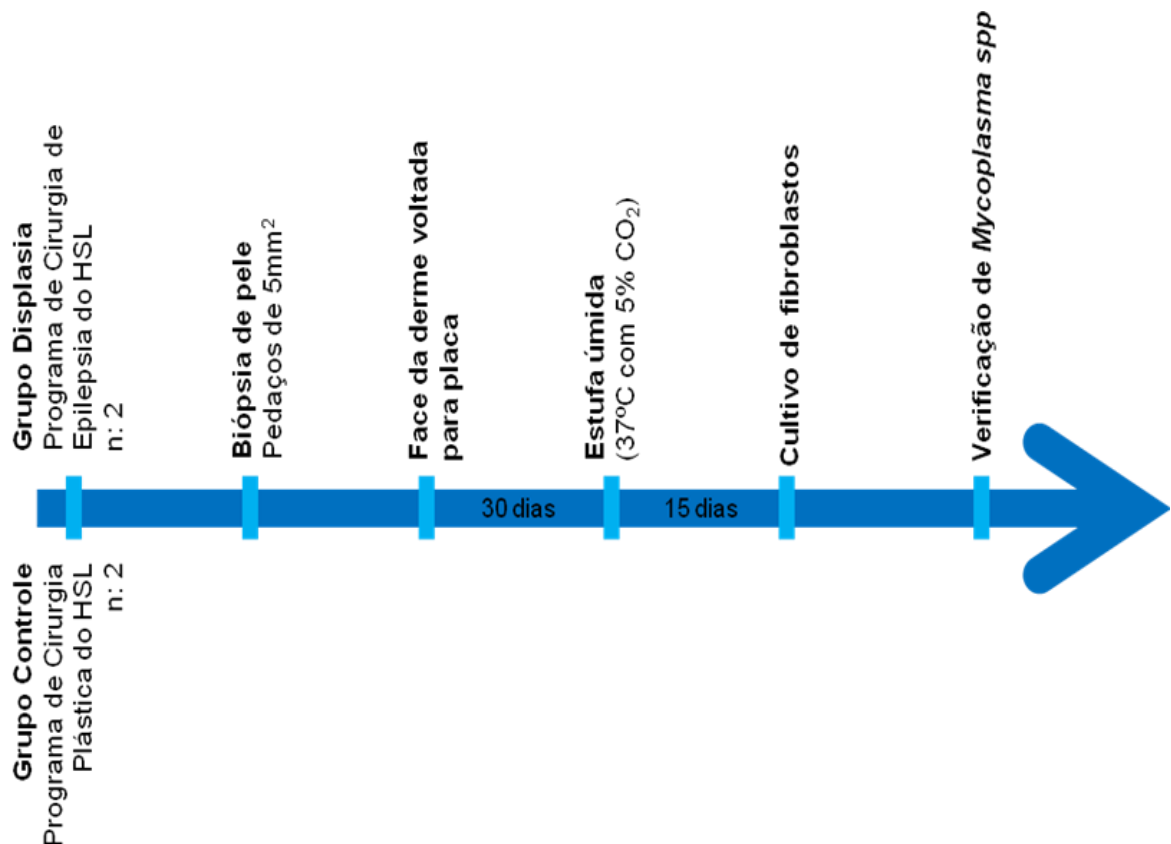
3.1. ASPECTOS ÉTICOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS sob o número CAAE: 37977114.3.0000.5336 e número do parecer: 915.598. Emenda aprovada sob o número do parecer: 1.164.991.

3.2. AMOSTRA DE PELE HUMANA

As biópsias de pele foram obtidas de dois indivíduos diagnosticados com Displasia Cortical Focal, sem nenhuma outra doença neurológica e livres de doenças infecciosas, atendidos no Programa de Cirurgia de Epilepsia do Hospital São Lucas da PUCRS. Para compor o grupo controle do estudo, foram obtidas biópsias de pele de dois indivíduos saudáveis, livres de doenças infecciosas e neurológicas atendidos no Programa de Cirurgia Plástica do Hospital São Lucas da PUCRS. A coleta de biópsia de pele foi realizada a partir de fragmentos residuais da cirurgia de epilepsia e cirurgia plástica, após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1) (Figura 13).

Figura 13 – Diagrama esquemático desde a coleta de amostra de pele humana até o teste para verificação de possível contaminação por *Mycoplasma* spp. nas células.



Fonte: do autor.

3.3. OBTENÇÕES DE FIBROBLASTOS

No Centro de Terapia Celular do Instituto do Cérebro da PUCRS, os fragmentos de pele foram seccionados em pedaços de aproximadamente 5 mm². Manualmente foi realizada a remoção do tecido adiposo. Os fragmentos de pele foram colocados com a face da derme voltada para baixo em uma placa de Petri de 60 mm preparada com ranhuras para fixação dos fragmentos. Após, foi adicionado meio DMEM suplementado 20% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco), 100 U/mL de penicilina (Gibco), 100 U/mL de estreptomicina (Gibco), 100 µg/mL de gentamicina (Gibco) e 20 ng/mL de fator de crescimento de fibroblastos (FGF - do inglês *Fibroblast Growth Fator*) (Life Technologies). Os fragmentos de pele foram mantidos em estufa úmida a 37°C com 5% CO₂. Ao atingir confluência superior a 80%, foi realizado teste de contaminação para *Mycoplasma* spp. (Figura 12).

3.4. TESTE DE CONTAMINAÇÃO PARA *MYCOPLASMA* SPP.

O teste para verificação de possível contaminação por *Mycoplasma* spp. foi realizado através do ensaio MycoAlert PLUS (Lonza) conforme orientação do fabricante. Foram coletados 2 mL de sobrenadante da cultura celular a ser testada e centrifugado a 200 G por 5 minutos. Foram coletados 100 µL do sobrenadante e adicionado a uma placa de cultura de 96 poços. A cada poço, foi adicionado 100 µL do reagente MycoAlert Reagent (Lonza) e as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Spectra Max M2 (Molecular Devices), sendo a primeira leitura com comprimento de onda de 550/620 nm em modo luminescência. Após a leitura, foi adicionado o substrato MycoAlert Substrate (Lonza) e novamente as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos. A segunda leitura utilizou os mesmos parâmetros da primeira. Para obtenção dos resultados, foi realizado cálculo da razão entre a segunda e a primeira leitura. O ensaio foi realizado utilizando controle positivo MycoAlert Control (Lonza).

3.5. ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO DISPLÁSICO

Logo após a ressecção cirúrgica do tecido cerebral displásico, as amostras foram imediatamente fixadas com formaldeído tamponado a 10% por 24 horas. As peças foram embebidas em parafina e foram realizados cortes de 5 µM utilizando micrótomo (Leica Microsystems). As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina e submetidas à imuno-histoquímica automatizada (Dako Autostainer Link 48 (Agilent Technologies) para anti-Neu-N (A60, EMD Millipore, Merck) e anti-Vimentina (Dako). Todas as reações possuíam controle externo positivo e negativo. As lâminas foram observadas em microscópio Zeiss Axiokop 40 (Zeiss). Todas as imagens foram capturadas no formato utilizando câmera colorida Retiga 2000R (QImaging).

3.6. GERAÇÃO DE iPSCs DOS FIBROBLASTOS DE PELE HUMANA

Os fibroblastos dos indivíduos com Displasia Cortical Focal e dos indivíduos normais foram submetidos à reprogramação utilizando o kit CytoTune®-iPSCs 2.0 Sendai Reprogramming (Life Technologies) conforme orientações do fabricante. Os fibroblastos foram cultivados em placas de cultura de seis poços e para transfecção, foram selecionados os poços que apresentaram confluência de cerca de 70% de

superfície de cultivo. As células foram transfectadas através da exposição dos fibroblastos aos vetores virais contendo os genes *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* E *C-MYC* presentes no kit de reprogramação.

A quantidade de partículas virais utilizada foi calculada através da equação de Multiplicidade de infecção (MOI):

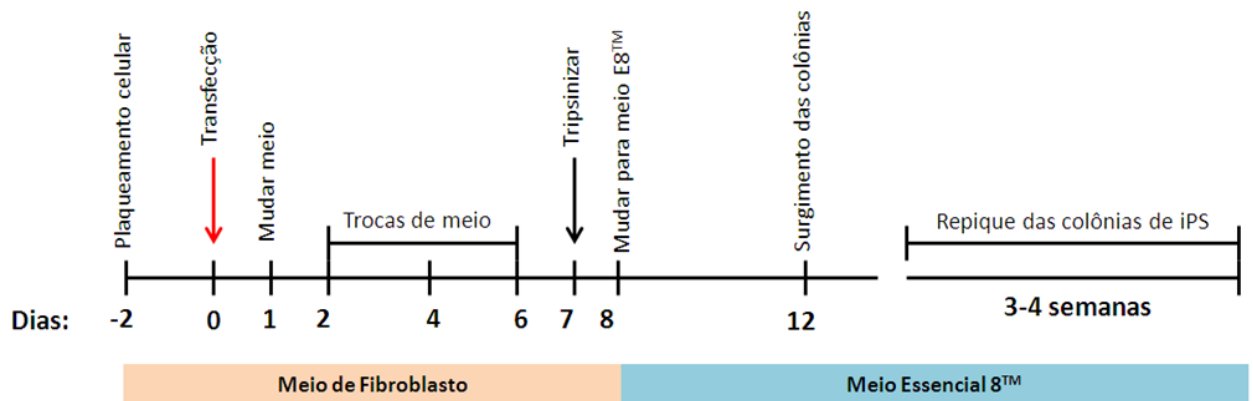
$$\text{Volume de vírus } (\mu\text{L}) = \frac{\text{MOI (UCI*/célula)} \times \text{número de células}}{\text{concentração do vírus (UCI/mL)} \times 10^{-3} \text{ (mL}/\mu\text{L)}}$$

* UCI – unidades de células infecciosas

Os vírus foram diluídos em 1 mL de meio de cultura DMEM/F12 (Life Technologies) suplementado com 20% de Knockout™ Serum Replacement (KSR) (Life Technologies), Aminoácidos não Essenciais de DMEM (1X) (Life Technologies), Glutamax (1X) (Life Technologies) e antibióticos. Os fibroblastos foram expostos ao meio contendo os vírus e incubados a 37°C a 5% CO₂ por 24 horas. As células foram lavadas com DPBS e cultivadas sob as mesmas condições por um período de seis dias (Figura 14).

Após sete dias, os cultivos foram tratados com Tripsina EDTA (Life Technologies) e transferidos a uma placa de cultura preparada com Matrigel (BD Corning). Após 24 horas, o meio de cultura foi aspirado e as células passaram a ser cultivadas em meio de cultura para células embrionárias mTeSR (Stem Cell Technologies). Aproximadamente 20 dias depois, os clones foram retirados manualmente e cultivados em novas placas contendo preparo de Matrigel.

Figura 14 – Diagrama esquemático das etapas para geração de células iPSCs.



Fonte: Adaptado de CytoTune®-iPSCs Reprogramming Kit User Guide, 2014.

A caracterização dos clones foi feita após o terceiro repique, utilizando os anticorpos anti-Nanog, anti-Sox2, anti-Oct4, anti-TRA1-60 e anti-TRA1-81 (Tabela 2). Os clones foram cultivados em placas de 24 poços, o meio de cultura foi aspirado e as células fixadas com PFA 4% (Sigma-Aldrich). Foi adicionado tampão de bloqueio e após, os anticorpos conjugados com fluoróforos diluídos (1:100) em tampão de diluição. Durante duas horas as células foram incubadas a temperatura ambiente. Em seguida, foram realizadas duas lavagens com tampão DPBS (do inglês *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) (Life Technologies) e a marcação nuclear utilizando DAPI.

Para evitar a proliferação de células diferenciadas, diariamente foi feita a manutenção do meio de cultura e a limpeza manual dos clones. Aproximadamente a cada 15 dias, foram realizados repiques manuais cortando os clones com auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro para o recultivo ou congelamento.

Tabela 2 - Anticorpos utilizados no estudo.

Anticorpo	Isotipo	Diluição
CARACTERIZAÇÃO DAS iPSCs		
anti-Nanog	Mouse IgG	1:100
anti-Sox2	Mouse IgG	1:100
anti-Oct4	Mouse IgG	1:100
anti-TRA1-60	Mouse IgG	1:100
anti-TRA1-81	Mouse IgG	1:100
CARACTERIZAÇÃO NEURAL		
FluoroPan Neuronal Marker*	Mouse IgG	1:100

Nanog (*Nanog Homeobox*), *Sox2* (*sex determining region Y-box 2*), *Oct-4* (*octamer-binding transcription factor 4*), *TRA1-60* and *TRA1-81* (*podocalyxin-like*).

**FluoropPan Neuronal Marker*: conjunto de anticorpos formado por NeuN (*anti-núcleo neuronal*), NFL (*anti-citoesqueleto neuronal*), MAP2 (*anti-microtubulo neuronal*) e β -tubulina III (*anti microtubulo neuronal*).

3.7. NEURODIFERENCIAÇÃO DAS iPSCs

A neurodiferenciação foi adaptada a partir do protocolo descrito por Song e colaboradores em 2008 ([SONG & SANCHEZ-RAMOS, 2008](#)). Para indução a neurodiferenciação, os clones de células iPSCs foram cultivados de forma dissociada (monocamada). Os clones foram passados manualmente para as placas Petri de 60 mm e 48 horas após a passagem, foram cultivados por uma hora em meio E8 contendo 10 μ M de inibidor de Rock quinase (iROCK – Chemicon). O meio foi aspirado e foi adicionado 3 mL de Accutase (Chemicon) mantendo exposição por um minuto. Após, a Accutase foi aspirada e os clones foram lavados duas vezes com tampão DPBS. Foram adicionados 3 mL de meio E8 contendo 10 μ M de iROCK e então removidos com auxílio de espátula. Foi realizada a dissociação manual dos clones através de pipeta e ponteira de 1000 μ L. Foram cultivadas placas de 24 poços contendo cerca de 5 a 7 clones dissociados por poço.

Os clones dissociados como monocamada, foram cultivados em meio Neurobasal Medium N5 (Gibco) suplementado com 20 ng/mL de fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF – do inglês *Brain Derived Neurotropic Factor*) (Sigma-Aldrich), B27 1X (Gibco) e 10% de KSR. As culturas foram mantidas em estufa úmida a 37°C com 5% CO₂ com troca diária de meio. As células foram cultivadas pelos períodos de 14, 22 e 35 dias.

3.8. AVALIAÇÃO DA NEURODIFERENCIAÇÃO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

Através de ensaio de imunofluorescência foi realizada a avaliação da neurodiferenciação para identificação das estruturas neuronais. Nas diferentes etapas de avaliação da neurodiferenciação, o meio de cultura de neurodiferenciação foi aspirado e as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos. As culturas foram lavadas duas vezes com tampão DBPS e foi adicionado 1 mL de solução de bloqueio (SBF e Albumina Sérica Bovina) (Life Technologies) por poço e então, incubado por uma hora a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado o anticorpo FluoroPan Neuronal Marker (Chemicon) conjugado com isotocinato fluoresceína isothicyanate (FITC) diluído em tampão de bloqueio (1:100). Esse anticorpo é composto de um conjunto de anticorpos formado por anti-núcleo

neuronal (NeuN), anti-citoesqueleto neuronal (NFL), anti-microtubulo neuronal (MAP2) e anti microtubulo neuronal (β -tubulina III) para caracterização da citoarquitetura e polarização neuronal (Tabela 2). As culturas foram incubadas por duas horas a temperatura ambiente. Após, as amostras foram lavadas duas vezes com tampão DPBS e adicionado DAPI a 0,01% para marcação nuclear. Com o auxílio do microscópio confocal Zeiss LSM-5 exciter, foram capturadas imagens das células com comprimento de onda de excitação de 488 nm para a marcação do anticorpo e 405 nm para a marcação nuclear por DAPI.

3.9. ANÁLISE MOLECULAR ATRAVÉS DE qRT-PCR

As análises moleculares dos genes relacionados à neurogênese e neurodiferenciação foram realizadas nos tecidos cerebrais, nos fibroblastos, nos clones de células iPSCs e nos diferentes períodos da neurodiferenciação das iPSCs neurodiferenciadas tanto nos indivíduos displásicas quanto nos normais. A Tabela 3 apresenta os genes avaliados bem como os padrões de expressão temporal durante o processo de neurogênese e neurodiferenciação, indicando onde as taxas metabólicas estão mais elevadas ou os genes encontram-se biologicamente mais ativos.

Tabela 3 - Padrões de expressão temporal de marcadores durante a neurogênese e neurodiferenciação.

Genes	Migração Neural	Diferenciação Neural	Transmissão sináptica	Sinaptogênese	Axiogênese	Sinalização Notch
ASCL1						
DCX						
DLG4						
FGF2						
HES1						
HEY1						
NEUROD6						
NEUROG2						
NFL						
NOTCH1						
NRCAM						
PAX5						
STX1A						

*ASCL1 (Achaete-scute family bHLH transcription factor 1); DCX (Doublecortin); DLG4 (Discs, large homolog 4 (*Drosophila*)); FGF2 (Fibroblast growth factor 2); HES1 (Hes family bHLH transcription factor 1); HEY1 (Hes-related family bHLH transcription factor with YRPW motif 1); NEUROD6 (Neuronal differentiation 6); NEUROG2 (Neurogenin 2); NFL (Neurofilament light chain); NRCAM (Neuronal cell adhesion molecule); PAX5 (Paired box 5); STX1A (Syntaxin 1A). Fonte: o autor.

A extração do RNA foi realizada através do kit RNA SV-Total (Promega). As amostras foram expostas a um tampão de lise, aquecidas a 70° por 3 minutos e centrifugadas a 12.000 G por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e adicionado a ele 200 µL de álcool 95%. O conteúdo foi transferido para uma coluna de sílica e centrifugado a 12.000 G por 1 minuto. Foi adicionado 600 µL de tampão e novamente centrifugado a 12.000 G por 1 minuto. Foi adicionado enzima DNase diluída em tampão e cloreto de manganês (MnCl₂) e incubado por 15 minutos a temperatura ambiente. Foi adicionado tampão de bloqueio da enzima e as colunas foram novamente centrifugadas a 12.000 G por 1 minuto. As colunas foram lavadas

com tampão de lavagem e o RNA retido na sílica foi eluído com 100 μL de água livre de RNase através de centrifugação a 12.000 G por 2 minutos. A quantificação do RNA extraído foi realizada através do fluorômetro Qubit 2.0 (Life Technologies) conforme orientação do fabricante. Alíquotas de 5 μL de cada amostra de RNA extraído foram adicionados a 195 μL de tampão contendo uma sonda RNA HS Assay (Life Technologies) e realizada a leitura para quantificação.

O SuperScript VILO MasterMix (Life Technologies) foi utilizado para a síntese de cDNA conforme orientação do fabricante. Foi adicionado 16 μL de RNA em 4 μL da *master mix* SuperScript VILO e expostas aos ciclos térmicos (25°C por 10 minutos, 42°C por 60 minutos e 85°C por 5 minutos) utilizando termociclador Verit (Life Technologies). O DNA complementar ao RNA extraído foi quantificado utilizando o fluorômetro Qubit 2.0 (Life Technologies) conforme orientação do fabricante. Alíquotas de 1 μL de cada amostra de cDNA foram adicionados a 199 μL de tampão contendo uma sonda ssDNA Assay (Life Technologies) e realizada a leitura para quantificação.

A partir da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction*) em tempo real foram realizadas as análises da expressão gênica, utilizando equipamento SpetOne Plus (Life Technologies). Amplificações a partir de 20 ng de cDNA foram realizadas para cada amostra. Os ensaios foram realizados em placas individuais para cada gene utilizando o gene GAPDH como controle endógeno de expressão. Na Tabela 4 constam os genes com seus respectivos *primers* complementares a sequência dos RNAs utilizados na análise da neurogênese e neurodiferenciação.

Tabela 4 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores empregados na PCR em tempo real e gene constitutivo.

	Forward	Reverse
ASCL1	5'-AAGCAAGTCAAGCGACAGCG-3'	5'-AGTCGTTGGAGTAGTTGGGG-3'
DCX	5'-CATCCCCAACACCTCAGAAG-3'	5'-GGAGGTTCCGTTTGCTGA-3'
DLG4	5'-TCCTCACAGTGCTGCATAGC-3'	5'-TGTCTTCATCTTGGTAGCGG-3'
FGF2	5'-AGAGCGACCCTCACATCAAG-3'	5'-TCGTTTCAGTGCCACATAC-3'
HES1	5'-AGTGAAGCACCTCCGGAAC-3'	5'-TCACCTCGTTCATGCACTC-3'
HEY1	5'-CGAAATCCCAAACCTCCGATA-3'	5'-TGGATCACCTGAAAATGCTG-3'
NEUROD6	5'-CTGAGAATCGGCAAGAGACC-3'	5'-CTGCACAGTAATGCATGCCG-3'
NEUROG2	5'-AGGAAGAGGACGTGTTAGTGC-3'	5'-GCAATCGTGTACCAGACCCAG
NFL	5'-TGAACACAGACGCTATGCGCTCAG-3'	5'-CACCTTTATGTGAGTGGACACAGAG-3'
NOTCH1	5'-GGT CAA TGA GTG CAA CAG CA-3'	5'-GGG TCA CAG TCG CAC TTG TA-3'
NRCAM	5'-TTGTGCAAAGAGGGAGCATG-3'	5'-GGGCAGTTCCTGTTGTCCT-3'
PAX5	5'-CTGATCTCCAGGCAAACAT-3'	5'-TTGCTCATCAAGGTGTCAGG-3'
STX1A	5'-ATCGCAGAGAACGTGGAGGAG-3'	5'-AGCGTGGAGTGCTGTGTCTTC-3'
GAPDH	5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3'	5'-CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC-3'

4. RESULTADOS

4.1. INDIVÍDUOS PARTICIPANTES DO ESTUDO

Neste estudo, foram incluídos dois indivíduos displásicos (Tabela 5) e dois indivíduos saudáveis, compondo o grupo controle. O primeiro indivíduo displásico (Indiv. 01) é do sexo masculino, tem 45 anos e é portador da DCF tipo IIb (Figura 15). Este apresenta crises epileptiformes nas áreas fronto temporal direita observadas na monitorização de vídeo EEG prolongada, sob-redução de fármacos antiepilépticos (Figura 16).

Figura 15 – Fotomicrografia de um corte histológico do córtex cerebral do Indiv. 01. A) morfologia do córtex mostrando deslaminação das camadas (Aumento 200x); B) Área de desorganização cortical com neurônios dismórficos e células abalonadas (Aumento 200x) (seta); C) Reação imunoistoquímica para Neu-N mostrando neurônios com deslaminação das camadas corticais (Aumento 20x); D) Reação imunoistoquímica para vimentina, marcando neurônios abalonados (Aumento 200x).

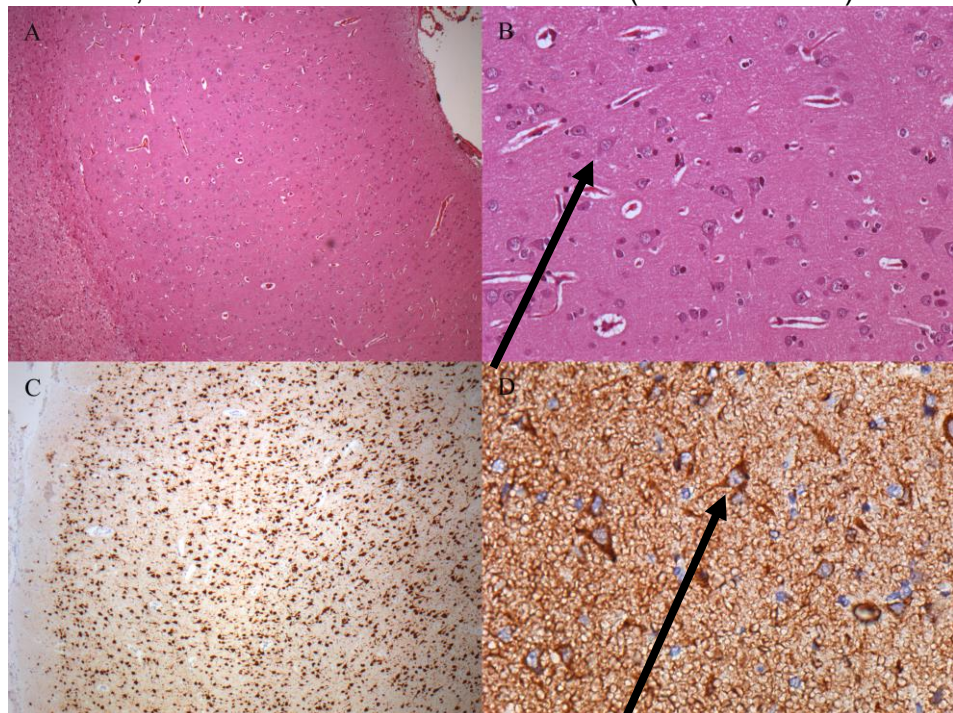
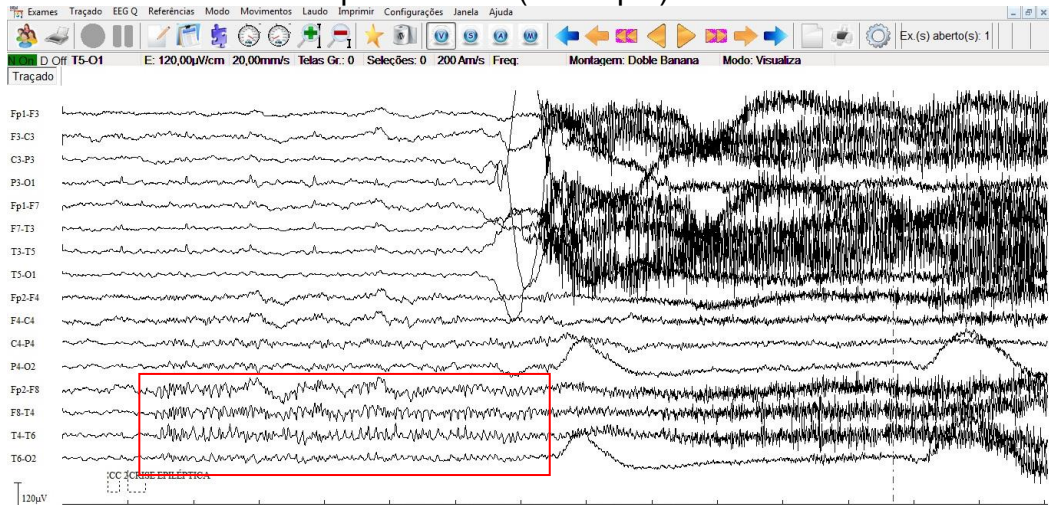


Figura 16 - Eletroencefalograma do Indiv. 01. O EEG apresenta crises epileptiformes nas áreas fronto temporal direita (destaque).



O segundo indivíduo displásico (Indiv. 02) é do sexo feminino, tem 12 anos e é portador da DCF tipo IIb (Figura 17). O registro de EEG deste indivíduo apresenta crises epileptiformes iniciadas no quadrante anterior esquerdo, com máximo na região frontal esquerda (Figura 18).

Figura 17 - Fotomicrografia de um corte histológico do córtex cerebral do Indiv. 02. A) morfologia do córtex mostrando deslaminação das camadas (Aumento 200x); B) Área de desorganização cortical com neurônios dismórficos e células abalonadas (Aumento 200x) (seta); C) Reação imunoistoquímica para Neu-N mostrando neurônios com deslaminação das camadas corticais (Aumento 20x); D) Reação imunoistoquímica para vimentina, marcando neurônios abalonados (Aumento 200x).

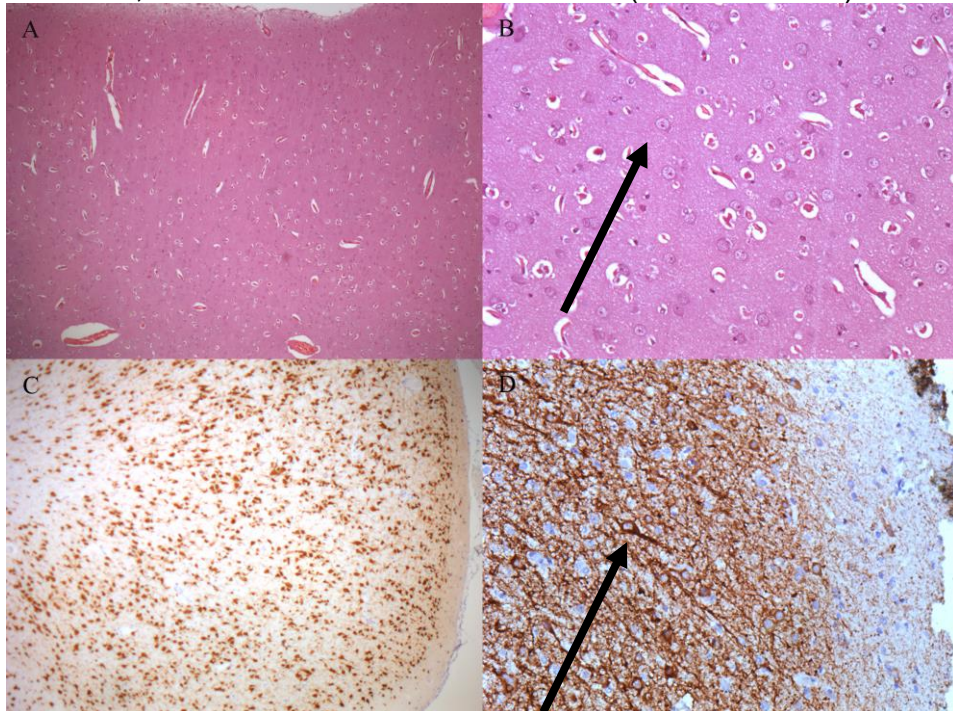


Figura 18 - Eletroencefalograma do Indiv. 02. O EEG apresenta crises epileptiformes iniciadas no quadrante anterior esquerdo, com máximo na região frontal esquerda (destaque).

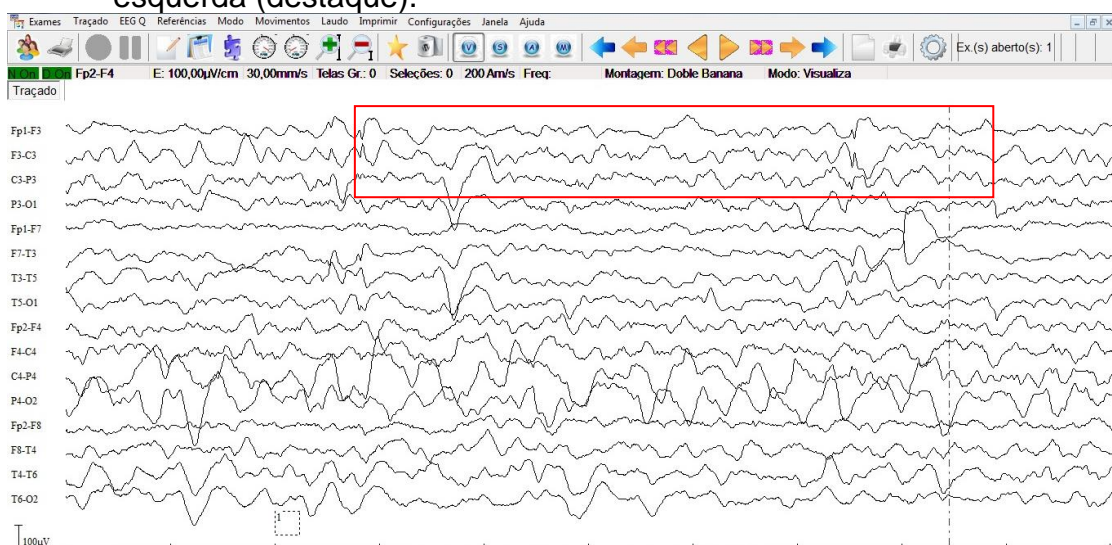


Tabela 5 - Características clínicas e laboratoriais dos indivíduos com Displasia Cortical Focal do tipo Taylor.

Indivíduos portadores da DCFT		
Indivíduo	Indiv. 01	Indiv. 02
Idade	45	12
Sexo	Masculino	Feminino
Medicamentos	Anti-epilépticos sem controle das crises.	Anti-epilépticos sem controle das crises.
Monitorização de vídeo EEG prolongada*	Atividade de base normal, tanto em sono quanto em vigília e raras ondas agudas na região fronto-temporal direita.	Alterações epileptiformes e ondas lentas com distribuição multifocal, envolvendo os quadrantes posterior direito e anterior esquerdo, sendo máximo na região frontal esquerda.
Registro de crises	Cinco, sendo que em duas delas não foi possível ver a zona de início de crises e nas demais se observou atividade rítmica na região frontal direita, no início das crises. No período pós ictal registrou-se paroxismos epileptiformes na região fronto-temporal direita.	Quatro crises típicas, todas iniciadas no quadrante anterior esquerdo.
Cirurgia de Epilepsia	Ressecção da zona epileptogênica.	Ressecção da zona epileptogênica frontal esquerda.
Ressonância magnética	DCF na região frontal à direita.	Alteração de sinal pericisto e uma inequívoca lesão displásica na região órbito-frontal esquerda.
Histopatologia/Imunocitoquímica	DCF tipo IIb	DCF tipo IIb
Comorbidade		Diabetes mellitus tipo I com oscilações importantes da glicemia conforme a frequência das crises.

*sob-redução de fármacos antiepilépticos.

4.2. OBTENÇÃO DOS FIBROBLASTOS DE PELE

Primeiramente os fragmentos de pele foram cultivados e após aproximadamente 20 dias, os fibroblastos obtidos foram tripsinizados e transferidos a uma nova placa de cultura. Anteriormente foi realizado o teste de contaminação para *Mycoplasma spp.* para então cultivar em escala, congelar e realizar a reprogramação celular. As células livres de contaminação foram cultivadas até a sétima passagem e algumas amostras de cultura foram congeladas na quarta, quinta, sexta e sétima passagem.

4.3. REPROGRAMAÇÃO CELULAR

Após a reprogramação celular com exposição dos fibroblastos aos vetores virais observou-se o surgimento dos clones (Figura 19). Aproximadamente 25 dias após a transfecção, os clones puderam ser selecionados manualmente e cultivados sobre o Matrigel. No terceiro repique dos clones foi realizado imunofluorescência sendo detectada marcação positiva para os marcadores Nanog, Sox2, Oct4, TRA1-60 e TRA1-81 (Figura 20). Através da imunofluorescências, evidenciamos sucesso na geração de iPSCs dos cultivos de fibroblastos.

Figura 19 – Captura de imagem de clone de iPSCs. A) Sem áreas de diferenciação; B) Com áreas de diferenciação (Aumento 200X).

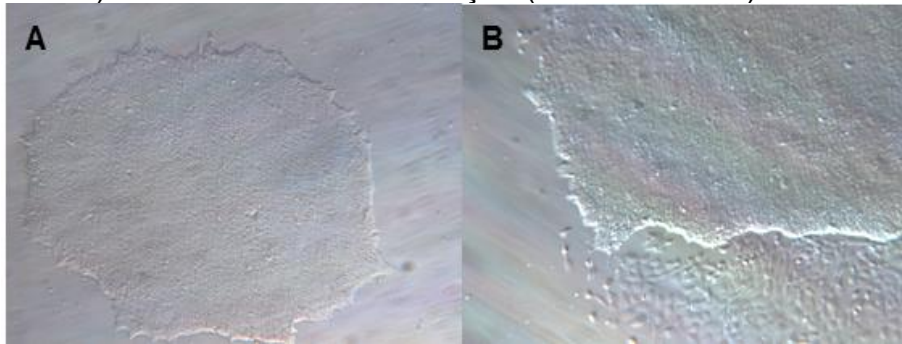
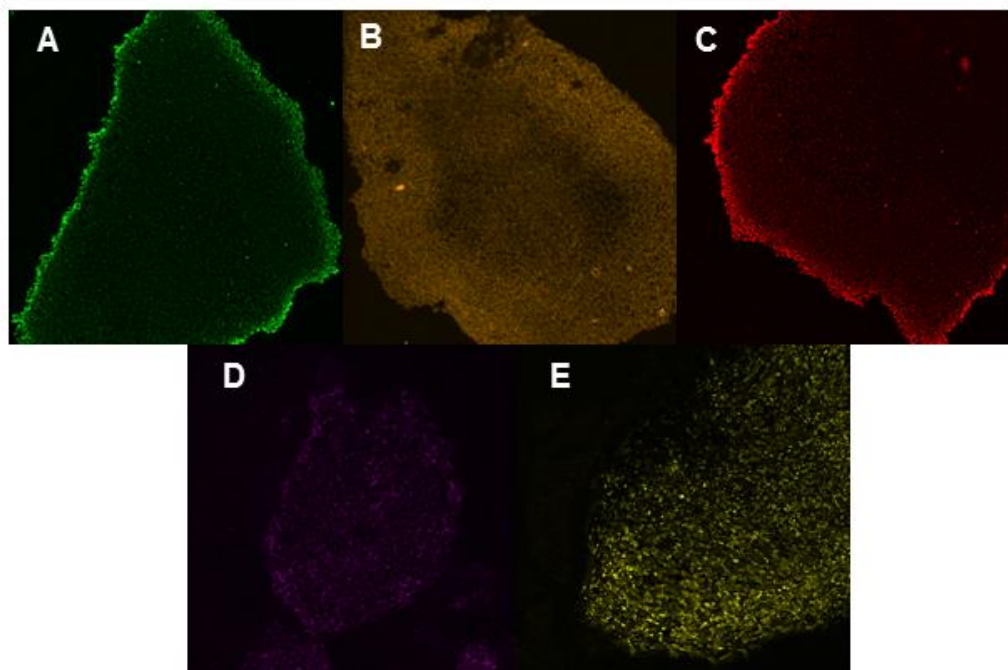


Figura 20 - Captura de imagem da caracterização das iPSCs através de microscopia confocal. Os clones apresentaram marcação positiva para os cinco marcadores de pluripotência testados: A) Nanog, B) Sox2, C) Oct4, D) TRA1-60 e E) TRA1-81 (Aumento 200X).



4.4. NEURODIFERENCIAÇÃO DAS iPSCs

Em ensaio de imunofluorescência, as iPSCs neurodiferenciadas por 22 dias apresentaram marcação positiva para o anticorpo FluoroPan Neuronal Marker (Figura 21). Após 35 dias de indução a neurodiferenciação apresentaram características morfológicas muito semelhantes a células nervosas, inclusive com possível formação de redes neuronais (Figura 22).

Figura 21 - Captura de imagens das células iPSCs após protocolo de neurodiferenciação por 22 dias e marcação por imunofluorescência. Marcação nuclear (DAPI) + Marcação do anticorpo FluoroPan Neuronal (FITC). (Aumento 200X).

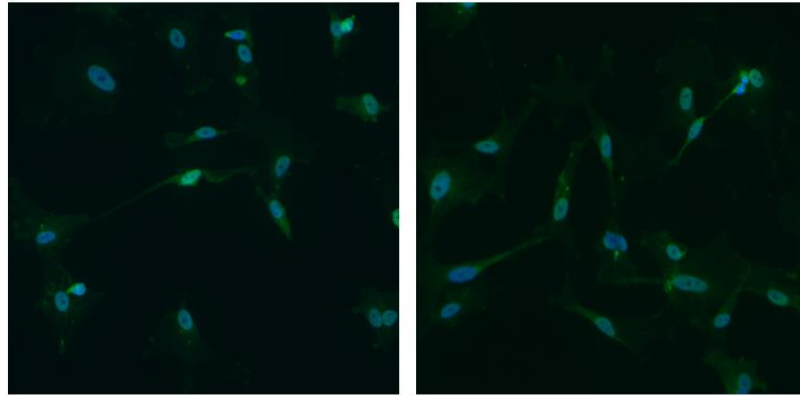
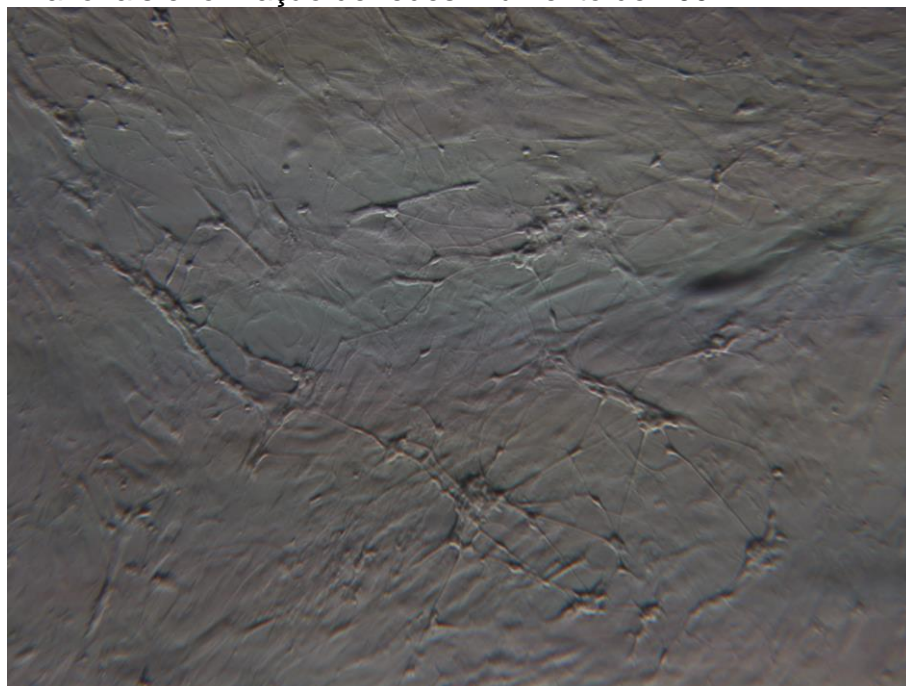


Figura 22 - Captura de imagem das células iPSCs após 35 dias de indução a neurodiferenciação. Observa-se a formação de prolongamentos axonais e formação de redes. Aumento de 200X.



4.5. ANÁLISE MOLECULAR

4.5.1. *ASCL1*

A expressão relativa do gene *ASCL1* no tecido cerebral displásico apresentou um aumento de 142,04 vezes quando comparado ao tecido cerebral controle, utilizando fibroblastos do grupo controle como calibrador (Figura 23). Durante o protocolo de neurodiferenciação, nos indivíduos portadores de DCF, observou-se uma diminuição de 5,77, 197,43 e 10,49 vezes menos expresso, respectivamente, na expressão de *ASCL1* nas células neurodiferenciadas por 14, 22 e 35 dias comparadas com os indivíduos controle nestes mesmos dias, utilizando as iPSCs não diferenciada como calibrador (Figura 24).

Figura 23 - Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene *ASCL1* e todos os grupos do estudo. Os resultados estão apresentados utilizando como calibrador fibroblastos do grupo controle.

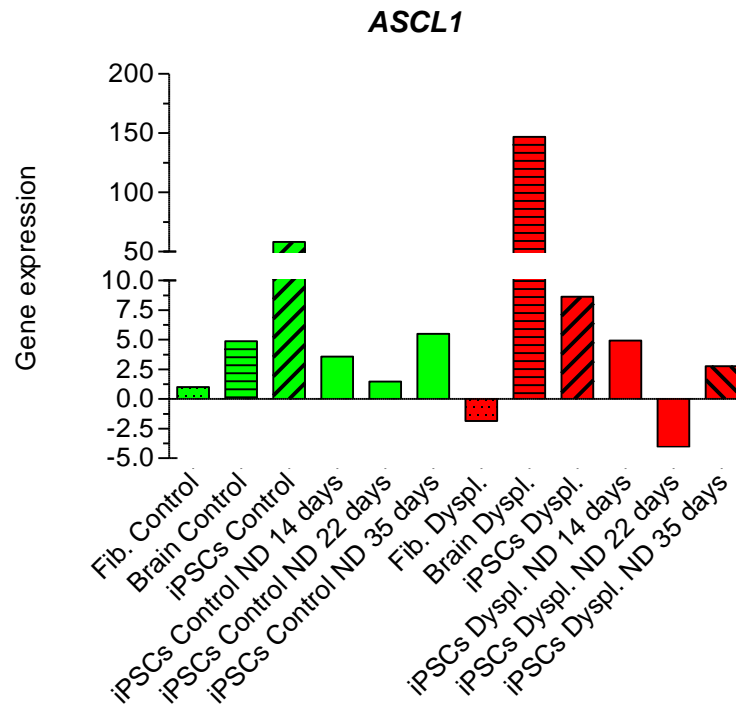
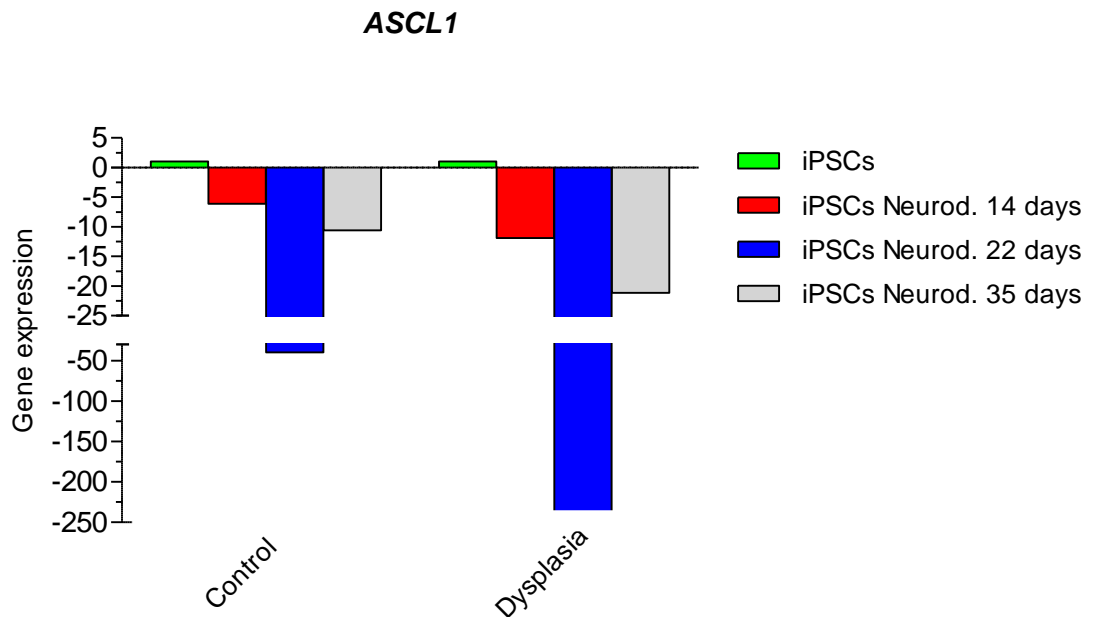


Figura 24 - Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene *ASCL1* durante a neurodiferenciação das iPSCs. Os resultados estão apresentados utilizando como calibrador iPSCs não diferenciada.



4.5.2. *NOTCH1*

Em relação ao gene *NOTCH1*, as células iPSCs displásicas expressaram 22,75 vezes mais o gene comparado com as iPSCs controle (Figura 25). Durante o protocolo de neurodiferenciação, nos 14^o e 22^o dias os valores de expressão foram semelhantes em ambos os grupos, porém, o grupo displásico apresentou um aumento na expressão do gene no 35^o dia em comparação ao grupo controle (4,52 vezes) (Figura 26).

Figura 25 - Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene *NOTCH1* e todos os grupos do estudo. Os resultados estão apresentados utilizando como calibrador fibroblastos do grupo controle.

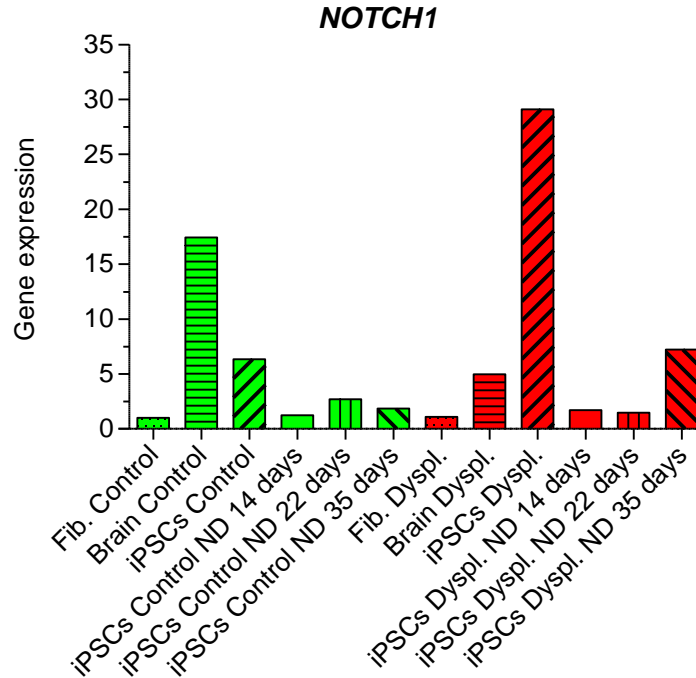
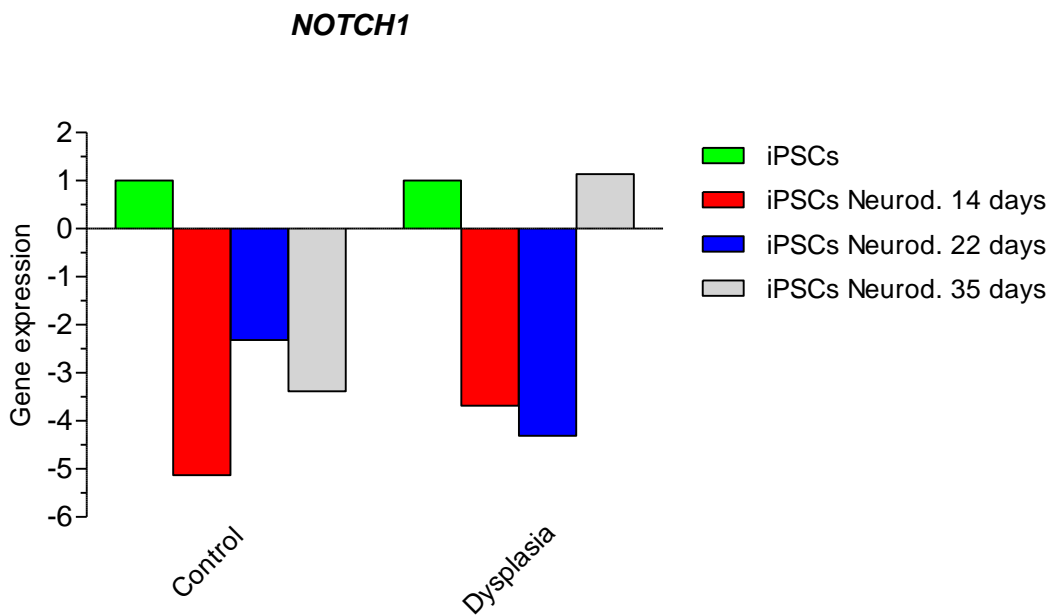


Figura 26 - Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene *NOTCH1* durante a neurodiferenciação das iPSCs. Os resultados estão apresentados utilizando como calibrador iPSCs não diferenciada.



4.5.3. *HES1*

As células iPSCs dos indivíduos controle apresentaram um aumento de 24,8 vezes a expressão do gene *HES1* quando comparado as células iPSCs dos indivíduos displásicos (Figura 27). Durante os três períodos de neurodiferenciação, os indivíduos displásicos e controle apresentaram valores semelhantes (Figura 28).

Figura 27 - Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene *HES1* e todos os grupos do estudo. Os resultados estão apresentados utilizando como calibrador fibroblastos do grupo controle.

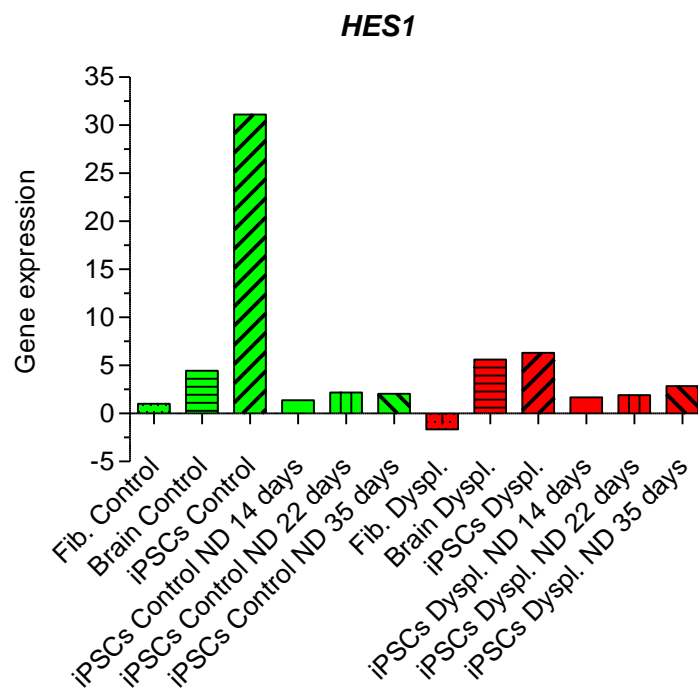
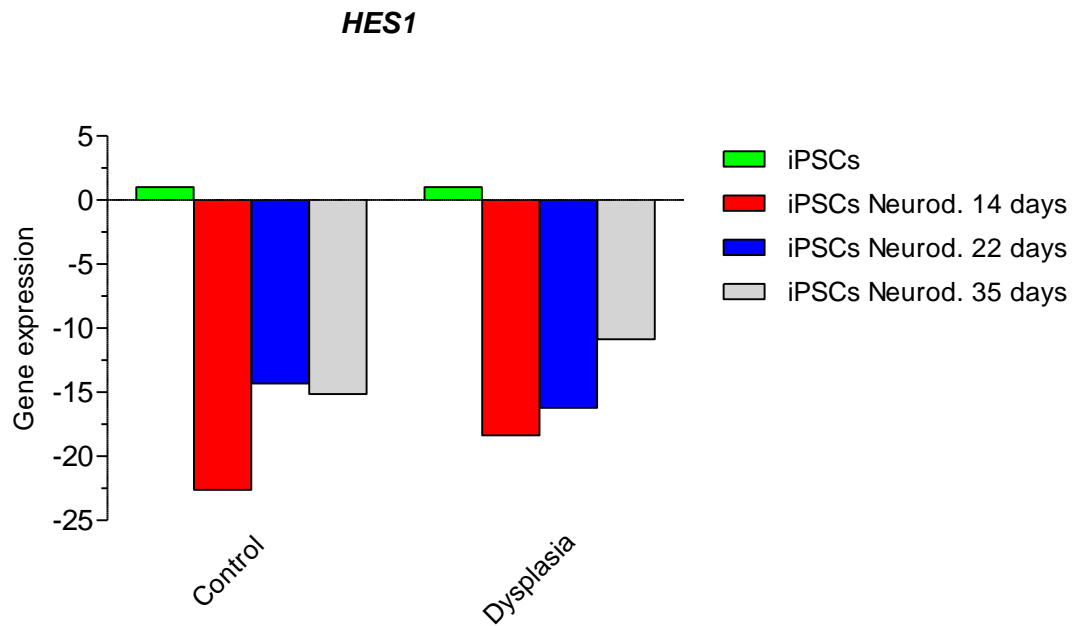


Figura 28 - Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene *HES1* durante a neurodiferenciação das iPSCs. Os resultados estão apresentados utilizando como calibrador iPSCs não diferenciada.



4.5.4. *NEUROG2*

As células iPSCs controle expressaram 2705,03 vezes mais o gene *NEUROG2* quando comparadas com as células iPSCs displásicas (Figura 29). Durante o protocolo de neurodiferenciação, no 35º dia, o grupo displasia, apresentou uma diminuição de 74747,3 vezes menos a expressão do gene *NEUROG2* em relação ao grupo controle (Figura 30).

Figura 29 - Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene *NEUROG2* e todos os grupos do estudo. Os resultados estão apresentados utilizando como calibrador fibroblastos do grupo controle.

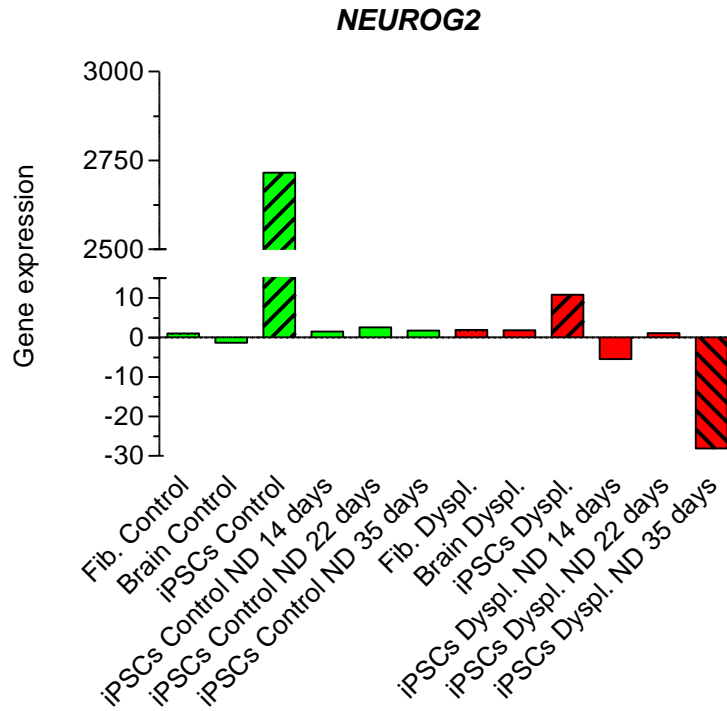
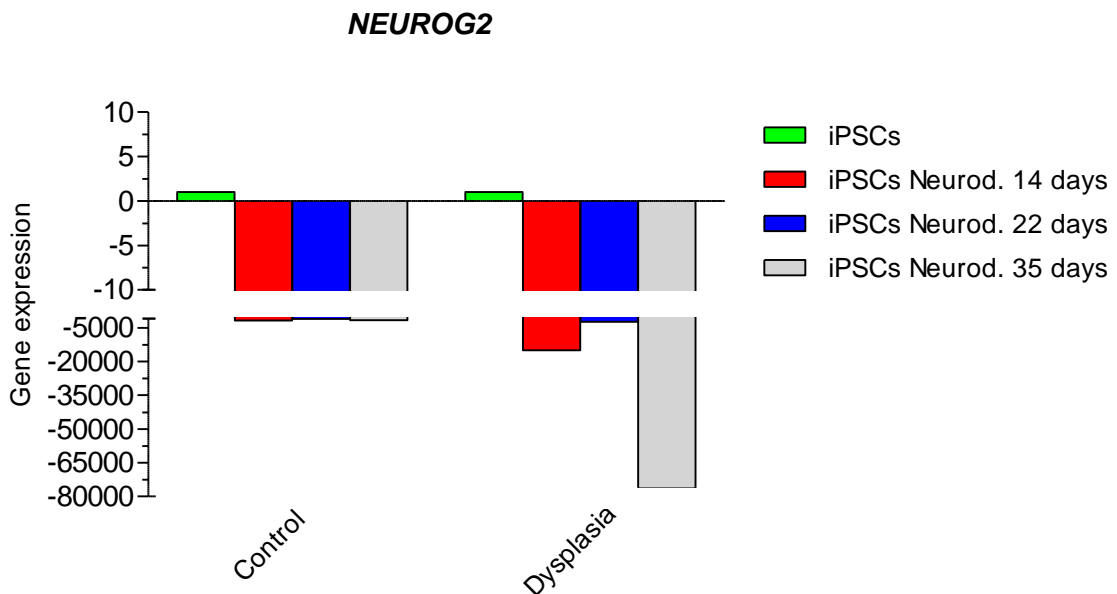


Figura 30 - Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene *NEUROG2* durante a neurodiferenciação das iPSCs. Os resultados estão apresentados utilizando como calibrador iPSCs não diferenciada.



4.5.5. *DCX*

Os níveis de expressão de *DCX* nas células iPSCs controle foi 1235,11 vezes maior em relação as iPSCs displásicas (Figura 31). Nos indivíduos controle houve uma diminuição na expressão do gene durante o protocolo de neurodiferenciação por 22 e 35 dias, sendo aproximadamente 471 e 538, respectivamente, vezes menos exposto em comparação com o grupo displásico. As células neurodiferenciadas por 14 dias apresentaram valores semelhantes entre os grupos (Figura 32).

Figura 31 - Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene *DCX* e todos os grupos do estudo. Os resultados estão apresentados utilizando como calibrador fibroblastos do grupo controle.

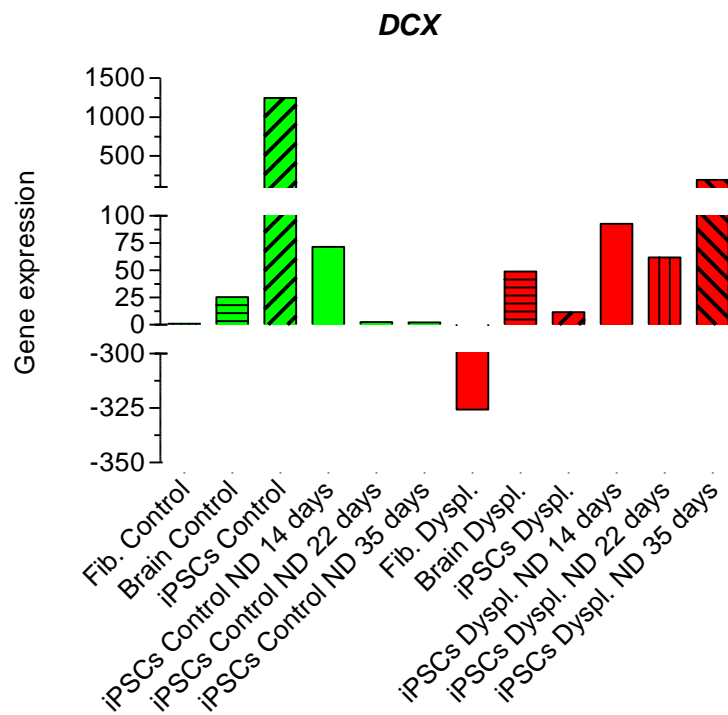
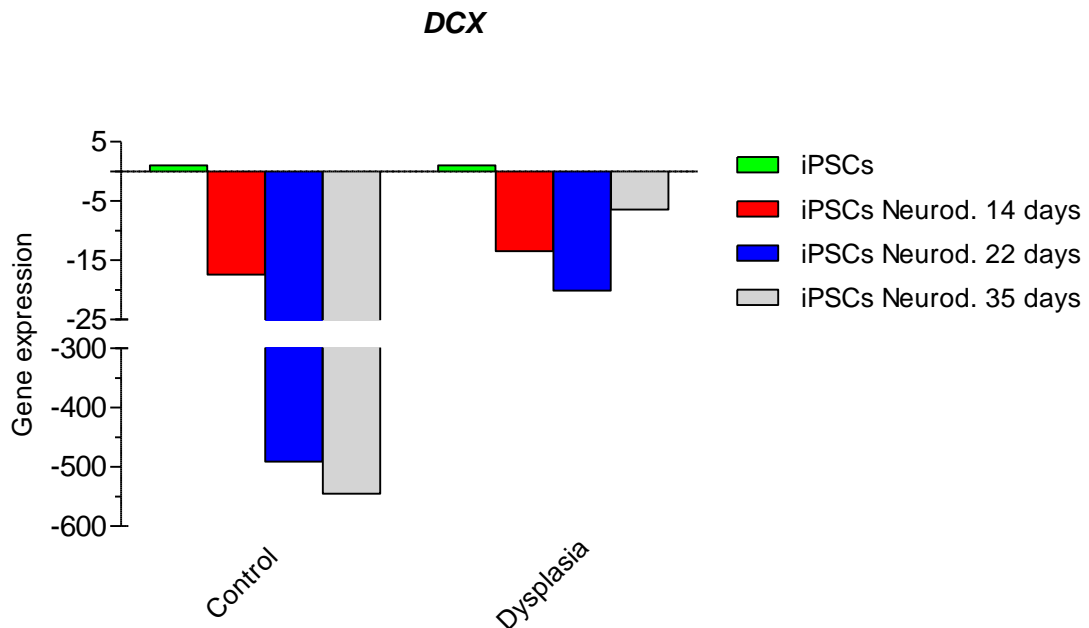


Figura 32 - Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene *DCX* durante a neurodiferenciação das iPSCs. Os resultados estão apresentados utilizando como calibrador iPSCs não diferenciada.



4.5.6. *DLG4*

Em relação ao gene *DLG4*, as células iPSCs displásicas e controle apresentaram valores semelhantes com uma pequena maior expressão do gene nos indivíduos displásicos (2,14 vezes). Tanto os tecidos cerebrais dos indivíduos portadores da DCF quanto os controles, apresentaram níveis muito próximos de expressão, utilizando fibroblasto como calibrador da reação (Figura 33), assim como durante o protocolo de neurodiferenciação por 14 e 22 dias utilizando as células iPSCs como calibrador. Na neurodiferenciação por 35 dias, os indivíduos displásicos expressaram aproximadamente 4 vezes menos o gene em comparação com as células controle (Figura 34).

Figura 33 - Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene *DLG4* e todos os grupos do estudo. Os resultados estão apresentados utilizando como calibrador fibroblastos do grupo controle.

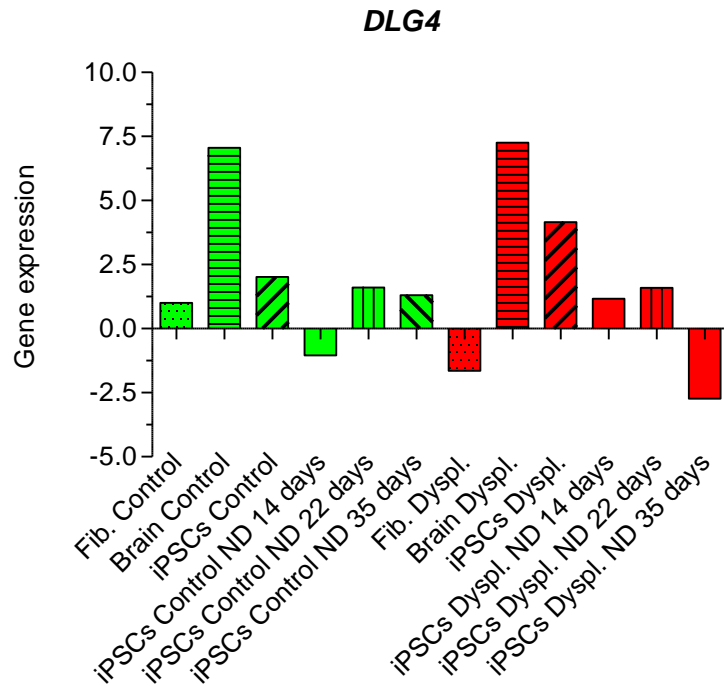
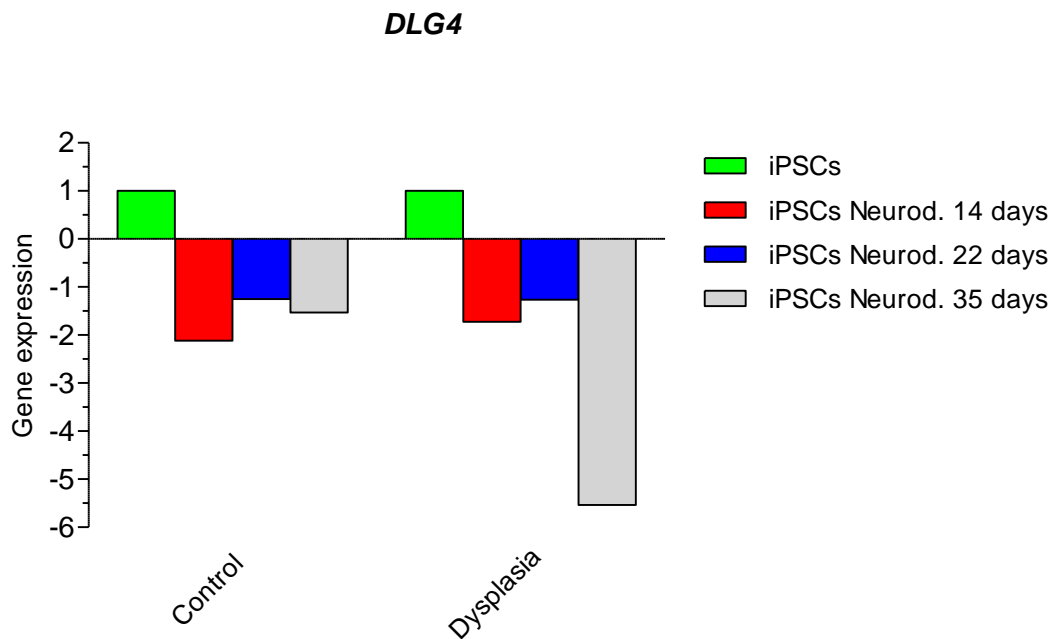


Figura 34 - Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene *DLG4* durante a neurodiferenciação das iPSCs. Os resultados estão apresentados utilizando como calibrador iPSCs não diferenciada.



4.5.7. *FGF2*

As células iPSCs dos indivíduos displásicos e controle apresentaram valores de expressão semelhantes, 1,7 vezes mais o gene em relação as iPSCs dos indivíduos com DCF (Figura 35). Durante o 35^o período de neurodiferenciação, a expressão do gene nos indivíduos controle foi 195,35 menos expresso em comparação aos indivíduos displásicos (Figura 36).

Figura 35 - Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene *FGF2* e todos os grupos do estudo. Os resultados estão apresentados utilizando como calibrador fibroblastos do grupo controle.

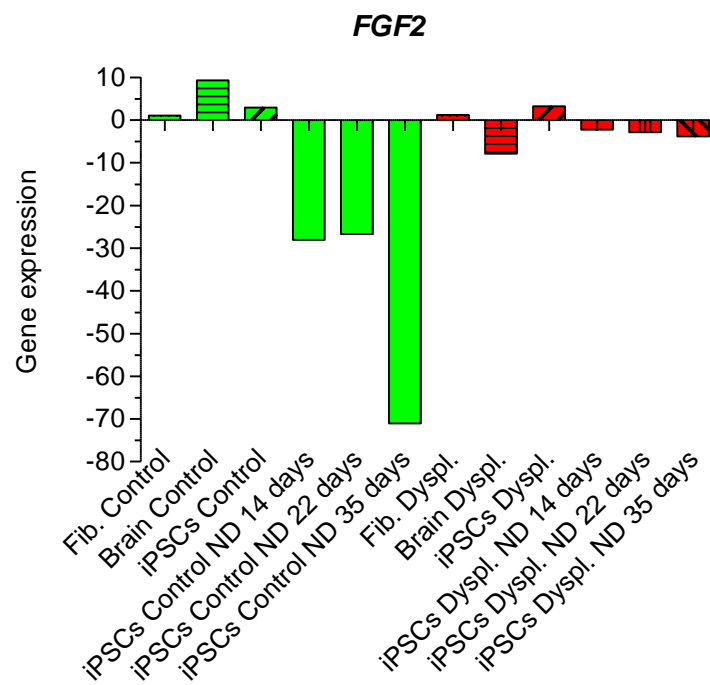
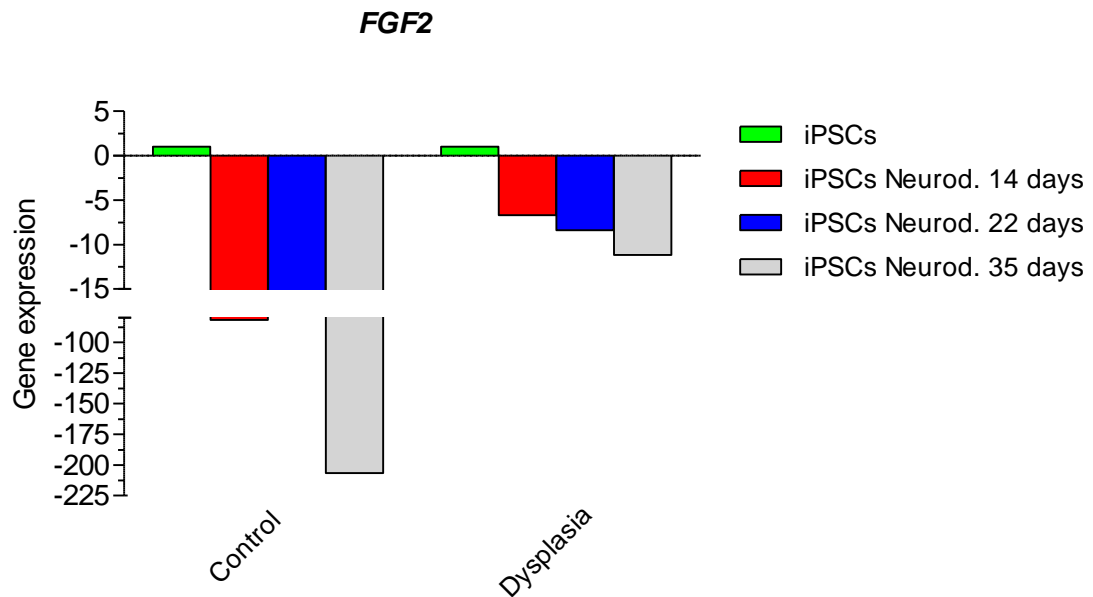


Figura 36 - Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene *FGF2* durante a neurodiferenciação das iPSCs. Os resultados estão apresentados utilizando como calibrador iPSCs não diferenciada.



4.5.8. *HEY1*

Em relação ao gene *HEY1*, o tecido cerebral displásico apresentou um aumento na expressão do gene (98,68 vezes) quando comparados com o tecido cerebral dos indivíduos controle (Figura 37). Durante o protocolo de neurodiferenciação por 35 dias, os indivíduos displásicos apresentaram uma diminuição de 18,65 vezes menos a expressão do gene em relação aos indivíduos controle (Figura 38).

Figura 37 - Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene *HEY1* e todos os grupos do estudo. Os resultados estão apresentados utilizando como calibrador fibroblastos do grupo controle.

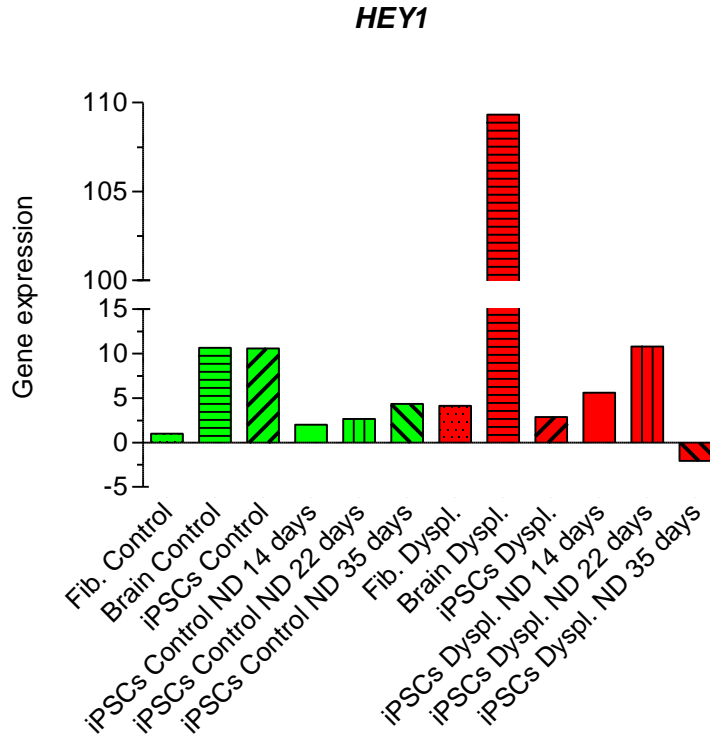
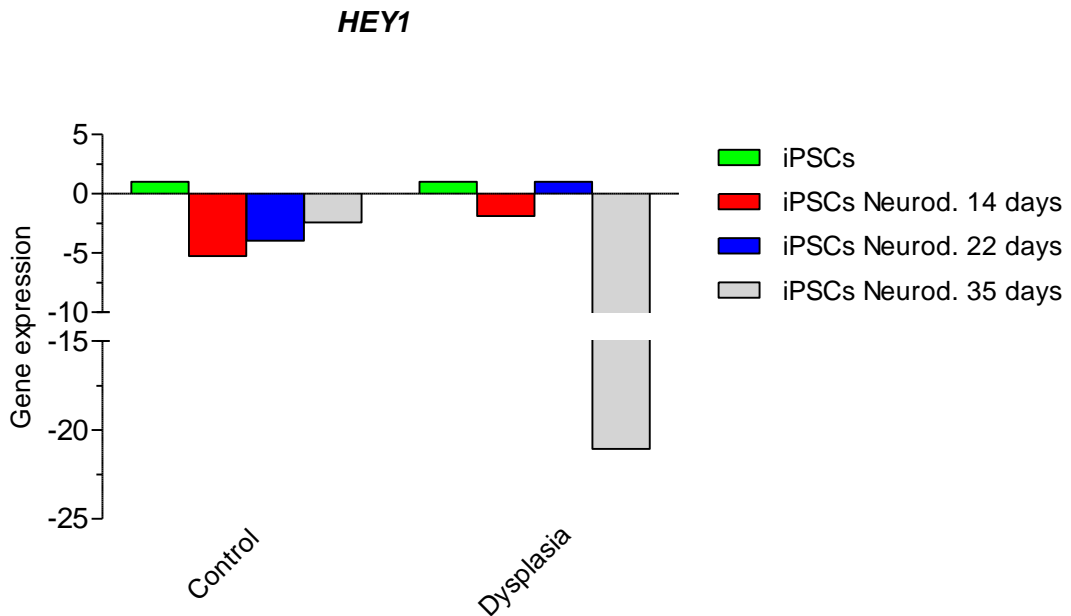


Figura 38 - Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene *HEY1* durante a neurodiferenciação das iPSCs. Os resultados estão apresentados utilizando como calibrador iPSCs não diferenciada.



4.5.9. *NEUROD6*

Houve um aumento na expressão do gene *NEUROD6* de cerca de 3084,01 vezes nas células das iPSCs controles em relação as iPSCs dos indivíduos displásicos (Figura 39). Durante a neurodiferenciação por 14 dias, o grupo displásico apresentou uma diminuição na expressão do gene em relação ao grupo controle (77308,24 vezes menos) (Figura 40).

Figura 39 - Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene *NEUROD6* e todos os grupos do estudo. Os resultados estão apresentados utilizando como calibrador fibroblastos do grupo controle.

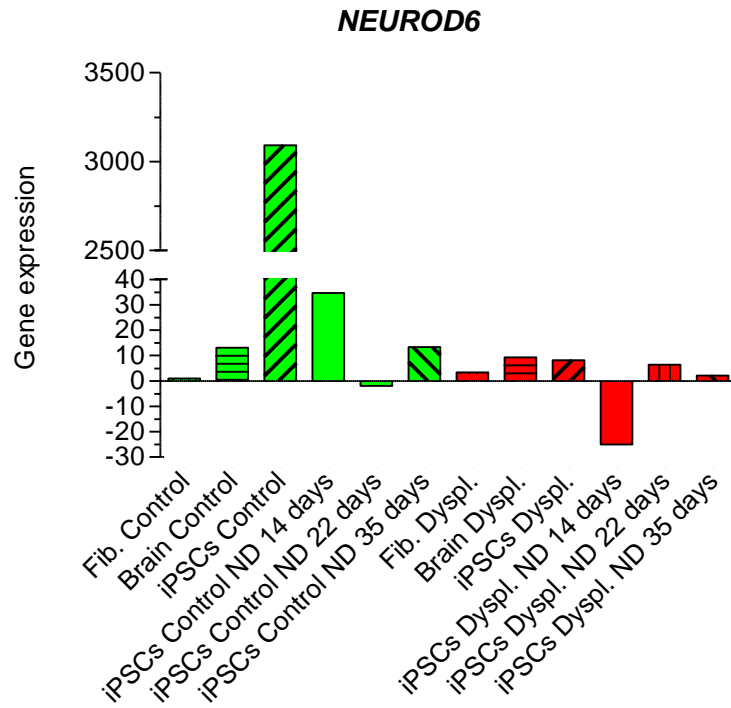
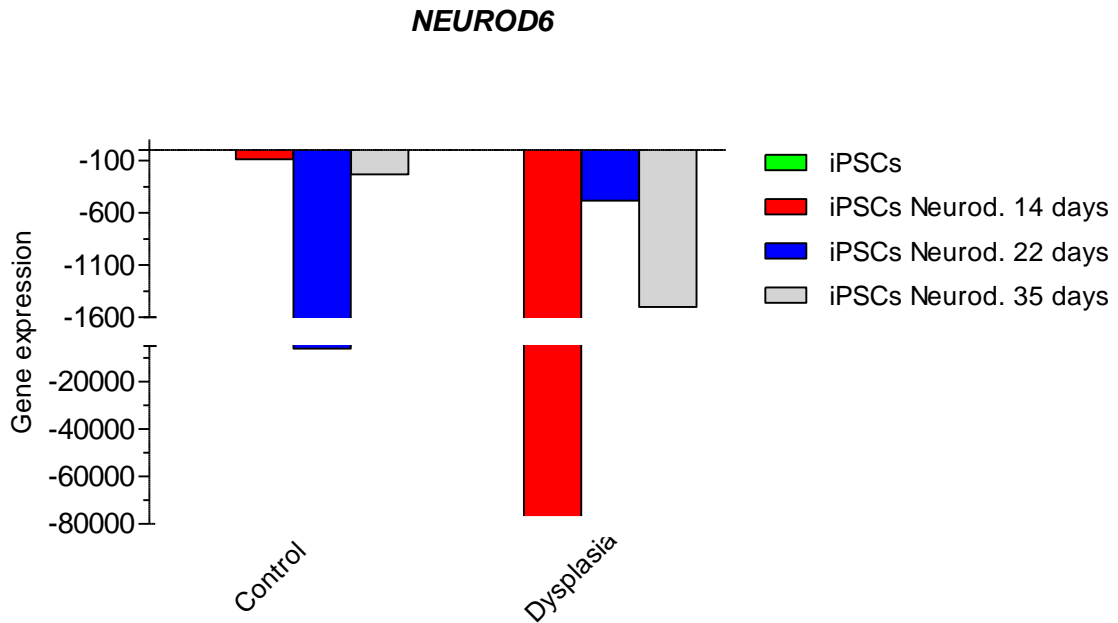


Figura 40 - Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene *NEUROD6* durante a neurodiferenciação das iPSCs. Os resultados estão apresentados utilizando como calibrador iPSCs não diferenciada.



4.5.10. *NFL*

A análise do gene *NFL* apresentou valores maiores de expressão no tecido cerebral dos indivíduos controle em comparação com o tecido cerebral dos indivíduos com DFC (67,76 vezes mais expresso) (Figura 41). Na neurodiferenciação por 35 dias, o grupo displásico apresentou um aumento em relação ao grupo controle (7,39 vezes mais expresso) (Figura 42).

Figura 41 - Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene *NFL* e todos os grupos do estudo. Os resultados estão apresentados utilizando como calibrador fibroblastos do grupo controle.

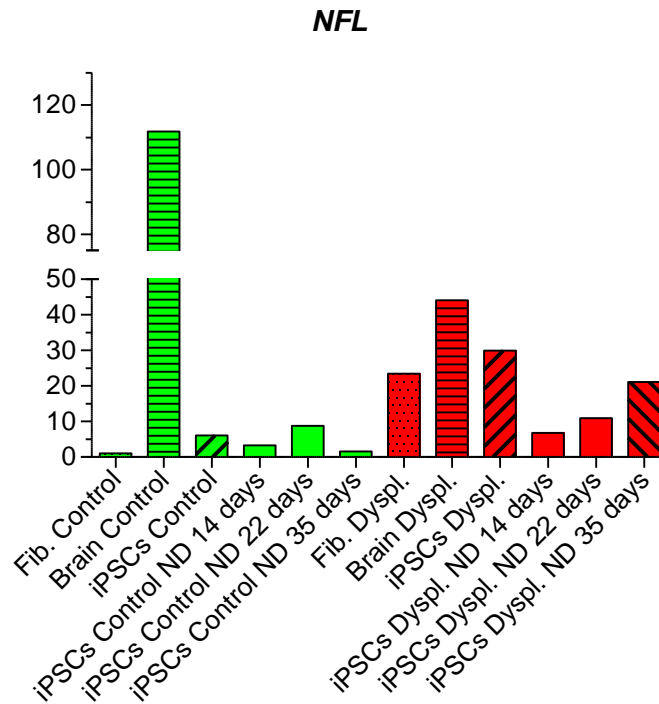
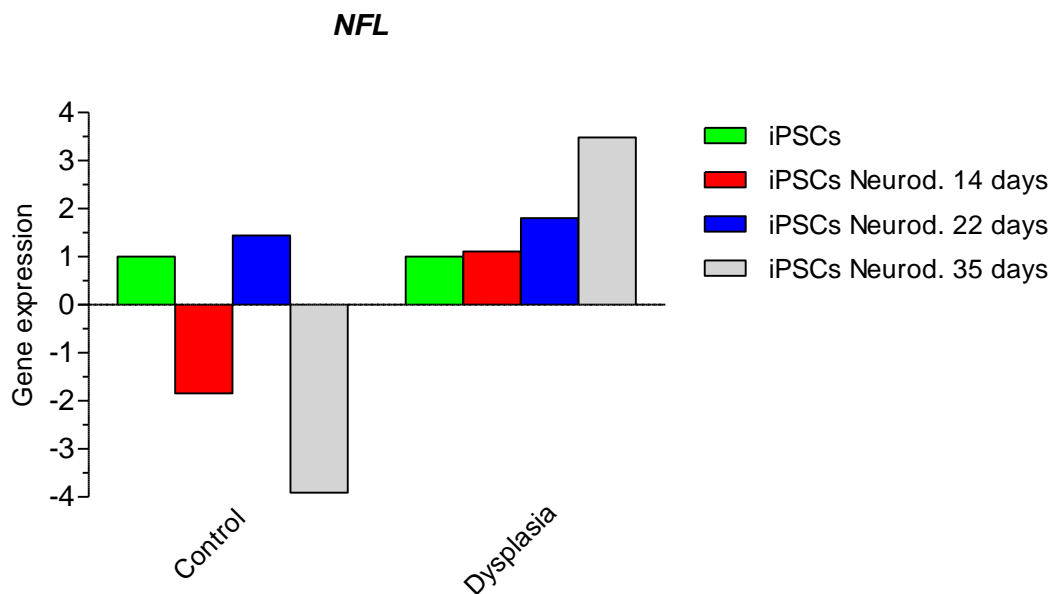


Figura 42 - Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene *NFL* durante a neurodiferenciação das iPSCs. Os resultados estão apresentados utilizando como calibrador iPSCs não diferenciada.



4.5.11. *NRCAM*

As células iPSCs controle apresentaram um aumento na expressão do gene *NRCAM* em comparação as iPSCs displásicas (346,29 vezes mais) (Figura 43). Durante a neurodiferenciação por 14 dias, o grupo controle diminuiu a expressão do gene em comparação ao grupo displásico (251,1 vezes menos) (Figura 44).

Figura 43 - Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene *NRCAM* e todos os grupos do estudo. Os resultados estão apresentados utilizando como calibrador fibroblastos do grupo controle.

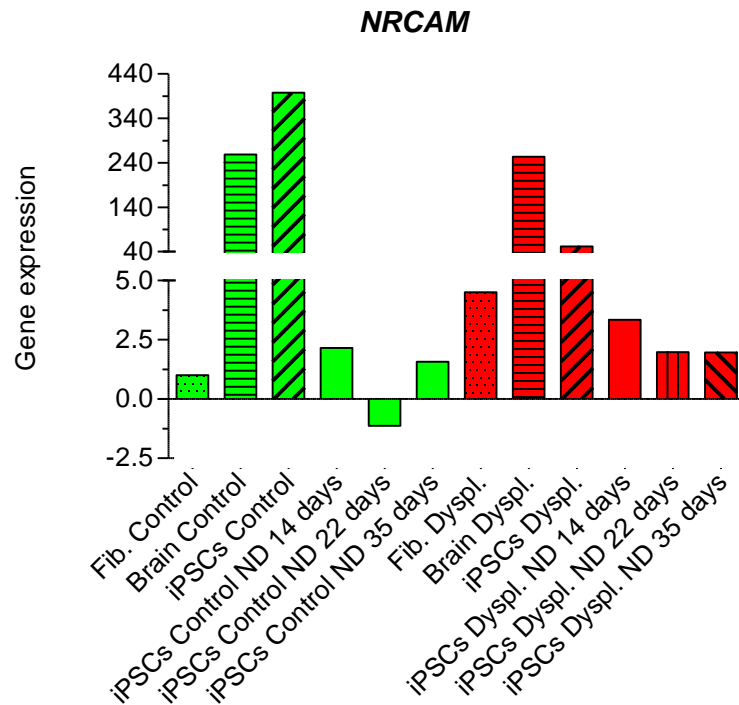
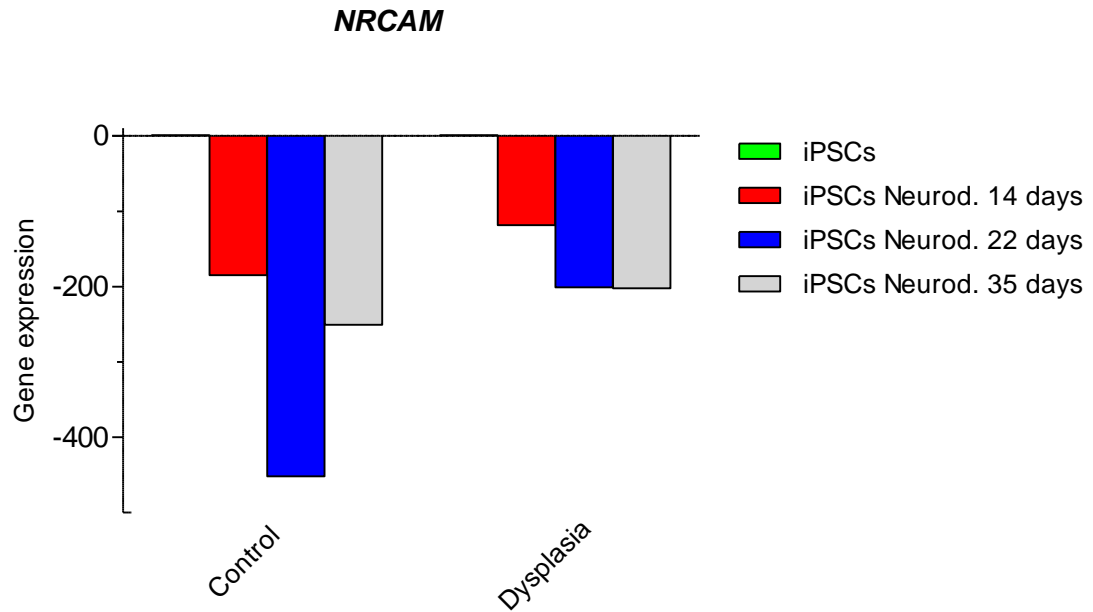


Figura 44 - Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene *NRCAM* durante a neurodiferenciação das iPSCs. Os resultados estão apresentados utilizando como calibrador iPSCs não diferenciada.



4.5.12. *PAX5*

Em relação ao gene *PAX5*, o tecido cerebral controle expressou 34,07 vezes mais o gene em comparação com o tecido cerebral displásico (Figura 45). Houve uma diminuição da expressão na neurodiferenciação por 14 dias dos indivíduos controle comparados com os indivíduos displásicos (334,58 vezes menos) (Figura 46).

Figura 45 - Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene *PAX5* e todos os grupos do estudo. Os resultados estão apresentados utilizando como calibrador fibroblastos do grupo controle.

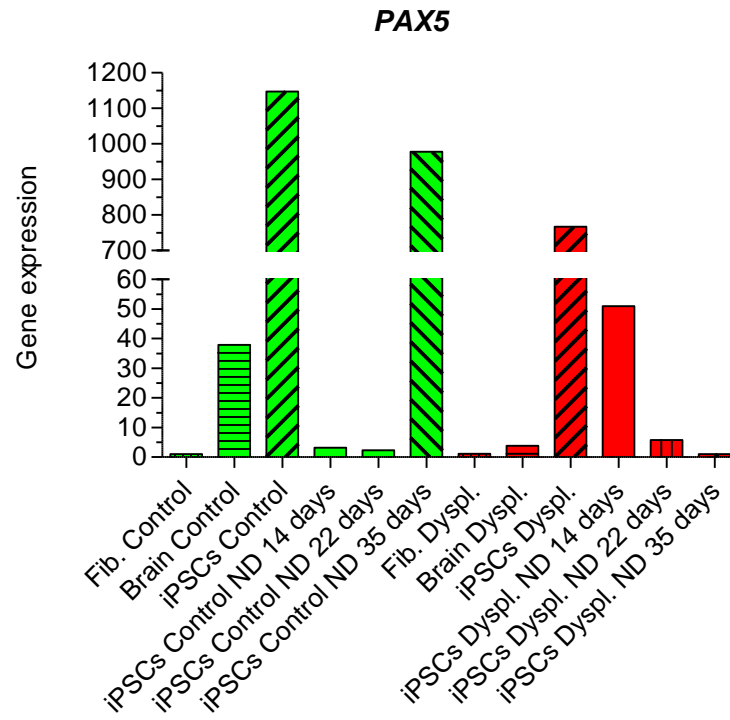
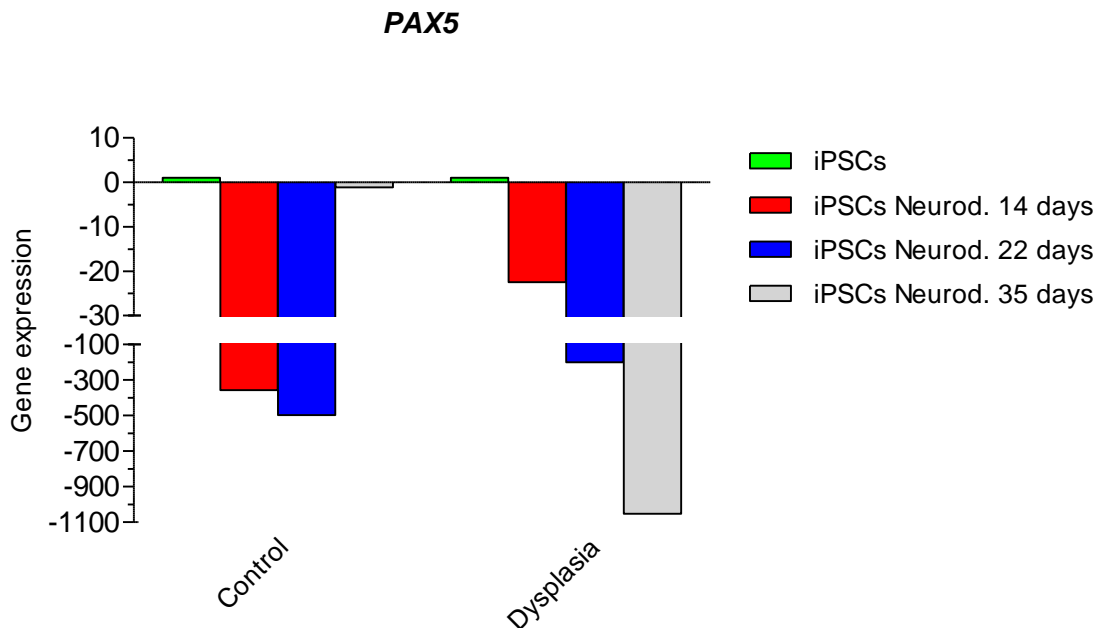


Figura 46 - Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene *PAX5* durante a neurodiferenciação das iPSCs. Os resultados estão apresentados utilizando como calibrador iPSCs não diferenciada.



4.5.13. *STX1A*

A expressão do gene *STX1A* nas células iPSCs dos indivíduos controle foi 4,23 vezes maior em relação as células iPSCs dos indivíduos displásicos, utilizando fibroblasto como calibrador da reação (Figura 47). No grupo displásico, a expressão do gene nas células neurodiferenciadas por 35 dias foi 88,91 menos expresso em comparação ao grupo controle (Figura 48).

Figura 47 - Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene *STX1A* e todos os grupos do estudo. Os resultados estão apresentados utilizando como calibrador fibroblastos do grupo controle.

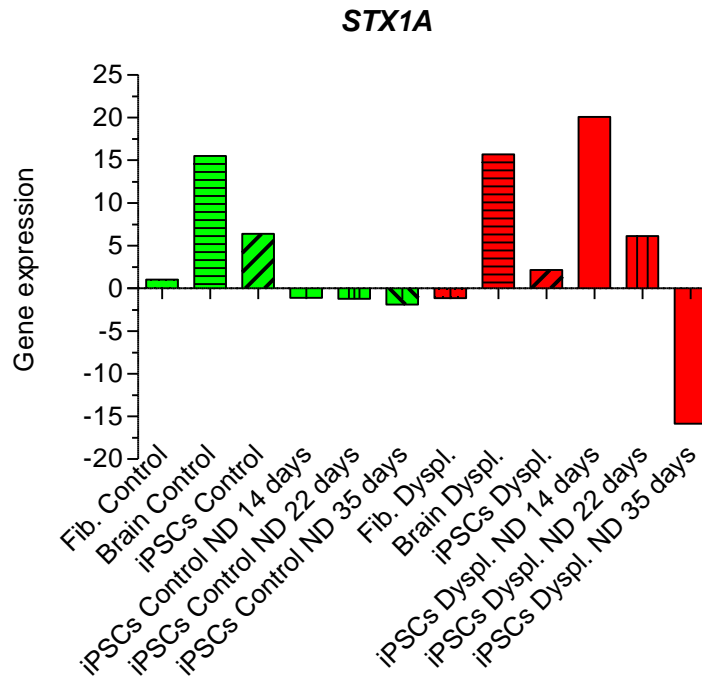
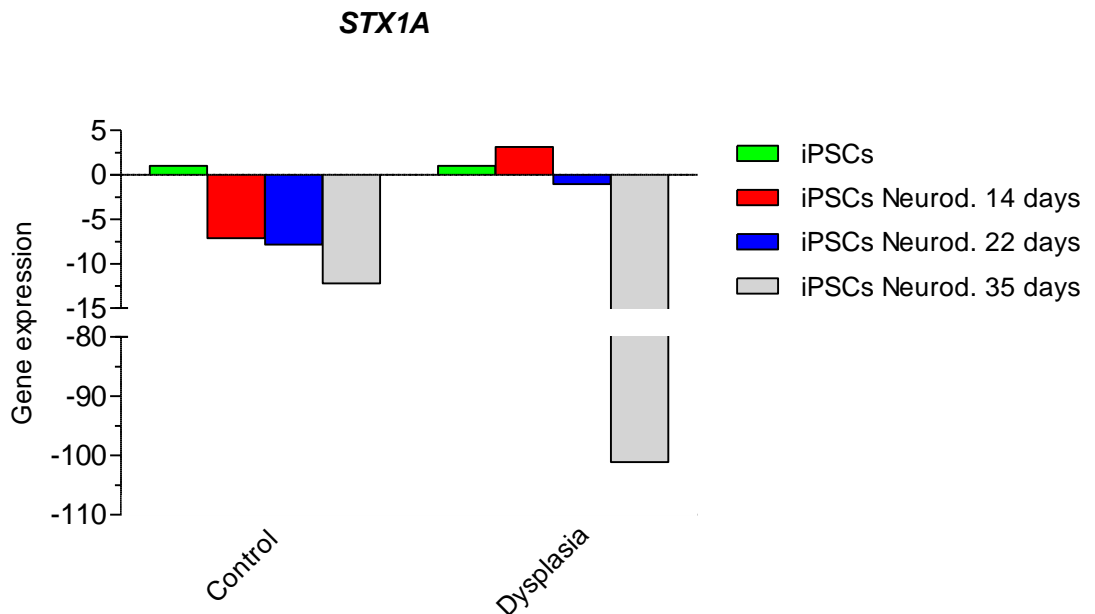


Figura 48 - Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene *STX1A* durante a neurodiferenciação das iPSCs. Os resultados estão apresentados utilizando como calibrador iPSCs não diferenciada.



5. DISCUSSÃO

As Displasias Corticais Focais são malformações do desenvolvimento do córtex cerebral e é a causa mais comum de epilepsia. Nos últimos 20 anos foi estabelecido uma clara associação entre DCF e epilepsias resistentes ao tratamento medicamentoso (IFFLAND & CRINO, 2017). Até o momento, um biomarcador molecular ou celular para a doença é desconhecido, bem como sua causa. Tanto fatores genéticos como adquiridos podem estar envolvidos na patogênese da displasia cortical, compartilhando um fenótipo e uma possível origem com outras malformações corticais. Assim como demais doenças do SNC, a displasia cortical gera repercussões físico e psicossociais, além de alto custo tanto para o paciente como para a sociedade. Com os avanços da neuroimagem, da genética e do uso de diferentes modelos celulares, será possível aprofundar o conhecimento da doença como um todo, permitindo, no futuro, fornecer um tratamento farmacológico e/ou cirúrgico mais bem sucedido. Apesar dos avanços significativos, infelizmente os tratamentos clínicos curativos ainda são escassos (ICHIDA & KISKINIS, 2015).

Neste estudo, trabalhamos com as possíveis diferenças na neurogênese e neurodiferenciação embrionária entre indivíduos acometidos pela DCF do tipo Taylor e indivíduos normais a partir de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs). As análises foram feitas através da quantificação da expressão de 14 genes envolvidos no processo de neurodiferenciação, nos tecidos cerebrais, nos fibroblastos, nos clones de células iPSCs e nos diferentes períodos da neurodiferenciação das iPSCs neurodiferenciadas tanto nos indivíduos displásicas quanto nos normais.

O uso de modelos celulares, como as iPSCs e os organóides, vem possibilitando a investigação dos mecanismos no contexto do neurodesenvolvimento embrionário e estudo patológico individualizado para cada indivíduo, considerando sua personalidade genética única (ICHIDA & KISKINIS, 2015). A ferramenta utilizada neste estudo consiste na geração de células tronco pluripotentes induzidas através da reprogramação celular, técnica essencial para o estudo do neurodesenvolvimento na DCF desenvolvida por Takahasi e Yamanaka. Esta técnica consiste em oferecer às células os quatro genes capazes de conferir pluripotência. O Kit CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming utilizado no presente estudo, utiliza vetores virais não integrativos e que não apresentam influência sobre o genoma da célula hospedeira, promovendo a entrada desses genes ao interior das células (FUSAKI et al., 2009). O

kit de reprogramação utiliza o vírus respiratório Sendai (SeV - do inglês *Sendai Virus*), vetores baseados em uma forma modificada e não transmissível, inserindo, com segurança e eficácia, nas células, os genes essenciais necessários para conferir pluripotência, reprogramando células somáticas em células iPSCs. Os vetores não requerem a integração dos genes transfectados no genoma do hospedeiro para que possam passar a ser expressos juntamente com os demais genes da célula, mas podem integrar o genoma hospedeiro de forma não programada causando algum tipo de transtorno. Além dos vetores não integrativos, como por exemplo, os vetores adenovirais, adeno-associados e plasmidiais, existem os vetores retrovirais que requerem a integração. Diferente da transfecção genética, a reprogramação celular também pode ser realizada de outras formas, como por exemplo, através da indução química que possibilita gerar células iPSCs a partir de células somáticas.

As reprogramações celulares foram bem sucedidas ao longo dos experimentos. Os clones apresentaram morfologia e tamanho adequados dentro dos períodos esperados. Todos os clones foram caracterizados por imuno-histoquímica utilizando um perfil relacionado à pluripotência e autorenovação celular através da marcação positiva para os marcadores específicos Nanog, Sox2, Oct4, TRA1-60 e TRA1-81, confirmando a geração das células-tronco pluripotentes induzidas.

Os clones mantidos em cultura foram observados quanto sua morfologia, mantendo-os livres de áreas de diferenciação e realizando as passagens celulares quando preciso. Clones que perderam o potencial de pluripotência, com áreas de diferenciação, organização e afrouxamento das células e por se diferenciarem de forma espontânea, foram descartados.

Naturalmente, os clones tem a tendência de diferenciar-se, e em contato com meios de indução, são capazes de gerar células e tecidos oriundos dos três folhetos embrionários *in vitro* e teratoma *in vivo* (ITSKOVITZ-ELDOR et al., 2000; MULLER et al., 2010). Neste estudo, os clones foram induzidos a neurodiferenciação obtendo uma cultura primária de neurônios, e não um tipo específico de neurônio, como por exemplo, dopaminérgico, GABAérgico, ou células da glia. Logo, não houve a identificação de possíveis subtipos de neurônios ou neurônios em diferentes fases de neurodiferenciação. A neurodiferenciação foi estimulada principalmente pelo fator BDNF em cultivo com meio basal para células nervosas. Obter glias ou neurônios maduros requer diferenciações por longos períodos (EIRAKU et al., 2008;

NITYANANDAM & BALDWIN, 2015), podendo promover o aumento da heterogeneidade das células no ambiente de cultivo, e a possibilidade de obter-se células em diferentes estágios de diferenciação (SANDOE & EGGAN, 2013).

Em nosso protocolo de neurodiferenciação, primeiramente realizou-se a dissociação dos clones de iPSCs, para então cultivar sob indução a diferenciação neural por no máximo 35 dias. Nos diferentes períodos avaliados, 14, 22 e 35 dias, realizou-se as análises moleculares dos 14 genes.

As células sob indução neural por 14 dias não apresentaram diferenças morfológicas, porém, com 22 dias de neurodiferenciação, as células começaram a adquirir morfologia semelhante a células nervosas, com prolongamentos que lembram axônios e dendritos neuronais. As células com 35 dias de neurodiferenciação apresentaram prolongamentos ainda mais extensos, com tendência a interligarem-se, gerando uma espécie de rede de comunicação entre as células.

Para a análise qualitativa e amostral ao final da neurodiferenciação, utilizou-se o marcador FluoroPan Neuronal Marker, marcador específico de células nervosas, através de imunofluorescência. Este marcador alcança uma completa marcação morfológica das células, reagindo contra proteínas específicas nucleares, dendríticas e axonais distribuídas em toda cito-arquitetura nos neurônios.

Nas diferentes etapas de neurodiferenciação, 14, 22 e 35 dias, não se observou diferenças no comportamento e na morfologia entre as células dos dois grupos: displásicos e controle. Logo, através deste estudo *in vitro* podemos inferir que a DCF não interfere no estado morfológico e de polarização de um neurônio.

Segundo Kuzniecky (2015), a relação entre alterações genéticas e diversos tipos de malformações corticais, envolvidos nos principais estágios do desenvolvimento do SNC, tem sido abordada em diversos estudos. Diferentes genes, até o momento mais de 100, já foram associados às MDCs, evoluídos principalmente na proliferação celular, migração neuronal, organização cortical tardia, regulação do ciclo celular, especialmente nas divisões celulares, apoptose, especificação de destino celular e estrutura e função do citoesqueleto (PARRINI et al., 2016; LEE et al., 2012). Consequentemente, estas alterações no SNC podem afetar não somente o padrão da malformação cortical como também o local onde o córtex pode ser afetado (KUZNIECKY, 2015). No presente estudo, abordamos 14 diferentes genes que foram analisados durante a neurogênese e neurodiferenciação

embrionária, envolvidos na migração e diferenciação neural, aspectos sinápticos: transmissão sináptica, sinaptogênese, axiogênese e sinalização Notch.

Quanto aos indivíduos participantes do estudo, incluiu-se dois indivíduos acometidos pela DCF do tipo Taylor, mais especificadamente, IIb. O diagnóstico se deu através de exames de imagem e EEG, e confirmação de homogeneidade e do tipo de DCF através da análise histopatológica, permitindo o pareamento dos envolvidos. Os indivíduos participantes são de sexos opostos e possuem uma grande diferença de idade, sendo um paciente adulto e o outro paciente pediátrico. No momento da coleta da biópsia de pele, o indivíduo do sexo masculino possuía 45 anos (Pct 01), e o do sexo feminino, 12 anos (Pct 02). Ambos os pacientes foram submetidos à ressecção de tecido cerebral displásico.

Com a melhoria das técnicas de imagem cerebral de resolução superior, 3 Tesla MRI, por exemplo, a DCF vem sendo identificada com mais facilidade e, como se acreditava, está claramente ligada ao início das convulsões (CRINO, 2011), geralmente no início da infância, na primeira década de vida (TASSI et al., 2001). Para cessar as convulsões da DCF na vida do indivíduo, principal manifestação clínica, é necessária a ressecção completa da zona epileptogênica. Segundo Anderson (2011), as crises podem diminuir com o avançar da idade devido à perda de tecido epileptogênico e diminuição do número de transportadores relacionados ao desenvolvimento de resistência às drogas.

As crises epiléticas refratárias ao tratamento medicamentoso estavam presentes nos dois indivíduos do estudo. Segundo o sistema de monitoramento de crises por vídeo EEG, houve alterações epileptiformes em ambos indivíduos. O Pct 01 apresentou atividade rítmica na região frontal direita, no início das crises, e o Pct 02 apresentou alterações epileptiformes e ondas lentas com distribuição multifocal, envolvendo o quadrante posterior direito, mas também o quadrante anterior esquerdo, com máximo na região frontal esquerda.

A literatura descreve diversos esquemas claros para distinguir as diferenças histopatológicas entre os subtipos DCF, mas são poucos os estudos que mostram que os subtipos de DCF possuem respostas diferentes à cirurgia de epilepsia (MUHLEBNER et al., 2014; KIM et al., 2012). Indivíduos com lesões maiores tendem a apresentar sintomas mais cedo do que indivíduos com lesões menores (ABDIJADID et al., 2015). Uma meta-análise sugere que a DCF do tipo II pode garantir um resultado cirúrgico mais favorável (ROWLAND et al., 2012),

provavelmente porque na DCF do tipo I é mais difícil delimitar a lesão e alcançar uma ressecção cirúrgica completa (HEMB et al., 2010; KRSEK & MATON et al., 2009; LERNER et al., 2009). A DCF do tipo II é facilmente visualizada por MRI e manifesta sintomas mais cedo comparada a DCF do tipo I. Além disso, crianças com DCF do tipo I são mais propensas a apresentar retardado mental e comportamentos desajustados mais frequentes em comparação a crianças com DCF do tipo II (KRSEK & PIEPER et al., 2009). Segundo Andres et al (2005), indivíduos pediátricos com DCF apresentam um aumento no número de neurônios nas camadas superiores do córtex, especificamente na substância branca. Já em indivíduos adultos com DCF, há uma redução na densidade neuronal global em comparação a um córtex normal (THOM et al., 2005). A perda de mielinização é frequentemente observada em indivíduos com DCF do tipo II, especialmente o tipo IIb, evidenciado pela palidez vista com coloração Luxol-Fast-Blue e uma cauda de células que se estendem para a substância branca frequentemente vista na ressonância magnética (IFFLAND & CRINO, 2017).

O neurodesenvolvimento cortical em humanos é um processo longo e complexo, susceptível a erros de desenvolvimento que envolve o nascimento de neurônios, seu crescimento e diferenciação, migração para seu destino final e formação de sinapses (ABDIJADID, et al., 2015; KOSTOVIC & RAKIC, 1990; KOSTOVIC & RAKIC, 1980). Os processos de desenvolvimento sobrepostos no desenvolvimento embrionário e fetal do sistema nervoso (SN) têm sequências precisas, geneticamente programadas, não apenas para a morfogênese, mas também para o início e a janela de oportunidade de cada processo. O córtex cerebral se forma entre as semanas gestacionais 8 e 20 por um processo altamente orquestrado, controlado por numerosos genes reguladores. Estes processos são programados por genes específicos com interações complexas com outros genes. Os genes organizadores programam o desenvolvimento inicial, como gastrulação e neurulação, já os reguladores, programam processos posteriores, como sinaptogênese, mielinização, biossíntese de neurotransmissores e maturação neuronal. Os genes organizadores geralmente são os mesmos que os reguladores, atendendo diferentes finalidades em diferentes estágios de desenvolvimento. Logo, os 14 genes analisados neste estudo estão envolvidos em mais de um processo do desenvolvimento neural (SARNAT & MENKES, 2000).

O “timing” é primordial para o início e sincronização de cada processo de desenvolvimento na morfogênese do tecido. A detenção, o atraso e a precocidade matriciais são condizentes a disfunções neurológicas e podem determinar diferentes malformações. O tempo dos ciclos mitóticos nas mutações somáticas, por exemplo, pode distinguir Hemimegalencefalina da DCF tipo II. O “timing” sempre deve ser considerado na interpretação das disgêneses cerebrais (SARNAT et al., 2015).

O sucesso da migração neuronal envolve diversos estágios: saída inicial dos neuroblastos da ZV, motilidade por migração para a placa cortical (PC) e, finalmente a parada da migração na camada apropriada. Interrupções em qualquer um desses estágios resultam em MDCs (PANG, et al., 2008). Uma das principais especulações frente das displasias corticais está relacionada, de uma forma ainda não bem esclarecida, a possíveis alterações no processo de migração celular durante o neurodesenvolvimento embrionário. A localização heterotópica de células normais e anormais entre o córtex e a substância branca na DCF, é uma característica que aponta claramente a presença de um defeito migratório ou apoptótico na doença.

As células precursoras neurais podem sofrer divisões celulares em padrões simétricos e assimétricos (PANG et al., 2008). A divisão celular simétrica produz duas células filhas idênticas que continuam a se dividir de forma semelhante e servem para reabastecer a população de células progenitoras. A divisão celular assimétrica leva a dois tipos diferentes de células: 1. células progenitoras que reentram no ciclo celular, 2. células neuronais imaturas, os neuroblastos, que migrarão para a placa cortical subjacente. Conseqüentemente, ocorre a alteração das concentrações de Notch e Numb no interior da célula, estimulando-a a tornar-se madura para migração ou então manter-se como uma célula precursora (BEAR, 2008).

A identidade dos estímulos os quais os neuroblastos são sensíveis e os mecanismos pelos quais eles atuam não são claros, mas provavelmente estão envolvidos na interação de neurônios migratórios com outros neurônios que atingiram a identidade laminar e regional (MCCONNELL & KAZNOWSKI, 1991; REDIES & TAKEICHI, 1996). Neuregulinas e seus receptores são expressos por neurônios e glia e são importantes para migração neuronal normal (RIO et al., 1997). Além disso, a proteína neuronal astrotactina fornece a ligação neuronal à glia radial durante a migração e a sua remoção diminui a locomoção neuronal.

Durante a migração, os neuroblastos devem ter a capacidade de se aderir e seguir pela glia radial que os guiam, fornecendo um direcionamento. Para garantir uma orientação correta, os neuroblastos fazem contato com a superfície ventricular antes de migrar para a PC (ANDERSON et al., 1997). Os neurônios migratórios devem parar em sua posição laminar apropriada, uma vez que atingem a placa cortical. (KRIEGSTEIN & NOCTOR, 2004; METIN et al., 2006)

Conforme nossos resultados, no geral, todos os genes envolvidos na migração neural, *ASCL1*, *DCX*, *NEUROG2*, *NFL*, *NRCAM* apresentaram nos diferentes grupos avaliados (fibroblastos, tecido cerebral, iPSCs e células neurodiferenciadas), expressões bem diferentes comparando os indivíduos displásicos com os saudáveis, utilizando como calibrador fibroblastos do grupo controle. O que está de acordo com a hipótese prevalente de que a DCF é originária da migração anormal durante o período embrionário (NAJIM et al., 2007; YING et al., 2005). Possivelmente essas diferenças podem ser explicadas pelos seguintes motivos e características da DCF: prisão maturacional antes que os neuroblastos migratórios radiais atinjam a placa cortical, ou seja, as células migratórias não atingiram o local alvo pretendido no córtex cerebral, mas pararam dentro da substância branca subcortical formando uma heterotopia como grupos de neurônios ou neurônios individuais aparentemente isolados. Como também por motivos de prisão maturacional devido à adesão dos neuroblastos às fibras glias radiais defeituosas, muitas vezes por causa de uma molécula de adesão celular defeituosa da matriz intercelular (MAGLIOCCO et al., 1992). Como por exemplo, defeitos na proteína astrotactina, onde sua remoção diminui a locomoção neuronal. Outro aspecto relevante a ser considerado e que pode ter ocorrido no tecido cerebral dos indivíduos displásicos é a destruição de células nervosas e glias radiais, interrompendo as células migratórias no meio de sua jornada, incapazes de viajar além do local adequado por consequências das crises epiléticas (SARNAT, 1992).

O primeiro passo da regulação molecular do desenvolvimento do cérebro é a determinação do destino das células através da indução neural de células indiferenciadas (RAKIC, 1988). Este processo prossegue em resposta a uma série de sinais ou fatores de transcrição, que são expressos em diferentes eixos e em momentos específicos que levam a diferenciação neural.

Em relação à origem dos diferentes tipos de células do SNC, Lillien et al (1998) demonstraram que tanto a descendência glial como a neuronal podem surgir

do mesmo neurônio precursor ou "célula-tronco" neural. Há também evidências de que existe uma sequência de diferentes estados de células progenitoras que se desenvolvem em resposta a diferentes moléculas reguladoras. Por exemplo, nos estágios iniciais do desenvolvimento, os progenitores corticais são multipotentes em relação aos destinos laminares, enquanto em estágios posteriores de desenvolvimento eles perdem a capacidade de responder aos sinais que indicavam os destinos mais específicos, das camadas anteriores (MCCONNELL, 1995). Entender como essas células multipotentes se tornam restritas a destinos celulares mais específicos ajudarão a compreender os possíveis mecanismos subjacentes ao DCF.

Nossos resultados relacionados aos genes envolvidos na diferenciação neural, *ASCL1*, *HES1*, *NEUROD6*, *NEUROG2*, *NRCAM* e *PAX5*, mostram grandes divergências nas expressões entre os indivíduos displásicos e controle. Provavelmente os indivíduos displásicos apresentam alterações na cascata complexa de sinais extracelulares que trabalham em sincronia para contribuir para a diferenciação e sobrevivência das células no SNC (FISHER, 1997). Assim como encontrado por Cotter et al (1999), a alteração nos níveis e o momento da exposição das células precursoras a esses fatores de crescimento pode ser relevante para a diferenciação neuronal anormal presente no DCF. Os fatores celulares intrínsecos também podem explicar os níveis de expressão diferentes entre os indivíduos displásicos e controle, pois atuam em células indiferenciadas regulando o destino neural. Como por exemplo, os fatores envolvidos na distribuição celular assimétrica e a herança de moléculas de sinalização que regulam o destino das células. Antes da neurogênese, o pool de progenitores é expandido através de uma série de divisões de células simétricas nas quais as duas células filhas entram novamente no ciclo celular como progenitores. No entanto, à medida que a neurogênese prossegue, há crescentes divisões assimétricas nas quais apenas uma célula filha passa a um destino neuronal (MC-CONNELL, 1995).

Nossos resultados vão de acordo com os estudos que demonstraram que o desenvolvimento cortical anormal pode ocorrer a nível de proliferação e diferenciação neuronal-glia durante a migração de neurônios para a placa cortical e durante a organização intracortical (PALMINI et al., 1991; ALONSO-NANCLARES, et al., 2005). Também vão de acordo com a possibilidade de que a diferenciação anormal nos indivíduos displásicos leva à ocorrência de células anormais na

displasia cortical, em particular neurônios dismórficos, células balonizadas e neurônios piramidais imaturos (ABDIJADID, et al., 2015).

A sinaptogênese, incluindo a formação da coluna dendrítica, envolve o momento de liberação de muitas moléculas específicas. O momento alterado pode ser parte do motivo da formação de sinapses tardias ou mesmo precoces. Proteínas relacionadas com os microtúbulos anormais também podem contribuir para atrasos na sinaptogênese, como por exemplo, a proteína Tau fosforilada que são reguladas positivamente na Hemimegalencefalia, no Complexo da Esclerose Tuberosa, na DCF tipo 2 e na Ganglioglioma (SARNAT et al., 2012; SARNAT & FLORES-SARNAT, 2014). A programação genética de tais moléculas pode ser alterada não apenas em doenças de mutação genética, mas também epigeneticamente, através da secreção hormonal inapropriada ou pela exposição fetal a neurotoxinas (CASTEJÓN, 2008).

Os diferentes níveis de expressão nos indivíduos displásicos em comparação aos indivíduos controle envolvidos na transmissão sináptica, *DLG4*, *FGF2*, *STX*, na sinaptogênese, *NEUROD6*, *NRCAM*, *STX*, e na axiogênese, *DCX*, *NOTCH1*, *NRCAM* provavelmente estão relacionados com a expressão alterada de neuroreceptores e locais de recaptção conforme já descrito em vários estudos para a DCF e que provavelmente contribuem para a excitabilidade intrínseca da DCF. Muito parecido com o sistema do citoesqueleto imaturo observado no tecido da DCF, o perfil de expressão dos neuroreceptores também pode refletir nos neurônios imaturos, tanto nos neurônios dismórficos citomegálicos como nas células balonizadas, baseado em análises imuno-histoquímicas (CEPEDA et al., 2006) e mRNA (CRINO et al., 2001).

Os genes que foram mais expressos nos indivíduos displásicos em relação ao grupo controle, podem, conseqüentemente, ter causado um atraso maturacional do cérebro, conforme encontrado por Back & Miller (2014) devido a sinaptofisina axoplasmática que permanece reativa mais do que o esperado. McClendon et al. (2014) verificou que a encefalopatia hipóxica/isquêmica pré-natal ou perinatal pode causar "desmaturação", ou seja, um atraso temporário com comprometimento das superfícies sinápticas em neurônios do córtex e do núcleo caudado.

A família de receptores transmembranares Notch é conhecida por sua função na neurogênese, via inibição lateral de células vizinhas (LEWIS, 1998). A via de sinalização Wnt é inibida pela atividade Notch através da ligação direta da cauda

citoplasmática de Notch à proteína Dsh (AXELROD et al., 1996). Por outro lado, a superexpressão de Dsh inibe a inibição lateral mediada por Notch na *Drosophila*. Assim, a sinalização Wnt e Notch exercem efeitos mutuamente antagônicos com o equilíbrio desta interação importante na determinação de destino das células (BLAIR, 1996). À medida que as vias de sinalização celular envolvendo as glicoproteínas Wnt (MCGREW et al., 1995) e a família de receptores transmembranares Notch (AXELROD et al., 1996) desempenham papéis importantes na determinação do destino celular e no desenvolvimento cortical, essas vias de sinalização podem ser vistas como candidatas para as mudanças de desenvolvimento observadas no cérebro no DCF.

Conforme nossos resultados, os diferentes níveis de expressão dos indivíduos displásicos envolvidos na sinalização Notch, *ASCL1*, *HES1*, *HEY1* e *NOTCH1* comparados aos indivíduos controle podem estar associados a alterações na distribuição de Notch1 nos neurônios Cajal-Retzius, neurônios de placas corticais responsáveis pela regulação da migração neuronal radial. Assim como observado por Wines-samuelson et al., (2005), que relatou que ratos com deficiência na proteína transmembranar PS1, envolvida na via de sinalização Notch e Wnt- β -catenin, desenvolvem displasia cortical global caracterizada pela grande migração de neurônios das placas corticais. A análise específica do tecido com DCF em humanos revelou níveis significativamente alterados de Notch-1 e Dvl-1, um efetor integral da via Wnt, nos neurônios anormais e nas células de balonizadas (Hartmann et al., 1999). Considerando o papel que Notch desempenha na especificação do destino neural embrionário, não é surpreendente que a via Notch desempenhe um papel em distúrbios na formação cortical.

O gene *ASCL1*, também conhecido como *MASH1*, é um fator de transcrição proneural que junto com membros da Família Neurogenin, como por exemplo, *NEUROG2*, são os principais reguladores da neurogênese em vertebrados. Análises de ganho e perda de função mostraram que ambos os genes são necessários e suficientes para induzir um programa completo de diferenciação neuronal (BERTRAND et al., 2002; WILKINSON et al., 2013). O gene *ASCL1* promove, sequencialmente, a proliferação e diferenciação ao longo da linhagem neuronal, controla diretamente vários estágios da neurogênese, incluindo diferenciação neuronal, migração, orientação axonal e formação de sinapse. Em condições de cultura em proliferação, o *ASCL1* endógeno regula a manutenção da proliferação

celular, enquanto que a superexpressão de *ASCL1* conduz a saída eficiente do ciclo celular e diferenciação neuronal (NAKADA et al., 2004; CASTRO et al., 2006; BERNINGER et al., 2007b; GEOFFROY et al., 2009). No córtex cerebral em desenvolvimento, o *ASCL1* regula aspectos precoce e tardio da neurogênese, incluindo a divisão de progenitores gliais radiais e a migração radial de neurônios pós-mitóticos (PACARY et al., 2013; 2011).

Nocaut de *ASCL1* em camundongos resulta em defeitos no desenvolvimento neural associados à redução da geração de neurônios (MARIN et al., 2000). Estudos recentes revelaram a capacidade do *ASCL1* de converter várias células somáticas não neurais (por exemplo, fibroblastos) em neurônios induzidos (BERNINGER et al., 2007a; VIERBUCHEN et al., 2010; KAROW et al., 2012).

Conforme nossos resultados, o protocolo de neurodiferenciação alterou os níveis de expressão de *ASCL1* de forma diferente nas células neurodiferenciadas dos indivíduos com DCF em comparação com as células do grupo controle. As células dos indivíduos portadores de DCF diminuíram bastante a expressão gênica durante os três períodos da neurodiferenciação, 14, 22 e 35 dias. Esta expressão alterada do gene presente durante os três períodos da neurodiferenciação pode ser explicada pela não saída eficiente do ciclo celular e atraso no início da diferenciação neuronal pelo fato do gene não ter sofrido uma superexpressão, diminuindo assim a transcrição proneural e neurogênese em relação aos indivíduos controle. Em relação ao tecido cerebral, os indivíduos displásicos apresentaram maiores níveis de expressão quando comparado ao tecido cerebral controle, mostrando que a superexpressão do gene foi tardia, demonstrando-se biologicamente ativos possivelmente após os 35 dias de neurodiferenciação, bem como no tecido cerebral.

Enquanto que os fatores proneurais conduzem a diferenciação neuronal, eles também ativam a via de sinalização Notch (LOUVI & ARTAVANIS-TSAKONAS, 2006). A via de sinalização Notch1 é importante na neurogênese do cérebro em desenvolvimento. É responsável por regular a auto-renovação e diferenciação neuronal (BREUNIG et al., 2007), a sobrevivência (SAURA et al., 2004) e a plasticidade neuronal (DE BIVORT et al., 2009; ZHANG et al., 2014). Sua atividade tem forte impacto na morfologia dos neurônios em desenvolvimento (WHITFORD et al., 2002). Esta via de sinalização promove uma divisão assimétrica de células progenitoras em uma célula-tronco neural e um neurônio diferenciado, através da inibição lateral (IMAYOSHI & KAGEYAMA 2011).

Os receptores Notch e seus ligantes são expressos no cérebro em desenvolvimento e no adulto (GIVOGRI et al., 2006), bem como nos dendritos de neurônios maduros (SIRICHOAT et al., 2015). O receptor Notch1 é crucial para a aprendizagem e memória em adultos. Os fatores proneurais ativam diretamente a transcrição dos ligantes Notch, que interagem com os receptores transmembrânicos Notch nas células vizinhas (CASTRO et al., 2006; HENKE et al., 2009). Este evento resulta na clivagem e liberação do domínio intracelular Notch, da membrana celular para o núcleo, onde forma um complexo de ligação ao DNA e coativadores adicionais. Os alvos diretos deste complexo incluem os repressores de transcrição *bHLH*, como por exemplo, *Hes1* e *Hes5*, que por sua vez se ligam aos promotores de genes proneurais, reprimindo sua expressão e, assim, inibindo a diferenciação neuronal (KAGEYAMA et al., 2005). Desta forma, os genes proneurais são tanto reguladores e regulados pela via de sinalização de Notch, uma rede que funciona em paralelo com o programa de diferenciação para manter as células adjacentes indiferenciadas, mesmo que seja transitório.

As células iPSCs dos indivíduos displásicos apresentaram níveis de expressão de *Notch1* maiores quando comparado com os indivíduos controle, utilizando como calibrador fibroblastos do grupo controle. Durante o protocolo de neurodiferenciação, a expressão de *Notch1* nos dias 14 e 22 do protocolo de neurodiferenciação foram semelhantes entre os dois grupos. Porém, é possível perceber um aumento na expressão nos 35 dias de neurodiferenciação dos indivíduos displásicos comparado com os indivíduos controle. Considerando que nos pacientes displásicos, houve um aumento de expressão do fator proneurais *ASCL1* e uma diminuição de *Notch1*, possivelmente há algo de errado no sistema de ativação dos genes, visto que *Notch1* é ativado diretamente pelos fatores proneurais. Este aumento na expressão e atividade de *Notch1* nos indivíduos displásicos pode impactar na morfologia dos neurônios em desenvolvimento, conforme proposto por Whitford et al. (2002), o que pode explicar a presença de neurônios dismórficos caracterizados por apresentar orientação anormal, alteração do formato piramidal refletindo anormalidade do citoesqueleto e aumento de tamanho.

Como mencionado anteriormente, a clivagem e liberação do domínio intracelular *Notch*, da membrana celular para o núcleo, forma um complexo de ligação ao DNA e coativadores adicionais. Os alvos diretos deste complexo incluem

os repressores de transcrição *bHLH*, como o *Hes1* e *Hes5*, que por sua vez se ligam aos promotores de genes proneurais, reprimindo sua expressão e, assim, inibindo a diferenciação neuronal (KAGEYAMA et al., 2005). O gene *HES1* é expresso em células progenitoras neuronais durante as fases proliferativa e de neurogênese cortical, realizando a manutenção destas células e sua diferenciação em vários tecidos e órgãos (CIARAPICA, et al., 2013; HARADA et al., 2013). A regulação precisa da expressão de *HES1* desempenha um papel crucial na neurogênese do adulto e no desenvolvimento do SNC (IMAYOSHI et al., 2010). Sabe-se que em uma variedade de tipos de células (por exemplo, fibroblastos), os níveis de expressão de *HES1* alternam regularmente ao longo do tempo devido à sua capacidade de se comportar como um oscilador intrínseco (HIRATA et al., 2002; MASAMIZU et al., 2006; KOBAYASHI et al., 2009).

O gene *HES1* desempenha um papel essencial no desenvolvimento do SN em embriões de camundongos (KAGEYAMA et al., 2000) e regula a diferenciação das células-tronco embrionárias (CTE) através da superexpressão da sinalização Notch (KOBAYASHI & KAGEYAMA, 2010). A expressão do gene efetor Notch *HES1* é necessário para a manutenção de progenitores neuronais no cérebro embrionário, mas a expressão persistente de *HES1* inibe a proliferação e diferenciação destas células (SHIMOJO et al., 2008). Além disso, sua diminuição de expressão promove a diferenciação de precursores neuronais em neurônios maduros. A manutenção e a proliferação de precursores neuronais requerem o sinal Notch "on" (BAI et al., 2007).

Hes1 reprime seu próprio promotor em um mecanismo de feedback, que associado à transcrição e proteína *Hes1* de curta duração, resulta em oscilações autônomas de sua expressão com um período de 2-3 horas. Há evidências de que a atividade de *HES1* promove e inibe o ciclo celular e, portanto, sua oscilação pode ser necessária para a proliferação celular (CASTELLA et al., 2000; HARTMAN et al., 2004; Sang et al., 2008).

O padrão de expressão dos fatores proneurais é percebido como um instantâneo de um modo de expressão dinâmico. Os fatores proneurais são, portanto, expressos em progenitores neurais em diferentes estágios de diferenciação e não apenas em progenitores comprometidos que logo se tornarão pós-mitóticos, como se pensava anteriormente (VASCONCELOS & CASTRO, 2014).

As células iPSCs dos indivíduos controle apresentaram elevados níveis de expressão do gene *HES1*, quando comparado com os indivíduos portadores de

DCF, utilizando como calibrador fibroblastos do grupo controle. O protocolo de neurodiferenciação apresentou níveis de expressão de *HES1* semelhantes entre os grupos durante as diferentes fases, 14, 22 e 35 dias da neurodiferenciação. Demonstrou-se recentemente que *HES1* oscila em progenitores neurais (SHIMOJO et al., 2008), explicando os valores de expressão divergentes entre as células iPSCs, que neste caso representam os progenitores neurais, dos indivíduos controle e displásico.

O gene *NEUROG2*, assim como o *ASCL1*, é um fator de transcrição proneural essencial no início da diferenciação neuronal de precursores neuronais e é suficiente para gerar neurônios a partir de CTEs de ratos. Embora o *NEUROG2* seja um fator chave na determinação de tipos de células neuronais e seu padrão de expressão seja fortemente regulado, apenas alguns fatores são conhecidos por regular sua expressão (LIU et al., 2013).

Este gene inicia uma primeira onda de neurogênese e é expresso em uma população precoce de células migratórias da crista neural. Pode especificar um destino neuronal em células ectodérmicas e são expressos em células progenitoras neuronais no SNC e periférico (SNP) em desenvolvimento (National Center for Biotechnology Information <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/63973>> Acessado em: 27 de Setembro de 2016).

ASCL1 e *NEUROG2* direcionam a diferenciação de populações específicas de neurônios em vários momentos e locais dentro do SN em desenvolvimento. Após a indução, *ASCL1* e *NEUROG2* são responsáveis pelas alterações morfológicas e imunocitoquímicas consistentes com o início da diferenciação neuronal (AHN et al., 2015).

O aumento da expressão das proteínas *ASCL1* e *NEUROG2* tem sido utilizado para gerar populações específicas de neurônios tanto a partir de fibroblastos humanos como de células-tronco (LIU et al., 2013). Os neurônios resultantes apresentam características neuronais genéricas, como expressão de marcadores pró-neural, processos dendríticos e/ou axônicos elaborados, ligações sinápticas e a capacidade de gerar e conduzir sinais elétricos (CASTRO et al., 2011).

As células iPSCs dos indivíduos controle apresentaram níveis extremamente elevados de expressão de *NEUROG2* quando comparado aos indivíduos displásicos, cerca de 495 vezes mais, utilizando fibroblasto como calibrador da

reação, refletindo a intensa atividade proliferativa do gene desencadeada durante o período embrionário.

Durante o protocolo de neurodiferenciação por 35 dias, nos indivíduos com DCF, ocorreu uma diminuição na expressão de *NEUROG2* comparado aos indivíduos controle. Considerando que o gene *NEUROG2* é essencial na determinação dos diferentes tipos de células neuronais, responsável pelas alterações morfológicas e imunocitoquímicas e atuam desde o início da diferenciação neuronal até populações específicas de neurônios (LIU et al., 2013; AHN et al., 2015), provavelmente este desequilíbrio envolve um conjunto de eventos altamente complexos e organizados, incluindo a proliferação de células-tronco neurais, a migração e a diferenciação neuronal. O desequilíbrio desses vários estágios podem resultar em MCD, conforme resultados encontrados no nosso estudo (PANG et al 2008).

O gene *DCX*, também é conhecido como *XLIS*. A proteína codificada é estabilizadora de microtúbulos, essencial para estimular a migração neuronal durante o desenvolvimento do cérebro humano, particularmente nas células migratórias da ZV e da PC (GLEESON et al. 1998). Esta proteína regula os microtúbulos em resposta a sinais extracelulares nestas zonas distais, facilitando a localização durante o desenvolvimento embrionário (JEAN, BAAS, & BLACK, 2009). *DCX* também é essencial para a diferenciação neuronal e para a neurogênese no cérebro adulto (JIN et al., 2010).

É o segundo maior gene associado à lisencefalia clássica. A proteína codificada interage com o *LIS1*, que regula o fator de ativação das plaquetas acetilhidrolase, e esta interação é importante para a função adequada dos microtúbulos no córtex em desenvolvimento (DES PORTES et al., 1998b). Mutações no gene *DCX* podem causar a Síndrome do Córtex Duplo, migração anormal de neurônios durante o desenvolvimento e interromper a camada do córtex, levando, por exemplo, à epilepsia ou retardo mental (JAMUAR et al., 2014).

As células iPSCs dos indivíduos controle apresentaram níveis de expressão de *DCX* bastante maiores, quando comparado com os indivíduos displásicos. Logo após, durante a neurodiferenciação por 22 e 35 dias, ocorre uma inversão, onde há um aumento na expressão do gene dos indivíduos displásicos. A proteína codificada por este gene é essencial para estimular a migração durante o desenvolvimento do cérebro humano e segundo nossos resultados apresenta altos níveis nas células

iPSCs de indivíduos saudáveis. Provavelmente elevados níveis de expressão do gene somente são necessários nos estágios posteriores a neurodiferenciação, isto é, na maturação neural. Possivelmente encontraríamos níveis deste gene aumentados se estas culturas fossem direcionadas a diferenciação terminal em tipos neuronais específicos. Já a expressão antecipada em altos níveis durante a neurodiferenciação dos indivíduos displásicos, demonstram um aumento da potencialidade precoce de migração das células dos indivíduos portadores de DCF, podendo acarretar danos à migração celular. Através deste cenário, podemos inferir que, durante a neurogênese cortical, os neuroblastos de indivíduos portadores de DCF, iniciam sua fase de migração antes do período fisiologicamente típico. Logo provavelmente estas células não estão aptas à migração ou a estrutura do arcabouço radial ainda não está plenamente formada para o processo, dificultando a chegada dessas células ao seu destino específico. Uma das principais especulações frente das displasias corticais está relacionada, de uma forma ainda não bem esclarecida, a possíveis alterações no processo de migração celular durante o neurodesenvolvimento embrionário.

O gene *DLG4*, também conhecido como *PSD95*, está associado às moléculas das membranas sinápticas. São importantes no estabelecimento e na função das sinapses e são componentes típicos de pós-sinapses glutamatérgicas no hipocampo (HEIFETS & CASTILLO, 2009)

A proteína codificada por este gene é um dos principais constituintes da densidade pós-sináptica excitatório no SNC, e está diretamente envolvida na plasticidade sináptica. Sua expressão pode induzir um aumento acentuado no volume da coluna vertebral e um aumento da densidade pós-sináptica.

A maturação do citoesqueleto foi correlacionada com a expressão das proteínas nucleares NeuN e de superfície celular *DLG4*, características dos fenótipos neuronais maduros (VUONG et al., 2016).

Tanto as células iPSCs e os tecidos cerebrais dos indivíduos portadores de DCF quanto dos indivíduos saudáveis apresentaram níveis de expressão do gene *DLG4* bastante semelhantes, assim como durante o protocolo de neurodiferenciação por 14 e 22 dias. Já durante o intervalo de neurodiferenciação por 35 dias houve uma expressão aumentada do gene nos indivíduos displásicos em comparação com os indivíduos controle. Estes níveis elevados de expressão *DLG4* na terceira fase da neurodiferenciação pode estar relacionada com a expressão alterada de

neuroreceptores e locais de captação descrito em vários estudos envolvendo indivíduos acometidos pela DCF e provavelmente contribui para a doença através do desenvolvimento de neurônios imaturos (MARIN-VALENCIA et al., 2014). Alterações nos neuroreceptores e locais de captação também foi demonstrado no gene *STX*, no presente estudo.

O gene *FGF2*, também conhecido como *BFGF* codifica uma proteína envolvida no desenvolvimento dos membros e do SN, na cicatrização de feridas e no crescimento de tumores. Atua na neuroproteção após insultos cerebrais, na isquemia, epilepsia, neurogênese e na diferenciação neuronal e glial no SNC em desenvolvimento (UEDA, 2011).

O estudo de Gonzalez et al (1990) demonstrou a expressão de *FGF2* em neuroblastos e glioblastos na placa cortical utilizando cérebros fetais humanos com 12 a 16 semanas de gestação. No cérebro de ratos, a expressão de *FGF2* foi demonstrada em ZV, ZSV e no córtex cerebral na fase embrionária e posteriormente em astrócitos, mas não em neurônios, exceto no hipocampo e córtex no período pós-natal (GONZALEZ et al., 1990). Em um estudo *in vivo*, a administração contínua de *FGF2* causou a perda de oligodendrócitos formadores de mielina no SNC adulto, enquanto a exposição a uma dose única de *FGF2* aumentou a mielinização (AZIN et al., 2015).

As células iPSCs dos indivíduos controle e displásicos apresentam valores de expressão semelhantes, utilizando como calibrador fibroblastos do grupo controle. Logo, as células iPSCs dos indivíduos com DCF possuem uma taxa metabólica e atividade biológica de acordo com os indivíduos controle. Já no protocolo de neurodiferenciação por 35 dias, a menor expressão do gene dos indivíduos controle em relação aos displásicos demonstra que os indivíduos displásicos aumentaram os níveis de expressão do gene neste determinado período indicando um aumento na taxa metabólica.

O gene *HEY1* é expresso no SNC em desenvolvimento (SAKAMOTO et al., 2003). Sua expressão é induzida pelas vias de transdução de sinal Notch e c-Jun. *HEY1* é um potencial regulador da diferenciação e proliferação celular através da via Notch (NAKAGAWA et al., 2000). No cérebro em desenvolvimento, o aumento da expressão de *HEY1* e *HEY2* evita que os precursores neuronais se diferenciem durante o período neurogênico (SAKAMOTO et al., 2003).

Proteínas HEY são expressas em níveis elevados no gânglio da raiz dorsal do nervo espinhal em desenvolvimento e nos gânglios trigeminais (LEIMEISTER et al., 2000), mas sua atuação no desenvolvimento de gânglios sensoriais e especificação neuronal ainda é desconhecida (MUKHOPADHYAY, et al., 2009).

O tecido cerebral dos indivíduos portadores da DCF apresentaram níveis de expressão maiores quando comparados com os indivíduos controle. Durante o protocolo de neurodiferenciação, no intervalo de 35 dias de neurodiferenciação, os níveis de expressão do gene *HEY1*, nos indivíduos acometidos pela DCF em comparação aos indivíduos controle, diminuíram. Como a expressão do gene *HEY1* é induzida pelas vias de transdução de sinal Notch, e através desta via regula a diferenciação e proliferação celular, os baixos níveis durante a neurodiferenciação por 35 dias dos indivíduos displásicos e os altos níveis de expressão no tecido cerebral nestes mesmos indivíduos podem ser explicados por uma possível alteração da via Notch-1. Segundo o Cotter et al (1999), níveis significativamente alterados de Notch-1, um efetor integral da via Wnt, também já foram relatados na DCF, nos neurônios anormais e nas células abalonadas. Considerando que a sinalização Notch desempenha importante papel na especificação do destino neural embrionário, não é surpreendente que a via de Notch desempenhe um papel nos distúrbios da formação cortical podendo ser vista como candidata às mudanças de desenvolvimento observadas no cérebro de indivíduos acometidos pela DCF, o que possivelmente explica os diferentes níveis de expressões entre o grupo controle e displásico.

Anteriormente conhecido como *Nex1/MATH-2*, o gene *NEUROD6* está envolvido na saída do ciclo celular e na diferenciação terminal conforme estudos *in vitro* (WU et al., 2005). *NEUROD6* tem a capacidade de promover a neuritogênese através do aumento da expressão de genes do citoesqueleto (UITTENBOGAARD et al., 2009). Durante a corticogênese, a expressão de *NEUROD6* é desencadeada no 11º dia do desenvolvimento embrionário e contribui para a especificação das células progenitoras multipotenciais, o que possivelmente justifica o nível de expressão do gene nas células iPSCs displásico ser menor comparado com células iPSCs controle, contribuindo para a formação da doença. Assim como o tecido cerebral, o que pode estar associado a DCF, pois segundo Shimizu et al. (1995) a expressão do gene *NEUROD6* permanece no cérebro adulto de indivíduos saudáveis em áreas associadas a funções cognitivas superiores, como no hipocampo, neocórtex e no

córtex entorrinal, primeira área a ser afetada na doença de Alzheimer (SHIMIZU et al., 1995).

Nos indivíduos displásicos, no intervalo de 14 dias do protocolo de neurodiferenciação, os níveis de expressão do gene diminuíram em relação aos indivíduos controle. Esta alteração pode ser explicada por um desequilíbrio no processo de apoptose considerando que o gene *NEUROD6* tem um papel importante no início da diferenciação neuronal, promovendo simultaneamente a sobrevivência neuronal através da expressão de reguladores anti-apoptóticos que preservam a integridade mitocondrial (UITTENBOGAARD & CHIARAMELLO, 2005). A inibição da morte celular programada durante a neurodiferenciação pode ter um papel na regulação da quantidade de células precursoras durante a fase de proliferação celular assim como nas demais etapas da formação do cérebro.

A apoptose ocorre extensivamente durante o desenvolvimento normal do SN de mamíferos, e tem sido observada em distintas populações, como por exemplo células precursoras neurais, neurônios diferenciados pós mitóticos e também células da glia (BUSS et al., 2006; JACOBSON et al., 1997; OPPENHEIM, 1991). Essas mortes celulares programadas são importantes para o estabelecimento de populações neuronais e gliais com proporções corretas. Durante o desenvolvimento normal dos mamíferos, cerca de um terço das células normalmente morrem por apoptose durante as duas primeiras semanas após o nascimento (KRISTIANSEN; HAM, 2014).

Em relação ao gene *NFL*, durante a neurodiferenciação por 35 dias dos indivíduos displásicos, a expressão do gene aumentou em relação aos indivíduos controle, possivelmente explicado por uma superexpressão indevida do gene. O tecido cerebral saudável apresentou níveis de expressão do gene *NFL* maiores comparado com indivíduos acometidos portadores de DCF. A expressão tardia e em pouca quantidade nos indivíduos displásicos em relação aos indivíduos controle, pode explicar o acúmulo de proteínas de neurofilamentos característicos de indivíduos portadores da DCF, visto que este gene é responsável por codificar a proteína de neurofilamento. Conseqüentemente trazendo danos no transporte intracelular para axônios e dendritos e na manutenção do calibre neuronal, funções fundamentais do gene. Os neurofilamentos compreendem os filamentos intermediários presentes nos corpos celulares, dendritos e, principalmente, no citoplasma dos axônios (MONTEIRO et al., 2011).

O gene *NRCAM* é fundamental em muitos aspectos do desenvolvimento do SN, incluindo o crescimento axônico, orientação, formação de sinapses e formação da estrutura nervosa mielinizada, também tem sido implicado na patogênese/fisiopatologia de uma grande variedade de distúrbios humanos, incluindo distúrbios psiquiátricos e câncer. No cérebro, está envolvido no desenvolvimento de células dos grânulos cerebelares, entrada de axônios na medula espinhal dorsal, orientação do axônio na medula espinhal ventral, formação de quiasma óptico e formação da projeção talamocortical (SAKURAI, 2012). Também é possível que as moléculas que interagem com *NRCAM* nas sinapses possam induzir a montagem de proteínas sinápticas de andaimes, desempenhando um papel na localização subcelular específica das sinapses nas células (SAKURAI, 2012).

Durante o protocolo de neurodiferenciação, no intervalo de 14 dias, os níveis de expressão do gene *NRCAM* nos indivíduos controle diminuíram em relação ao grupo displásico. Pelo fato do gene *NRCAM* codificar uma molécula de adesão celular neuronal, e a proteína estar envolvida na adesão neurônio-neurônio, promovendo a sinalização direcional durante o crescimento do cone axonal, provavelmente esta via de sinalização precoce, comparada com os indivíduos controle, permitiu a migração direcional das células, através da comunicação célula-célula estando relacionado com possíveis quantidades exageradas de *NRCAM* durante a corticogênese, podendo comprometer os mecanismos fundamentais para o neurodesenvolvimento normal. Os neuroblastos dos indivíduos com DCF podem ter realizado a migração via arcabouço radial de forma precoce causada pela disponibilidade de adesão dos neurônios migratórios às glias radiais, alterando assim, o curso migratório ou dificultando a chegada à placa cortical. Também podem ter gerado neurônios precoces que não alcançam seu local de destino, formando o córtex aberrante com presença de células gigantes ou abalonadas na substância branca.

Durante o desenvolvimento embrionário, níveis adequados de *NRCAM* são essenciais para a formação de todo o embrião, em especial o desenvolvimento do SNC. As iPSCs dos indivíduos controle apresentaram níveis de expressão de *NRCAM* maiores quando comparado aos indivíduos portadores de DCF. Estes níveis alterados de *NRCAM* entre indivíduos displásicos e controle podem comprometer o desenvolvimento dos três folhetos embrionários como um todo,

causando severos danos ao desenvolvimento do SNC e resultando nas displasias corticais, bem como diferentes MDC.

O gene *PAX5* desempenha um papel fundamental na organogênese. É um regulador importante no desenvolvimento precoce, e alterações na sua expressão podem contribuir para a transformação neoplásica de uma célula (PFEFFER et al., 1998). São expressos em regiões específicas do cérebro e contribuem para o padrão de estruturas cerebrais. É provável que esses genes atuem controlando a proliferação e migração de células precursoras neuroectodérmicas durante o desenvolvimento (BAUMANN KUBETZKO et al., 2004)

O tecido cerebral dos indivíduos controle apresentou níveis de expressão de *PAX5* maiores quando comparado aos indivíduos portadores de DCF, confirmando sua expressão em regiões específicas do cérebro saudável e sua contribuição para o padrão de estruturas cerebrais. O mesmo já foi encontrado em estudos realizados durante o desenvolvimento do cérebro de ratos, confirmando a expressão de *PAX5* predominantemente no limite do mesencéfalo (BAUMANN KUBETZKO et al., 2004).

Durante o intervalo de 35 dias do protocolo de neurodiferenciação, os indivíduos displásicos e controles apresentaram níveis de expressão do gene *PAX5* semelhantes. Nos indivíduos controle, a expressão do gene no intervalo de 14 dias de neurodiferenciação apresentou uma diminuição em relação aos indivíduos displásicos. Considerando que o gene *PAX5* desempenha um papel fundamental na organogênese e que houve uma diminuição na expressão do gene aos 14 dias da neurodiferenciação dos indivíduos controle em relação aos indivíduos displásicos, provavelmente o gene sofreu alguma alteração na sua expressão, pois o gene *PAX5* é um regulador importante no desenvolvimento precoce e alterações na sua expressão podem contribuir para a transformação neoplásica de uma célula (PFEFFER et al., 1998). Esta transformação poderia explicar a presença de neurônios dismórficos na DCF e a presença de células abalonadas, ou seja, células anormais de membrana fina, núcleo(s) excêntrico(s), citoplasma abundante, eosinofílico e homogêneo, exclusivos da DCF do tipo IIb.

As sintaxinas constituem uma família de receptores para vesículas de transporte. São proteínas específicas do SN envolvidas no acoplamento de vesículas sinápticas com a membrana plasmática pré-sináptica, na regulação do canal iônico e na exocitose sináptica. As sintaxinas 1A e 1B estão apenas presentes no SN e nos tecidos relacionados (MARTÍN-MARTÍN et al., 1999).

As células iPSCs dos indivíduos controle apresentaram níveis de expressão de *STX1A* maiores quando comparados aos indivíduos displásicos. Essa diferença nos níveis de expressão das células iPSCs podem trazer consequências ao desenvolvimento dos três folhetos embrionários, resultando em diferentes malformações, incluindo as displasias corticais.

O protocolo de neurodiferenciação alterou os níveis de expressão de *STX1A* de forma diferente para as células dos indivíduos acometidos pela DCF e indivíduos controle. Durante o intervalo de neurodiferenciação por 35 dias, o grupo displásico sofreu uma diminuição nos níveis de expressão em relação aos indivíduos controle, que possivelmente pode ser explicado por uma questão de “altered timing”, pois “timing” é tudo nos processos celulares, lembrando que a expressão alterada de neuroreceptores e locais de captação foi repetidamente demonstrada em DCF, e o gene *STX* está diretamente envolvido no acoplamento de vesículas sinápticas com a membrana plasmática pré-sináptica, na regulação do canal iônico e na exocitose sináptica (LOPES, 1999).

É consenso entre os pesquisadores, que a produção de distintas subpopulações neuronais a partir das células-tronco neurais e suas progenitoras, requer reguladores temporais e que o desenvolvimento neuronal bem sucedido está diretamente relacionado com a precisão e o momento da entrada e saída destas células no ciclo celular (OSAKADA & TAKAHASHI, 2011). As etapas desse complexo processo de formação do cérebro humano são regidas por uma infinidade de rotas e sinalizações celulares, sendo cada etapa de extrema importância para a que a procede. Muitas vezes um pequeno passo, uma pequena alteração para a célula, pode ser um salto para a humanidade, podendo causar um grande impacto, no nosso caso, no tamanho do cérebro. Como exemplo disso, temos o caso do zika vírus, onde provavelmente uma infecção num ponto temporal bem crítico faz com que o cérebro se torne muito menor. No caso da displasia cortical, algo diferente no processo do desenvolvimento neuronal já pode ser capaz de tornar o cérebro um pouco diferente, mostrando que esses processos de desenvolvimento do córtex são muito sensíveis.

Vários estudos demonstraram que moléculas relacionadas à fosforilação da via Fosfoinosídeo-3-quinase (PI3K – do inglês phosphoinositide-3-dependent kinase) e da via Proteína quinase B (AKT ou PKB) estão ativadas em indivíduos acometidos pela DCF do tipo IIB (BAYBIS et al., 2004; SATO et al., 2010; LJUNGBERG et al.,

2006; TAKEI et al., 2014; CRINO et al., 2011; PODURI et al., 2013; SCHICK et al., 2007). Certamente os diferentes níveis de expressão gênica dos indivíduos displásicos em relação aos indivíduos controle, encontrados no presente estudo, podem ser explicados por alterações na via PI3K, visto que ela é fundamental para a sobrevivência celular, no controle de apoptose, migração neuronal, desenvolvimento morfológico dos neurônios e no processo de neurotransmissão sináptica no SNC em desenvolvimento.

A partir do estudo aprofundado de cada gene com a comprovação de que os níveis de expressão encontrados neste estudo realmente estão alterados e são comuns em todos os indivíduos displásicos, no futuro, poderemos verificar se há alguma deleção ou algo que possa ser genético. Isso somente será possível responder depois que detectarmos o que o indivíduo expressa diferente, mas que não apresenta uma mutação no período embrionário, considerando que nas células iPSCs foi gerada uma célula embrionária e todo o conteúdo genético foi trazido de volta ao ambiente embrionário. É claro que suas deleções estarão presentes bem como as alterações prévias à formação daquela célula na embriologia. A questão é, até que ponto a própria reprogramação pode alterar o curso ou a expressão de um gene? Isso ressalta a importância do controle pareado.

O uso das iPSCs a partir da técnica de reprogramação celular vem permitindo aprofundar os estudos a partir das próprias células de indivíduos portadores de DCF, mimetizando *in vitro*, os processos envolvidos na neurodiferenciação embrionária e possíveis alterações que podem estar relacionadas com o desenvolvimento anormal do córtex cerebral.

6. CONCLUSÃO

Dentro do conjunto de doenças que compõem as Malformações do Desenvolvimento Cortical, a Displasia Cortical Focal é a doença que menos se tem conhecimento sobre a etiologia. A partir do uso de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs), trouxemos contribuições importantes para compreensão da patogênese durante o processo de neurogênese e neurodiferenciação de indivíduos acometidos pela DCF, em especial a do tipo IIb. Nossos resultados são essenciais para o estudo e conhecimento dos níveis de expressão, ação e envolvimento de diferentes genes nos processos fundamentais do desenvolvimento saudável do SN, como migração e diferenciação neural, transmissão sináptica, sinaptogênese, axiogênese e sinalização Notch.

Os genes envolvidos nos processos de migração e diferenciação neural, e aspectos sinápticos apresentaram expressões bastante alteradas nos indivíduos displásicos, com o início da grande maioria dos processos precoces, antes do período fisiologicamente típico. A partir dos diferentes níveis de expressão gênica encontrados, podemos inferir que durante o período embrionário, no processo de neurogênese e neurodiferenciação, indivíduos acometidos pela doença, possivelmente possuem neuroblastos mais sensíveis a estímulos, apresentando diferenças no desenvolvimento do SN. Estas diferenças também podem ser explicadas pela presença de proteínas de adesão celular deficientes, acentuada proliferação celular, expressão de genes responsáveis pelo controle de apoptose alterados e alterações na via PI3K, via fundamental para o SNC em desenvolvimento. Essas alterações foram vistas nos indivíduos displásicos em relação aos indivíduos controle e podem estar relacionadas com a formação do cérebro com displasia. Os resultados são de grande valia, visto que é uma doença com gênese ainda não bem definida.

No decorrer da última década, foram vários os avanços na compreensão das DCFs. A partir destes nossos resultados foram abertas muitas possibilidades que permitem contribuir de forma relevante e considerável para o entendimento da neuro-embriologia das displasias. Este trabalho amplia a compreensão do neurodesenvolvimento embrionário, abrindo portas para futuras investigações de forma mais aprofundada sobre o envolvimento e influência de cada um dos genes

analisados na patogênese da DCF, bem como em cada mecanismo de ação envolvido na formação do cérebro.

CAPÍTULO II

7. DOUTORADO-SANDUÍCHE: UNIVERSITY OF MICHIGAN



No período de Abril a Julho de 2017, realizei Doutorado-Sanduíche na conceituada *University of Michigan*, Estados Unidos, financiada pela CAPES.

A *University of Michigan* está situada na cidade de Ann Arbor e é um dos mais importantes centros de pesquisa universitários dos Estados Unidos. Foi fundada em 1817, é pública e possui sedes em Ann Arbor, em Flint e Dearborn. Conta com mais de 500 grandes edifícios, três hospitais da universidade, dezenas de ambulatorios, muitos centros de cuidados médicos, pesquisa e educação. Ann Arbor é considerada uma cidade universitária, onde grande parte da economia da cidade gira em torno da universidade, empregando a maioria da população. A universidade administra um dos maiores orçamentos anuais de pesquisa colegiada de qualquer universidade nos Estados Unidos, totalizando cerca de \$1 bilhão em 2009 (Relatório Anual de Pesquisa e Bolsas de Estudo Resumo Financeiro, 2009)

As 19 bibliotecas espalhadas pela cidade, o maior estádio de futebol americano universitário dos EUA e as residências estudantis chamam a atenção na cidade. O sistema residencial dos estudantes é organizado em "comunidades temáticas", onde o aluno tem a oportunidade de estar cercado por estudantes em uma sala residencial que compartilha interesses semelhantes, estimulando a liderança global, experiência de transição da faculdade e internacionalismo.

Meu orientador no exterior foi o professor de neurologia Dr. Jack M. Parent (Figura 49). Ele é médico, diretor do Laboratório de Neurodesenvolvimento e Regeneração, e co-diretor do *Comprehensive Epilepsy Center* na *University of Michigan Medical School*. Seus interesses atuais de pesquisa incluem o transplante de células-tronco neurais para tratar lesões cerebrais e neurodegeneração, e a modificação de células-tronco neurais adultas para promover o reparo do cérebro após o AVC ou prevenir a epilepsia. Dr. Parent é uma forte referência mundial com diversos artigos publicados em revistas conceituadas, como por exemplo, a *Nature*.

Figura 49 - À esquerda: visão interna do Biomedical Sciences Research Building (BSRB), à direita: orientador Dr. Jack M. Parent, MD.



Fonte: o autor.

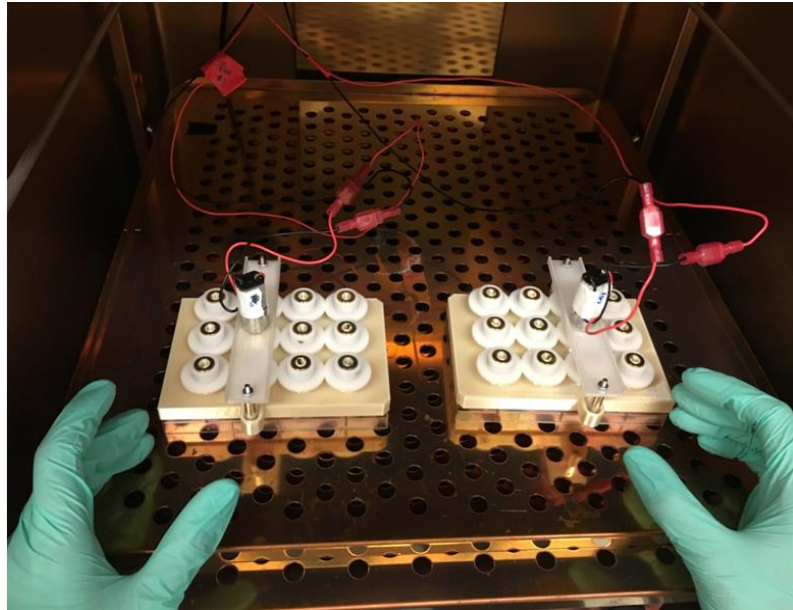
O Laboratório de Neurodesenvolvimento e Regeneração faz parte do Departamento de Neurologia, localizado no *Biomedical Sciences Research Building* (BSRB) (Figura 49 e 50) e conta com diversos pesquisadores, principalmente de origem asiática. Além dos projetos internos, o laboratório também presta serviço de reprogramação celular, devolvendo ao solicitante as células reprogramadas juntamente com um laudo com toda caracterização necessária para comprovar sua pluripotência. No período que estive no laboratório foi solicitado o serviço de reprogramação celular de células do olho e eu pude acompanhar todo o processo. Pessoas externas ao laboratório podem alugar as capelas de fluxo e estufas para realizar pesquisas desde que usem seus próprios meios de cultura e reagentes. A qualidade dos laboratórios e acesso a infraestrutura da universidade de estudos ou centro de pesquisa são excelentes.

Figura 50 - Biomedical Sciences Research Building (BSRB).



O objetivo principal do meu projeto de pesquisa no exterior foi trabalhar no protocolo de organóides cerebrais, ou seja, com cultura celular em 3D. O objetivo inicial foi fazer organóides cerebrais derivados de indivíduos acometidos pela Síndrome de Pretzel e indivíduos controles, visando recapitular o fenótipo de macrocefalia, citomegalia e hiperativação de mTORC observado nos pacientes acometidos por esta doença. Esses organóides poderão ser empregados para avaliação de fármacos (como o inibidor rapamicina) para resgatar o fenótipo da patologia. Yu Liu, colega de laboratório, trabalhou neste projeto por um tempo, e conseguiu com sucesso gerar neurônios derivados de iPSCs (cultura celular em 2D) para estudar seu fenótipo e resgatar o estado epilético. A Síndrome de Pretzel, também conhecida como *Polyhydramnios, megalencephaly, and symptomatic epilepsy syndrome* (PMSE) é uma doença humana rara autossômica recessiva, causada por deleções homozigóticas do gene *STRADA* e é caracterizada pelo desenvolvimento anormal do cérebro, deficiência cognitiva e epilepsia intratável. Os mecanismos patogênicos subjacentes da Síndrome de Pretzel e o papel do gene *STRADA* no desenvolvimento cortical permanecem desconhecidos.

Figura 51 - Biorreator Spin Ω utilizado no protocolo.



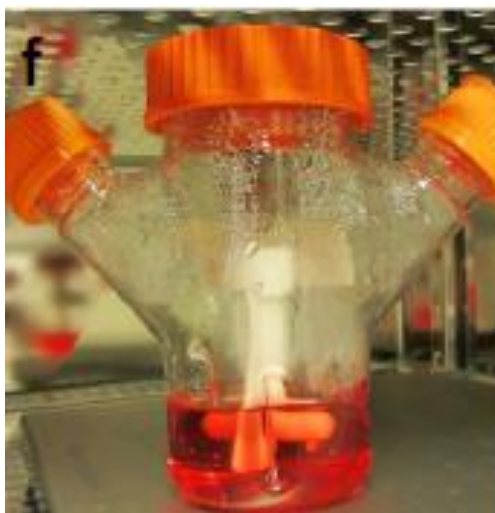
Fonte: o autor.

Os organóides cerebrais são culturas tridimensionais que modelam a organogênese e permitem investigar o desenvolvimento do cérebro humano. No protocolo (Anexo 2), foi empregado o biorreator em miniatura Spin Ω (Figura 51) para gerar organóides específicos para o prosencéfalo a partir de iPSCs humanos baseado no artigo intitulado “*Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure*” (QIAN et al, 2016). Estes organóides recapitulam as características chave do desenvolvimento cortical humano, incluindo a organização da zona progenitora, a neurogênese, a expressão gênica e, notavelmente, uma camada de células de glia radial externa específica do ser humano.

Pequisas envolvendo organóides cerebrais anteriores a publicação do artigo de Qian et al (2016) provavelmente utilizavam o protocolo de Lancaster & Knoblich (2014) intitulado: “*Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells*”. Porém o biorreator giratório utilizado por Lancaster & Knoblich é bem maior comparado ao Spin Ω : necessita grande volume de meio de cultura e fatores de crescimento, bastante espaço na estufa, frequentes troca de meio de cultura por meses, impedindo a alta escala (Figura 52). Já o Spin Ω , usa a tecnologia de impressão e design 3D, é versátil, simples de usar, econômico e disponibiliza uma reproduzível plataforma de organóide específica para a região do cérebro. Esta

tecnologia se torna acessível para uma ampla comunidade científica que busca modelar a organogênese e distúrbios humanos.

Figura 52 - Biorreator proposto por Lancaster & Knoblich, 2014.

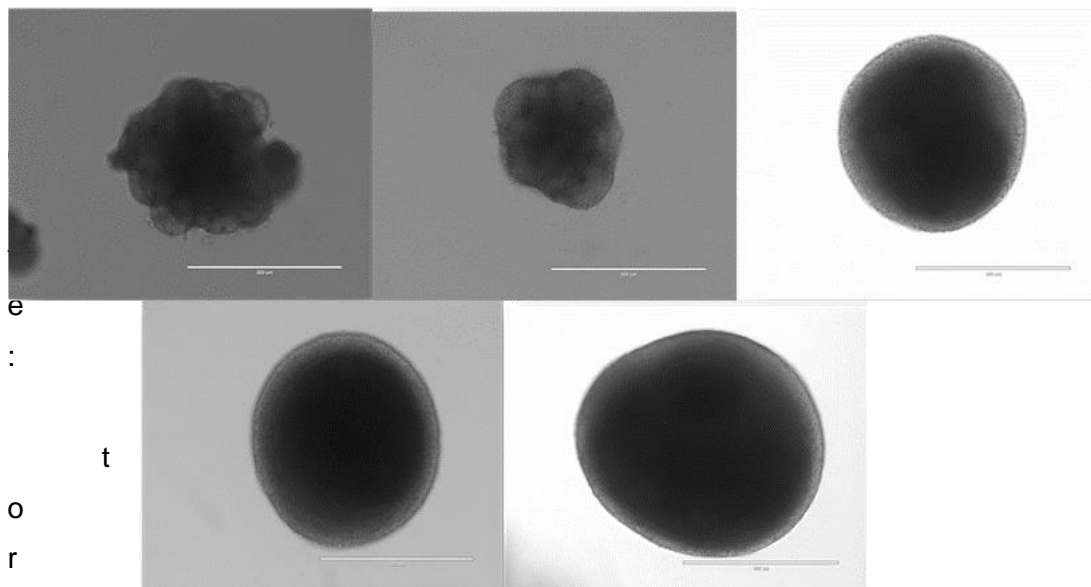


Fonte: LANCASTER, M.A.; KNOBLICH, J.A. Generation of Cerebral Organoids from Human Pluripotent Stem Cells. Nat Protoc. v. 9, n. 10, p. 2329–234, Oct 2014.

Nos quatro meses de laboratório, fiquei responsável pelas diversas culturas de organóides, desde reprogramar diferentes linhagens, tanto a partir de células tronco embrionárias quanto a partir de iPSCs, até fazer as lâminas histológicas para imunohistologia. Participei diariamente da rotina de cultura celular e nos projetos em andamento do laboratório, além das reuniões semanais (quintas e sextas-feiras) e seminários (sextas-feiras). Realizei manutenções de diversas colônias de iPSCs, extrações de DNA e RNA, testes para *Mycoplasma*, sequenciamentos e neurodiferenciações. As reprogramações das iPSCs são feitas através de CRISPR (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas).

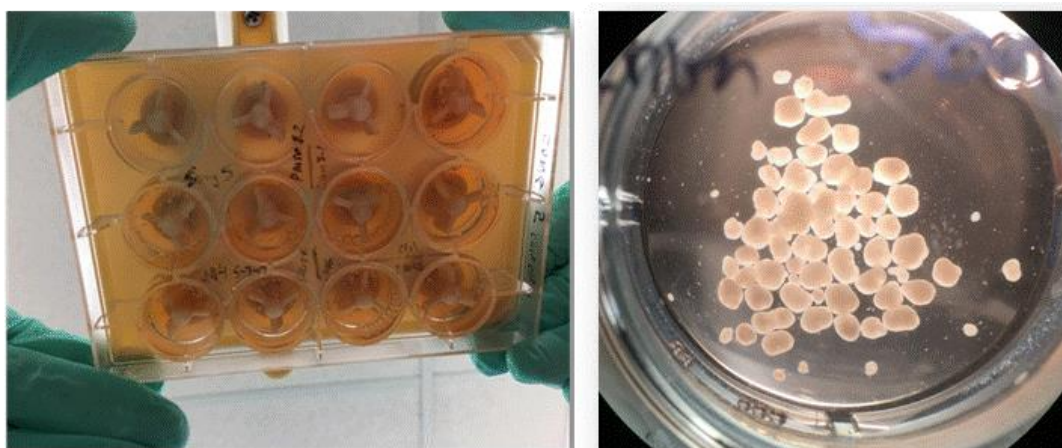
Abaixo, algumas imagens dos organóides obtidos durante o Doutorado - Sanduíche (Figuras 53-56).

Figura 63 - Organóides cerebrais desenvolvidos a partir de iPSCs de indivíduos acometidos pela Síndrome de Pretzel. Da esquerda para a direita: com 10, 14, 22, 39 e 45 dias.



Fonte: o autor.

Figura 54 - Organóides cerebrais de indivíduos acometidos pela Síndrome de Pretzel. À esquerda, organóides com 14 dias no SpinΩ e à direita, organóides com 60 dias.



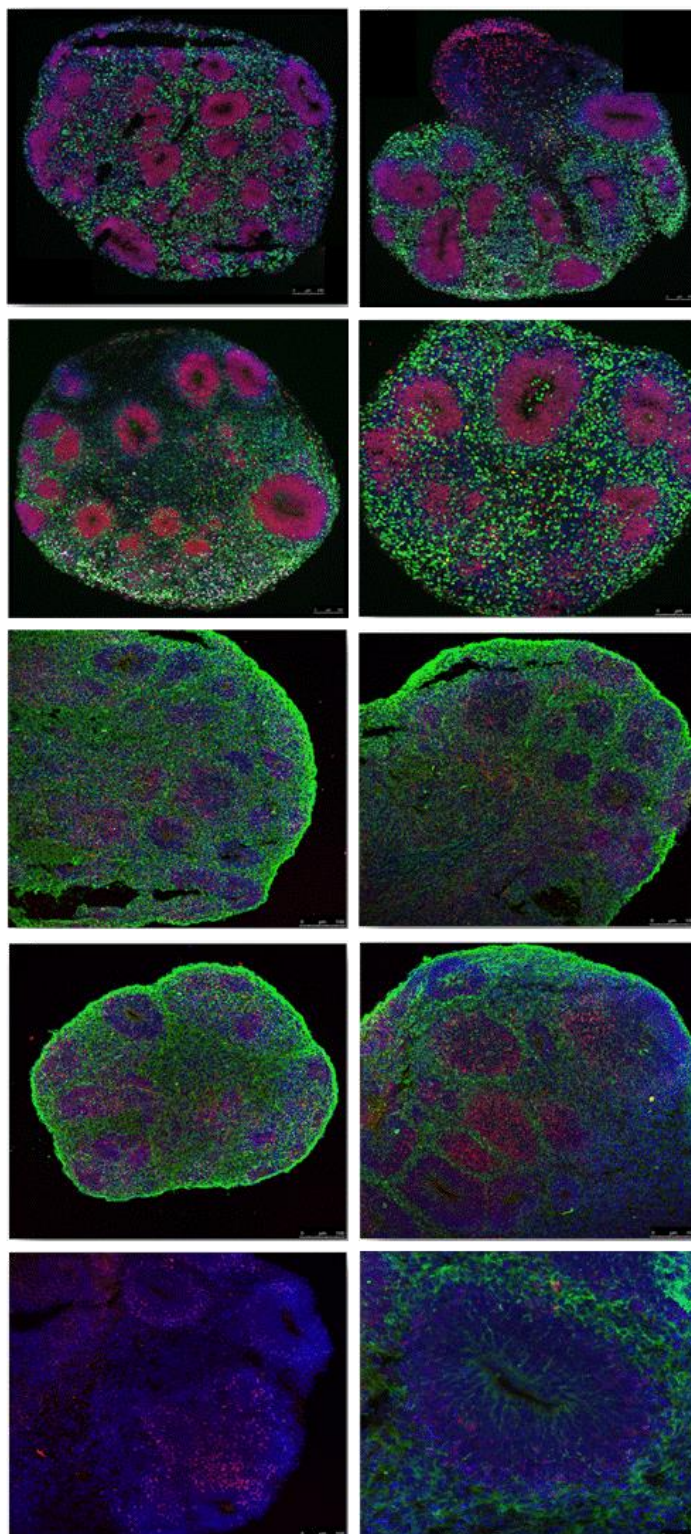
Fonte: o autor.

Figura 55 - Montagem das lâminas histológicas a partir dos organóides cerebrais de indivíduos acometidos pela Síndrome de Pretzel.



Fonte: o autor.

Figura 56 - Imunohistologia realizadas a partir dos organóides cerebrais de indivíduos acometidos pela Síndrome de Pretzel com 56 dias.



Marcadores utilizados: SATB2 – Neurônio da camada superficial (vermelho); PAX6 – Glia radial / CT neurais; CTIP2 – Neurônios corticais da camada profunda (verde); HOPX - Células da glia radial externa (verde).

A partir dos resultados obtidos haverá a publicação de um artigo relacionado ao estabelecimento de um modelo celular de organóides cerebrais a partir de indivíduos acometidos pela Síndrome de Pretzel. Os resultados referentes a este estudo foram apresentados pelo meu colega de laboratório, Louis Dang, no “University of Michigan Pediatric Research Day”, em Novembro, e em Dezembro, foi apresentado para o American Epilepsy Society.

Mais informações relacionadas ao Laboratório do Dr. Parent podem ser encontradas no site www.theparentlab.weebly.com. O site inclui todos os pesquisadores que fazem parte Laboratório do Dr. Parent, eles vêm de diversas origens culturais e científicas, no entanto compartilham o mesmo objetivo: melhorar as vidas daqueles que sofrem de doenças neurológicas. Minha adaptação à cultura e a experiência no geral foram extremamente enriquecedoras. Segundo a avaliação final do Dr. Jack Parent: “She was hard working and performed at an extremely high level”.

7.1. MONTAGEM SPINΩ

Montar o SpinΩ não é muito simples visto que as peças são impressas em 3D. A montagem é feita pelo próprio indivíduo, custando cerca de \$1000 por biorreator de 12 poços. São necessários 12 eixos de rotação, cada um custando \$64. As instruções estão no artigo original de Qian et al (2016).

O Anexo 3 contém a lista de peças, com os números de catálogo, necessários para a montagem do SpinΩ. As peças impressas em 3D são todas feitas sob medida (Empresa Xometry - EUA).

8. REFERÊNCIAS

- ABDIJADID, S.; MATHERN, G.W.; LEVINE, M.S.; CEPEDA, C. Basic Mechanisms of Epileptogenesis in Pediatric Cortical Dysplasia. **CNS Neurosci Ther**, v. 21, n. 2, p. 92-103, Feb 2015. doi:10.1111/cns.12345.
- AHN, J.; LEE, J.; KIM, S. Interferon-gamma inhibits the neuronal differentiation of neural progenitor cells by inhibiting the expression of Neurogenin2 via the JAK/STAT1 pathway. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 466, n. 1, p. 52-59, Oct 2015.
- ALBERI, L.; LIU, S.; WANG, Y.; BADIE, R.; SMITH-HICKS, C.; WU, J.; PIERFELICE, T.J.; ABAZYAN, B.; MATTSON, M.P.; KUHL, D.; PLETNIKOV, M.; WORLEY, P.F.; GAIANO, N. Activity-induced Notch signaling in neurons requires Arc/Arg3.1 and is essential for synaptic plasticity in hippocampal networks. **Neuron**, v. 69, n. 3, p. 437-444, Feb 2011.
- ALONSO-NANCLARES, L.; GARBELLI, R.; SOLA, R.G.; PASTOR, J.; TASSI, L.; SPREAFICO, R.; DEFELIPE, J. Microanatomy of the dysplastic neocortex from epileptic patients. **Brain**, v. 128, p.158-173, 2005.
- ANDERSON, V.; MORSE, S.; KLUG, G.; CATROPPA, C.; HARITOU, F.; ROSENFELD, J.; et al. Predicting recovery from head injury in young children. **J Int Neuropsych Soc**, v. 3, p. 568-80, 1997.
- ANDERSON, V.; SPENCER-SMITH, M.; LEVENTER, R. et al. Childhood brain insult: can age at insult help us predict outcome? **Brain**, v. 132, p. 45-56, 2009.
- ANDERSON, V.; SPENCER-SMITH, M.; WOOD A. Do children really recover better? Neurobehavioural plasticity after early brain insult. **Brain**, v. 134, p. 2197-221, 2011.
- ANDRES, M.; ANDRE, V.M.; NGUYEN, S.; SALAMON, N.; CEPEDA, C.; LEVINE, M.S.; LEITE, J.P.; NEDER, L.; VINTERS, H.V.; MATHERN GW. Human cortical dysplasia and epilepsy: an ontogenetic hypothesis based on volumetric MRI and NeuN neuronal density and size measurements. **Cereb Cortex**. v. 15, n. 2, p. 194-210, Aug 5 2005.
- ANTON, E.S.; MARCHIONNI, M.A.; LEE, K.F.; RAKIC, P. Role of GGF/neuregulin signaling in interactions between migrating neurons and radial glia in the developing cerebral cortex. **Development**, v. 124, n. 18, p. 3501-3510, Sep 1997.
- ARONICA, E.; BECKER, A.J.; SPREAFICO, R. Malformations of cortical development. **Brain Pathol**, v. 22, n. 3, p. 380-401, May 2012.
- AXELROD B.N.; WOODWARD J.L.; PUTNAM S.H.; ADAMS K.M. Cross-validation of predicted Wechsler Memory Scale—Revised Scores. **Psychological Assessment**, v. 8, p. 73-75, 1996.
- AZIN, M.; MIRNAJAFI-ZADEH, J.; JAVAN, M. Fibroblast Growth Factor-2 Enhanced The Recruitment of Progenitor Cells and Myelin Repair in Experimental Demyelination of Rat Hippocampal Formations. **Cell J**, v. 17, n. 3, p. 540-456, Oct 2015.
- BACK, S.A.; MILLER, S.P. Brain injury in premature neonates: A primary cerebral dysmaturation disorder? **Ann Neurol**, v. 75, n. 4, p. 469-86, 2014.

- BAI, G.; SHENG, N.; XIE, Z.; BIAN, W.; YOKOTA, Y.; BENEZRA, R.; KAGEYAMA, R.; GUILLEMOT, F.; JING, N. Id sustains Hes1 expression to inhibit precocious neurogenesis by releasing negative autoregulation of Hes1. **Dev Cell**, v. 13, n. 2, p. 283-297, Aug 2007.
- BARKOVICH, A.J.; GUERRINI, R.; KUZNIECKY, R.I.; JACKSON, G.D.; DOBYNS, W.B. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012. **Brain**, v. 135, n. 5, p. 1348-369, May 2012.
- BAUMANN KUBETZKO, F.B.; DI PAOLO, C.; MAAG, C.; MEIER, R.; SCHAFER, B.W.; BETTS, D.R.; STAHEL, R.A.; HIMMELMANN, A. The PAX5 oncogene is expressed in N-type neuroblastoma cells and increases tumorigenicity of a S-type cell line. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 10, p. 1839-846, 2004.
- BERNINGER, B.; COSTA, M.R.; KOCH, U.; SCHROEDER, T.; SUTOR, B.; GROTHE, B.; GÖTZ, M. Functional properties of neurons derived from in vitro reprogrammed postnatal astroglia. **The Journal of neuroscience**, v. 27, n. 32, p. 8654-664, 2007a.
- BERNINGER, B.; GUILLEMOT, F.; GÖTZ, M. Directing neurotransmitter identity of neurones derived from expanded adult neural stem cells. *Eur J Neurosci*. v. 25, p. 2581-590, 2007b.
- BERTRAND, N.; CASTRO, D.S.; GUILLEMOT, F. Proneural genes and the specification of neural cell types. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, p. 517-30, 2002.
- BLACKMON, K.; KUZNIECKY, R.; BARR, W.B.; SNUDERL, M.; DOYLE, W.; DEVINSKY, O.; THESEN, T. Cortical Gray-White Matter Blurring and Cognitive Morbidity in Focal Cortical Dysplasia. **Cereb Cortex**, v. 25, n. 9, p. 2854-862, Sep 2015. doi: 10.1093/cercor/bhu080.
- BLAIR, R.J.R.; SELLARS, C.; STRICKLAND, I., et al. Theory of Mind in the psychopath. **J Forensic Psychiatry**, v. 7, p. 15-25, 1996.
- BLÜMCKE, I.; THOM, M.; ARONICA, E.; ARMSTRONG, D.D.; VINTERS, H.V.; PALMINI, A.; JACQUES, T.S.; AVANZINI, G.; BARKOVICH, A.J. et al. The clinicopathologic spectrum of focal cortical dysplasias: a consensus classification proposed by an ad hoc Task Force of the ILAE Diagnostic Methods Commission. **Epilepsia**, v. 52, n. 1, p. 158-74, Jan 2011.
- BREUNIG, J.J.; SILBEREIS, J.; VACCARINO, F.M.; SESTAN, N.; RAKIC, P. Notch regulates cell fate and dendrite morphology of newborn neurons in the postnatal dentate gyrus. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, p. 20558-563, Dec 2007.
- BUSS, R.R.; SUN, W.; OPPENHEIM, R.W. Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development. **Annu Rev Neurosci**, v.29, p.1-35, 2006.
- CANTLEY, L.C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science**, v. 296, n. 5573, p.1655-1657, May 2002.
- CASTEJÓN, O.J. Electron Microscopy of Human Brain Edema. *Astrodata*. Maracaibo.pp17-34, 2008.
- CASTELLA, P.; WAGNER, J.A.; CAUDY, M. Regulation of hippocampal neuronal differentiation by the basic helix-loop-helix transcription factors HES-1 and MASH-1. **J Neurosci Res**. v. 56, n. 3, p. 229-40, May 1 1999.
- CASTRO, D.S.; SKOWRONSKA-KRAWCZYK, D.; ARMANT, O.; DONALDSON, I.J.; PARRAS, C.; HUNT, C.; CRITCHLEY, J.A.; NGUYEN, L.; GOSSLER, A.; GÖTTGENS, B.; MATTER, J.M.; GUILLEMOT, F. Proneural bHLH and Brn proteins coregulate a

neurogenic program through cooperative binding to a conserved DNA motif. **Dev Cell**, v. 11, n. 6, p. 831-44, Dec 2006.

CASTRO, D.S.; MARTYNOGA, B.; PARRAS, C.; RAMESH, V.; PACARY, E.; JOHNSTON, C.; DRECHSEL, D.; LEBEL-POTTER, M.; GARCIA, L.G.; HUNT, C.; DOLLE, D.; BITHELL, A.; ETTWILLER, L.; BUCKLEY, N.; GUILLEMOT, F. A novel function of the proneural factor *Ascl1* in progenitor proliferation identified by genome-wide characterization of its targets. **Genes Dev**, v. 25, n. 9, p. 930-945, May 2011. doi:10.1101/gad.627811.

CEPEDA, C.; ANDRE, V.M.; LEVINE, M.S.; SALAMON, N.; MIYATA, H. et al. Epileptogenesis in pediatric cortical dysplasia: the dysmature cerebral developmental hypothesis. **Epilepsy Behav**, v. 9, n. 2, p. 219–35, 2006.

CIARAPICA, R.; METHOT, L.; TANG, Y.; LO, R.; DALI, R.; BUSCARLET, M.; LOCATELLI, F.; DEL SAL, G.; ROTA, R.; STIFANI, S. Prolyl isomerase Pin1 and protein kinase HIPK2 cooperate to promote cortical neurogenesis by suppressing Groucho/TLE:Hes1-mediated inhibition of neuronal differentiation. **Cell Death Differ**, v. 21, n. 2, p. 321-332, Feb 2014. doi:10.1038/cdd.2013.160.

COTTER, D.; HONAVAR, M.; LOVESTONE, S.; RAYMOND, L.; KERWIN, R.; ANDERTON, B.; EVERALL, I. Disturbance of Notch-1 and Wnt signalling proteins in neuroglial balloon cells and abnormal large neurons in focal cortical dysplasia in human cortex. **Acta Neuropathol (Berl)**, v. 98, p. 465-472, 1999.

CRINO, P.B. mTOR: a pathogenic signaling pathway in developmental brain malformations. **Trends Mol Med**. v. 17, n. 12, p. 734-42, 2011.

CRINO, P.B.; DUHAIME, A.C.; BALTUCH, G.; WHITE, R. Differential expression of glutamate and GABA-A receptor subunit mRNA in cortical dysplasia. **Neurology**, v. 56, n. 7, p. 906–13, 2001.

CYTOTUNE®-IPSCS REPROGRAMMING KIT. For efficient, integration-free reprogramming of somatic cells into induced pluripotent stem cells (iPSCsC) Catalog Numbers A13780-01, A13780-02 Publication Number MAN0004118 Revision 5.00 invitrogen by life technologies

DE BIVORT, B.L.; GUO, H.F.; ZHONG, Y. Notch signaling is required for activity-dependent synaptic plasticity at the *Drosophila* neuromuscular junction. **J Neurogenet**, v. 23, n. 4, p. 395-404, 2009.

DEL GIUDICE, E.; BIANCHI, M.C.; TOSETTI, M.; VARRONE, A., ROMANO, A.; CRISANTI, A.F.; TITOMANLIO, L.; IMPERATI, F. Taylor-type focal cortical dysplasia: is the epilepsy always resistant to medical treatment? **Epileptic Disord**, v. 8, n. 4, p. 289-93, Dec 2006.

DES PORTES, V.; PINARD, J.M.; BILLUART, P.; VINET, M.C.; KOULAKOFF, A.; CARRIE, A.; GELOT, A.; DUPUIS, E.; MOTTE, J.; BERWALD-NETTER, Y.; CATALA, M.; KAHN, A.; BELDJORD, C.; CHELLY, J. A novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome. **Cell**, v. 92, n. 1, 51-61, Jan 1998.

DIMOS, J.T.; RODOLFA, K.T.; NIAKAN, K.K.; WEISENTHAL, L.M.; MITSUMOTO, H.; CHUNG, W.; CROFT, G.F.; SAPHIER, G.; LEIBEL, R.; GOLAND, R.; WICHTERLE, H.; HENDERSON, C.E.; EGGAN, K. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. **Science**, v. 321, n. 5893, p. 1218-221, Aug 2008. doi: 10.1126/science.1158799.

DOLMETSCH, R.; GESCHWIND, D.H. The human brain in a dish: the promise of iPSCsC-derived neurons. **Cell**, v. 145, n. 6, p. 831-34, Jun 2011.

DU, X.; PARENT, J.M. Using Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells to Model and Treat Epilepsies. **Curr Neurol Neurosci Rep**, v. 15, n. 10, p. 71, Oct 2015. doi: 10.1007/s11910-015-0588-3.

ENRÍQUEZ, P.; CRISPR-Mediated Epigenome Editing. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 89, n. 4, p. 471-86, 2016.

EIRAKU, M.; WATANABE, K.; MATSUO-TAKASAKI, M.; KAWADA, M.; YONEMURA, S.; MATSUMURA, M.; et al. Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. **Cell Stem Cell**, v.3, n.5, p. 519-32, 2008.

FAUSER, S.; ESSANG, C.; ALTENMÜLLER, D.M.; STAACK, A.M.; STEINHOFF, B.J.; STROBL, K.; BAST, T.; SCHUBERT-BAST, S.; STEPHANI, U.; WIEGAND, G.; PRINZ, M.; BRANDT, A.; ZENTNER, J.; SCHULZE-BONHAGE, A. Long-term seizure outcome in 211 patients with focal cortical dysplasia. **Epilepsia**, v. 56, n. 1, 66-76, Jan 2015. doi: 10.1111/epi.12876.

FISHER, L.J. Neural precursor cells: applications for the study and repair of the central nervous system. **Neurobiol Dis**, v. 4, n. 1, p. 1-22, 1997.

FRIES, K.M.; BLIEDEN, T.; LOONEY, R.J.; SEMPOWSKI, G.D.; SILVERA, M.R.; WILLIS, R.A.; PHIPPS, R.P. Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 72, n. 3, p. 283-92, Sep 1994.

FUSAKI, N.; BAN, H.; NISHIYAMA, A.; SAEKI, K.; HASEGAWA, M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. **Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences**, v. 85, n. 8, p. 348-62, 2009.

GARCEZ P.P.; DIAZ-ALONSO J.; CRESPO-ENRIQUEZ I.; CASTRO D.; BELL D.; GUILLEMOT F. Cenj/CPAP regulates progenitor divisions and neuronal migration in the cerebral cortex downstream of Ascl1. **Nat Commun**. v. 10, n. 6, p. 6474. Mar 2015

GEOFFROY, C. G.; CRITCHLEY, J. A.; CASTRO, D. S.; RAMELLI, S.; BARRACLOUGH, C.; DESCOMBES, P. et al. Engineering of dominant active basic helix-loop-helix proteins that are resistant to negative regulation by postnatal central nervous system antineurogenic cues. **Stem Cells**, v. 27, p. 847-56, 2009. doi: 10.1002/stem. 17

GIVOGRI, M.I.; DE PLANELL, M.; GALBIATI, F.; SUPERCHI, D.; GRITTI, A.; VESCOVI, A.; DE VELLIS, J.; BONGARZONE, E.R. Notch signaling in astrocytes and neuroblasts of the adult subventricular zone in health and after cortical injury. **Dev Neurosci**, v. 28, n. 1-2, p. 81-91, Feb 2006

GLEESON, J.G.; LIN, P.T.; FLANAGAN, L.A.; WALSH, C.A. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. **Neuron**, v. 23, n. 2, p. 257-71, Jun 1999.

GOLDEN, J.A. Cell migration and cerebral cortical development. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 27, n. 1, p. 22-28, Feb 2001.

GONZALEZ, A.M.; BUSCAGLIA, M.; ONG, M.; BAIRD, A. Distribution of basic fibroblast growth factor in the 18-day rat fetus: localization in the basement membranes of diverse tissues. **J Cell Biol.** v. 110, n. 3, p. 753-65, Mar 1990.

GÖTZ, M.; HUTTNER, W.B. The cell biology of neurogenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, n. 10, p. 777-88, Oct 2005.

GREIG, L.C.; WOODWORTH, M.B.; GALAZO, M.J.; PADMANABHAN, H.; MACKLIS, J.D. Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. **Nat Rev Neurosci**, v. 14, n. 11, p. 755-769, Nov 2013.

GUERRINI, R.; DOBYNS, W.B. Malformations of cortical development: clinical features and genetic causes. **Neurology**, v. 13, n. 7, p. 710-26, 2014.

HARADA, K.; SATO, Y.; IKEDA, H.; HSU, M.; IGARASHI, S.; NAKANUMA, Y. Notch1-Hes1 signalling axis in the tumorigenesis of biliary neuroendocrine tumours. **J Clin Pathol**, v. 66, n. 5, p. 386-91, 2013. doi: 10.1136/jclinpath-2012-201273.

HARRIS, L.W.; LOCKSTONE, H.E.; KHAITOVICH, P.; WEICKERT, C.S.; WEBSTER, M.J.; BAHN, S. Gene expression in the prefrontal cortex during adolescence: implications for the onset of schizophrenia. **BMC Med Genomics**, v. 2, p. 28, May 2009. doi: 10.1186/1755-8794-2-28.

HARTMAN, M.G.; LU, D.; KIM, M.L.; KOCIBA, G.J.; SHUKRI, T.; BUTEAU, J.; WANG, X.; FRANKEL, W.L.; GUTTRIDGE, D.; PRENTKI, M.; GREY, S.T.; RON, D.; HAI, T. Role for activating transcription factor 3 in stress-induced beta-cell apoptosis. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 13, p. 5721-32, Jul 2004.

HARTMANN, D.; DE STROOPER, B.; SAFTIG P. Presenilin-1 deficiency leads to loss of Cajal-Retzius neurons and cortical dysplasia similar to human type 2 lissencephaly. **Curr Biol**, v.9, n. 14, p. 719-27, 1999.

HARVEY, A.S.; CROSS, J.H.; SHINNAR, S.; MATHERN, G.W. Defining the spectrum of international practice in pediatric epilepsy surgery patients. **Epilepsia**, v. 49, n. 1, p. 146-55, Jan 2008.

HEIFETS, B.D.; CASTILLO, P.E. Endocannabinoid signaling and long-term synaptic plasticity. **Annu Rev Physiol**, v. 71, p. 283-306, 2009.

HEMB, M. Improved outcomes in pediatric epilepsy surgery: The UCLA experience, 1986-2008. **Neurology**, v. 74, n. 22, p.1768-775, 2010.

HENKE, R.M.; MEREDITH, D. M.; BORROMEO, M. D.; SAVAGE, T. K.; JOHNSON, J.E. Ascl1 and Neurog2 form novel complexes and regulate Delta-like3 (Dll3) expression in the neural tube. **Dev Biol**, v. 328, p. 529-40, 2009.

HIRATA, H.; YOSHIURA, S.; OHTSUKA, T.; BESSHO, Y.; HARADA, T.; YOSHIKAWA, K.; KAGEYAMA, R. Oscillatory expression of the bHLH factor Hes1 regulated by a negative feedback loop. **Science**, v. 298, n. 5594, p. 840-43, Oct 25 2002.

HOWARD, B.M.; ZHICHENG, M.O.; FILIPOVIC R.; MOORE, A.R.; ANTIC, S.D.; ZECEVIC, N. Radial glia cells in the developing human brain. **Neuroscientist**, v. 14, p. 459-73, 2008.

HSU, P.D.; ERIC, S. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. **Cell**, v. 157, n. 6, p. 1262-278, 2014.

HSU PP, KANG SA, RAMESEDER J, ZHANG Y, OTTINA KA, LIM D, PETERSON TR, CHOI Y, GRAY NS, YAFFE MB, MARTO JA, SABATINI DM. The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. **Science**, v. 332, n. 6035, p. 1317-322, Jun 2011.

ICHIDA, J.K.; KISKINIS, E. Probing disorders of the nervous system using reprogramming approaches. **EMBO J**, v. 34, n.11, p.1456-77, 2015.

IFFLAND, P.H.; CRINO, P.B. Focal Cortical Dysplasia: Gene Mutations, Cell Signaling, and Therapeutic Implications. **Annu Rev Pathol Mech Dis**, v. 12, p. 547–71, 2017.

IMAYOSHI, I.; KAGEYAMA, R. The role of notch signaling in adult neurogenesis. **Mol neurobiol**, v. 44, n. 1, p. 7-12, Aug 2011.

IMAYOSHI, I.; SAKAMOTO, M.; YAMAGUCHI, M.; MORI, K.; KAGEYAMA, R. Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. **J Neurosci**, v. 30, n. 9, p. 3489-498, Mar 2010. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4987-09.2010.

IMAYOSHI, I.; SHIMOJO, H.; SAKAMOTO, M.; OHTSUKA, T.; KAGEYAMA, R. Genetic visualization of notch signaling in mammalian neurogenesis. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, p. 2045-57, 2013.

ISAAC, J.T.; FELDMEYER, D. Mechanisms of neocortical development. **J Physiol**, v. 587, p. 1871-872, 2009.

ISHIBASHI, M.; ANG, S-L.; SHIOTA, K.; NAKANISHI, S.; KAGEYAMA, R.; GUILLEMOT, F. Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix–loop–helix factors, premature neurogenesis and severe neural tube defects. **Genes Dev**, v. 9, n. 24, p. 3136-148, Dec 1995.

ITSKOVITZ-ELDOR, J. et al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. **Mol Med**, v. 6, n. 2, p. 88-95, Feb 2000.

JACOBSON, M.D.; WEIL, M.; RAFF, M.C. Programmed cell death in animal development. **Cell**, v. 88, n. 3, p. 347-54, 1997.

JAMUAR, S.S.; LAM, A.N.; KIRCHER, M. et al. Somatic mutations in cerebral cortical malformations. **New Eng J Med**, v. 371, n. 21, p. 733-43, Nov 2014.

JIN, K., XIE, L., MAO, X., GREENBERG, M.B.; MOORE, A.; PENG, B.; GREENBERG, R.B.; GREENBERG, D.A. Effect of Human Neural Precursor Cell Transplantation on Endogenous Neurogenesis after Focal Cerebral Ischemia in the Rat. **Brain Res**, v. 1374, p. 56-62, Feb 2011. doi:10.1016/j.brainres.2010.12.037.

KABAT, J.; KROL, P. Focal cortical dysplasia - review. **Pol J Radiol**, v. 77, n. 2, p. 35-43, Apr 2012.

KAGEYAMA, R.; OHTSUKA, T.; TOMITA, K. The bHLH gene Hes1 regulates differentiation of multiple cell types. **Mol Cells**, v. 10, n. 1, p.1-7, Feb 2000.

KAGEYAMA, R.; OHTSUKA, T.; HATAKEYAMA, J.; OHSAWA, R. Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. **Exp Cell Res**, v. 306, n. 2, p. 343-48, 2005.

KAROW, M.; SANCHEZ, R.; SCHICHOR, C.; MASSERDOTTI, G.; ORTEGA, F.; HEINRICH, C.; GASCON, S.; KHAN, M.A.; LIE, D.C.; DELLAVALLE, A. Reprogramming of pericyte-derived cells of the adult human brain into induced neuronal cells. **Cell Stem Cell**, v. 11, n. 4, p. 471-76, Oct 2012.

KELAVA, I.; LANCASTER, M.A. Stem Cell Models of Human Brain Development. **Cell Stem Cell**, v.18, n. 6, p. 736-48, Jun 2 2016.

KELLEHER, R.J. 3rd; BEAR, M.F. The autistic neuron: troubled translation? **Cell**, v. 135, n. 3, p. 401-6, 2008.

KIM, D.W.; KIM, S.; PARK, S.H.; CHUNG, C.K.; LEE, S.K. Comparison of MRI features and surgical outcome among the subtypes of focal cortical dysplasia. **Seizure**, v. 21, n. 10, p. 789-94, 2012.

KOBAYASHI, T.; KAGEYAMA, R. Hes1 regulates embryonic stem cell differentiation by suppressing Notch signaling. **Genes Cells**, v. 15, n. 7, p. 689-98, 2010. doi:10.1111/j.1365-2443.2010.01413.x.

KOBAYASHI, T.; MIZUNO, H.; IMAYOSHI, I.; FURUSAWA, C.; SHIRAHIGE, K.; KAGEYAMA, R. The cyclic gene Hes1 contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells. **Genes Dev**, v. 23, p. 1870-875, 2009.

KOMOR, A.C.; BADRAN, A.H.; LIU, D.R. CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes. **Cell**, v. 168, n. 1, p. 20-36, 2017.

KOSODO, Y.; RÖPER, K.; HAUBENSAK, W.; MARZESCO, A-M.; CORBEIL, D.; HUTTNER, W.B. Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neurogenic divisions of mammalian neuroepithelial cells. **The EMBO Journal**, v. 23, n. 11, p. 2314-324, Jun 2004. doi:10.1038/sj.emboj.7600223.

KOSTOVIC, I.; RAKIC, P. Cytology and the time of origin of interstitial neurons in the white matter in infant and adult human and monkey telencephalon. **J Neurocytol**, v. 9, p. 219-42, 1980.

KOSTOVIC, I.; RAKIC, P. Developmental history of the transient subplate zone in the visual and somatosensory cortex of the macaque monkey and human brain. **J Comp Neurol**, v. 297, p. 441-70, 1990.

KRAL, T.; VON LEHE, M.; PODLOGAR, M.; CLUSMANN, H.; SÜSSMANN, P.; KURTHEN, M.; BECKER, A.; URBACH, H.; SCHRAMM, J. Focal cortical dysplasia: long term seizure outcome after surgical treatment. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 78, n. 8, p. 853-56, Aug 2007.

KRESK, P.; MATON, B.; JAYAKAR, P. et al. Incomplete resection of focal cortical dysplasia is the main predictor of poor postsurgical outcome. **Neurology**, v. 72, p. 217-23, 2009.

KRESK, P.; PIEPER, T.; KARLMEIER, A. et al. Different presurgical characteristics and seizures outcomes in children with focal cortical dysplasia type I or II. **Epilepsia**, v. 50, p. 125-37, 2009.

- KRIEGSTEIN, A.R.; NOCTOR, S.C. Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. **Trends Neurosci**, v. 27, n. 7, p. 392-9, 2004.
- KRISTIANSEN, M.; HAM, J. Programmed cell death during neuronal development: the sympathetic neuron model. **Cell Death Differ**, v. 21, n. 7, p.1025-35, 2014.
- KUZNIECKY, R. Epilepsy and malformations of cortical development: new developments. **Curr Opin Neurol**, v. 28, n. 2, p. 151-7, Apr 2015.
- LANCASTER, M.A.; KNOBLICH, J.A. Generation of Cerebral Organoids from Human Pluripotent Stem Cells. **Nat Protoc**. v. 9, n. 10, p. 2329–234, Oct 2014.
- LANCASTER, M.A.; KNOBLICH, J.A. Spindle orientation in mammalian cerebral cortical development. **Curr Opin Neurobiol**, v. 22, n. 5, p. 737-46, Oct 2012.
- LEE, J.M.; et al. CAG repeat expansion in Huntington disease determines age at onset in a fully dominant fashion. **Neurology**, v. 78, n. 10, p. 690-5, 2012.
- LEIMEISTER, C.; SCHUMACHER, N.; STEIDL, C.; GESSLER, M. Analysis of HeyL expression in wild-type and Notch pathway mutant mouse embryos. **Mech Dev**, v. 98, n. 1-2, p. 175-178, Nov 2000.
- LERNER, J.T.; SALAMON, N.; HAUPTMAN, J.S.; VELASCO, T.R.; HEMB, M.; WU, J.Y.; SANKAR, R.; DONALD SHIELDS, W.; ENGEL, J.Jr.; FRIED, I.; CEPEDA, C.; ANDRE, V.M.; LEVINE, M.S.; MIYATA, H.; YONG, W.H.; VINTERS, H.V.; MATHERN, G.W. Assessment and surgical outcomes for mild type I and severe type II cortical dysplasia: a critical review and the UCLA experience. **Epilepsia**, v. 50, n. 6, p. 1310-335, Jun 2009
- LEVENTER, R.J.; PHELAN, E.M.; COLEMAN, L.T.; KEAN, M.J.; JACKSON, G.D.; HARVEY, A.S. Clinical and imaging features of cortical malformations in childhood. **Neurology**, v. 53, n. 4, p. 715-722, Sep 1999.
- LEWIS, J. Notch signalling and the control of cell fate choices in vertebrates. **Semin Cell Dev Biol**, v.9, n. 6, p. 583-9, 1998.
- LILLIEN, L. Neural progenitors and stem cells: mechanisms of progenitor heterogeneity. **Curr Opin Neurobiol**, v. 8, n. 1, p. 37-44, 1998.
- LIU, M-L.; ZANG, T.; ZOU, Y.; CHANG, J.C.; GIBSON, J.R.; HUBER, K.M.; ZHANG, C-L. Small molecules enable Neurogenin 2 to efficiently convert human fibroblasts into cholinergic neurons. **Nat Commun**, v. 4, p. 2183, Nov 2013.
- LOPES, A.C.P.; CASALETTI, R.L.; BELEBONI, R.O.; PEREIRA, R.N.R.; VASCONCELOS, C.A.C.; MOREIRA, J.E. Aspectos moleculares da transmissão sináptica. **Medicina**, v. 32,p. 167-88, 1999.
- LOUVI, A.; ARTAVANIS-TSAKONAS, S. NOTCH signalling in vertebrate neural development. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, p. 93-102, 2006. 10.1038/nrn1847.
- MAGLIOCCO, A.; DEMETRICK, D.; SARNAT, H.; HWANG, W. Varicella embryopathy. **Arch Pathol Lab Med**, v. 116, p. 181-86, 1992.
- MALIK, S.; VINUKONDA, G.; VOSE, L.R.; DIAMOND, D.; BHIMAVARAPU, B.B.; HU, F.; ZIA, M.T.; HEVNER, R.; ZECEVIC, N.; BALLABH, P. Neurogenesis continues in the third trimester of pregnancy and is suppressed by premature birth. **J Neurosci**, v. 33, n. 2, p. 411-23, Jan 2013.

- MARCHETTO, M.C.; BRENNAND, K.J.; BOYER, L.F.; GAGE, F.H. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) and neurological disease modeling: progress and promises. **Hum Mol Genet**, v. 20, n. 2, p. 109-115, Oct 2011. doi: 10.1093/hmg/ddr336.
- MARIN, O.; ANDERSON, S.A.; RUBENSTEIN, J.L. Origin and molecular specification of striatal interneurons. **J Neurosci**, v. 20, n. 16, 6063-76, Aug 2000.
- MARIN-VALENCIA, I.; GUERRINI, R.; GLEESON, J.G. Pathogenetic mechanisms of Focal Cortical Dysplasia. **Epilepsia**, v. 55, n. 7, p. 970-78, Jul 2014.
- MARMOR, M.D.; SKARIA, K.B.; YARDEN, Y. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 58, n. 3, p. 903-13, Mar 2004.
- MARTIN-MARTIN, B.; NABOKINA, S.M.; LAZO, P.A.; MOLLINEDO, F. Co-expression of several human syntaxin genes in neutrophils and differentiating HL-60 cells: various isoforms and detection of syntaxin 1. **J Leukoc Biol**, v. 65, n. 3, p. 397-406, Mar 1999.
- MASAMIZU, Y.; OHTSUKA, T.; TAKASHIMA, Y.; NAGAHARA, H.; TAKENAKA, Y.; YOSHIKAWA, K.; OHAMURA, H.; KAGEYAMA, R. Real-time imaging of the somite segmentation clock: revelation of unstable oscillators in the individual presomitic medom cells. **Proc Natl Acad Sci**, v. 103, 1313-318, 2006.
- MCCLENDON, E, et al. Prenatal cerebral ischemia triggers dysmaturation of caudate projection neurons. **Ann Neurol**. v. 75, n. 4, p. 508-24, 2014.
- MCCONNELL, S.K.; KAZNOWSKI, C.E. Cell cycle dependence of laminar determination in developing neocortex. **Science**, v. 254, n. 5029, p. 282-5, 1991.
- MCCONNELL, S.K. Constructing the cerebral cortex: neurogenesis and fate determination. **Neuron**, v. 15, n. 4, p. 761-8, 1995.
- MCGREW, L.L.; LAI, C.J.; MOON, R.T. Specification of the anteroposterior neural axis through synergistic interaction of the Wnt signaling cascade with noggin and follistatin. **Dev Biol**, v. 172, p. 337-42, 1995.
- MÉTIN, C.; BAUDOIN, J.P.; RAKIĆ, S.; PARNAVELAS, J.G. Cell and molecular mechanisms involved in the migration of cortical interneurons. **Eur J Neurosci**, v. 23, n. 4, p. 894-900, 2006.
- MUKHOPADHYAY, A.; JARRETT, J.; CHLON, T.; KESSLER, J.A. HeyL regulates the number of TrkC neurons in dorsal root ganglia. **Dev Biol**, v. 334, n. 1, p. 142-51, Oct 2009.
- MUHLEBNER, A.; GROPPPEL, G.; DRESSLER, A.; REITER-FINK, E.; KASPRIAN, G. et al. Epilepsy surgery in children and adolescents with malformations of cortical development—outcome and impact of the new ILAE classification on focal cortical dysplasia. **Epilepsy Res**, v.108, n.9, p. 1652-61, 2014.
- MULLER, F. J. et al. A call to standardize teratoma assays used to define human pluripotent cell lines. **Cell Stem Cell**, v. 6, n. 5, p. 412-4, May 7 2010.
- NAJM, I.M.; TILELLI, C.Q.; OGHAKIAN, R. Pathophysiological mechanisms of focal cortical dysplasia: a critical review of human tissue studies and animal models. **Epilepsia**, v.48, p. 21-32, 2007.

NAKADA, M.; NISKA, J.A.; MIYAMORI, H.; MCDONOUGH, W.S.; WU, J.; SATO, H.; BERENS, M.E. The phosphorylation of EphB2 receptor regulates migration and invasion of human glioma cells. **Cancer Res**, v. 64, n. 9, p. 3179-85, May 1 2004.

NAKAGAWA, T.; ZHU, H.; MORISHIMA, N.; LI, E.; XU, J.; YANKNER, B.A.; YUAN, J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid β . **Nature**, v. 403, p. 98-103, Jan 6 2000.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, U.S. National Library of Medicine: Gene NEUROG2. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/63973>
Acessado em: 27 de Setembro de 2016.

NITYANANDAM, A.; BALDWIN, K.K. Advances in reprogramming-based study of neurologic disorders. **Stem Cells Dev**, v. 24, n. 11, p.1265-83, 2015.

OPPENHEIM, R.W. Cell death during development of the nervous system. **Annu Rev Neurosci**, v. 14, p. 453-501, 1991.

OSAKADA, F.; TAKAHASHI, M. Neural induction and patterning in mammalian pluripotent stem cells. **CNS Neurol Dirsor Drug Targets**, v. 10, p. 419-32, 2011.

OH, H.S.; LEE, M.C.; KIM, H.S.; LEE, J.S.; LEE, J.H.; KIM, M.K.; WOO, Y.J.; KIM, J.H.; KIM, H.I.; KIM, S.U. Pathophysiologic characteristics of balloon cells in cortical dysplasia. **Childs Nerv Syst**, v. 24, n. 2, p. 175-83, Feb 2008.

PACARY, E.; HENG, J.; AZZARELLI, R.; RIOU, P.; CASTRO, D.; LABEL-POTTER, M.; PARRAS, C.; BELL, D.M.; RIDLEY, A.J.; PARSONS, M.; GUILLEMOT, F. Proneural transcription factors regulate different steps of cortical neuron migration through Rnd-mediated inhibition of RhoA signaling. **Neuron**, v. 69, n. 6, p. 1069-84, Mar 2011.

PACARY, E.; AZZARELLI, R.; GUILLEMOT, F. Rnd3 coordinates early steps of cortical neurogenesis through actin-dependent and independent mechanisms. **Nat Commun**, v. 4, p. 1635, 2013. doi: 10.1038/ncomms2614.

PALMINI, A.; ANDERMANN, F.; OLIVIER, A.; TAMPIERI, D.; ROBITAILLE, Y.; MELANSON, D.; ETHIER, R. Neuronal migration disorders: a contribution of modern neuroimaging to the etiologic diagnosis of epilepsy. **Canadian Journal of Neurological Sciences**, v. 18, p. 580-87, 1991.

PALMINI, A.; HOLTHAUSEN, H. Focal malformations of cortical development: A most relevant etiology of epilepsy in children. **Handb ClinNeurol**, v. 111, p. 549-65, 2013.

PALMINI, A.; NAJM, I.; AVANZINI, G.; BABB, T.; GUERRINI, R.; FOLDVARY-SCHAEFER, N.; JACKSON, G.; LÜDERS, H.O.; PRAYSON, R.; SPREAFICO, R.; VINTERS, H.V. Terminology and classification of the cortical dysplasia. **Neurology**, v. 62, n. 6, p. 2-8, Mar 2004.

PANG, T.; ATEFY, R.; SHEEN, V. Malformations of cortical development. **The Neurologist**, v.14, n. 3, p.181-91, 2008.

PARENT, J.M.; STEWART, A.A. Reprogramming patient-derived cells to study the epilepsies. **Nature Neuroscience**, v. 18, p. 360-66, Feb 2015. doi:10.1038/nn.3944

PARK, I.H.; ARORA, N.; HUO, H.; MAHERALI, N.; AHFELDT, T.; SHIMAMURA, A.; LENSCH, M.W.; COWAN, C.; HOCHEDLINGER, K.; DALEY, G.Q. Disease-specific induced

pluripotent stem cells. **Cell**, v. 134, n. 5, p. 877-86, Sep 2008. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.041.

PARRINI, E. Diagnostic Targeted Resequencing in 349 Patients with Drug-Resistant Pediatric Epilepsies Identifies Causative Mutations in 30 Different Genes. **Hum Mutat**, v. 38, n. 2, p. 216-25, 2017.

PASCA, S.P.; PANAGIOTAKOS, G.; DOLMETSCH, R.E. Generating human neurons in vitro and using them to understand neuropsychiatric disease. **Annu Ver Neurosci**, v. 37, p.479-501, 2014.

PASCUAL-CASTROVIEJO, I.; HERNÁNDEZ-MONEO, J.L.; GUTIÉRREZ-MOLINA, M.L.; VIAÑO, J.; PASCUAL-PASCUAL, S.I.; VELAZQUEZ-FRAGUA, R.; MORALES, C.; QUIÑONES, D. Displasia cortical focal. Correlaciones clínico-radiológicas-patológicas. **Neurología**, v. 27, n. 8, p. 472-80, 2012.

PATERSON, C.; WANG, Y.; KLEINMAN, J.E.; LAW, A.J. Schizophrenia Risk Variation in the NRG1 gene Exerts Effects on NRG1-IV Splicing During Fetal and Early Postnatal Human Neocortical Development. **Am J Psychiatry**, v. 171, n. 9, p. 979-89, Sep 2014.

PFEFER, P.L.; GERSTER, T.; LUN, K.; BRAND, M.; BUSSLINGER, M. Characterization of three novel members of the zebrafish *Pax2/5/8* family: Dependency of *Pax5* and *Pax8* expression on the *Pax2.1 (noi)* function. **Development**, v. 125, p. 3063-74, 1998.

QIAN, X.; NGUYEN, H.N.; SONG, M.M.; HADIONO, C. et al. Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. **Cell**, v. 165, n. 5, p. 1238-54, May 19 2016. doi: 10.1016/j.cell.2016.04.032. Epub 2016 Apr 22.

RAKIC, P. Neuronal migration and contact guidance in the primate telencephalon. **Postgrad Med J**, v. 54, p. 25-40, 1978.

REDIES, C.; TAKEICHI, M. Cadherins in the developing central nervous system: an adhesive code for segmental and functional subdivisions. **Dev Biol**, v. 180, n. 2, p. 413-23, 1996.

REDWINE, J.M.; EVANS, C.F. Markers of central nervous system glia and neurons in vivo during normal and pathological conditions. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 265, p. 119-40, 2002.

"Relatório Anual de Pesquisa e Bolsas de Estudo FY2009 Resumo Financeiro". Escritório do vice-presidente de pesquisa da Universidade de Michigan. 21 de janeiro de 2010. Arquivado no original em 6 de junho de 2010. Retirado em 31 de agosto de 2010.

RIO, C.; RIEFF, H.I.; QI, P.; KHURANA, T.S.; CORFAS, G. Neuregulin and erbB receptors play a critical role in neuronal migration. **Neuron**, v. 19, p. 39-50, 1997.

ROWLAND, N.C.; ENGLLOT, D.J.; CAGE, T.A.; SUGHRUE, M.E.; BARBARO, N.M.; CHANG, E.F. A meta-analysis of predictors of seizure freedom in the surgical management of focal cortical dysplasia. **J Neurosurg**, v. 116, n. 5, p. 1035-41, May 2012.

SAKAMOTO, M.; HIRATA, H.; OHTSUKA, T.; BESSHO, Y.; KAGEYAMA, R. The basic helix-loop-helix genes *Hesr1/Hey1* and *Hesr2/Hey2* regulate maintenance of neural precursor cells in the brain. **J Biol Chem**, v. 278, n. 45, p. 44808-15, Nov 2003.

SAKURAI, T. The role of NrCAM in neural development and disorders--beyond a simple glue in the brain. **Mol Cell Neurosci**, v. 49, n. 3, p. 351-363, Mar 2012. doi: 10.1016/j.mcn.2011.12.002.

SANDOE, J.; EGGAN, K. Opportunities and challenges of pluripotent stem cell neurodegenerative disease models. **Nat Neurosci**, v. 16, n. 7, p. 780-9, 2013.

SANG, L.; COLLIER, H.A.; ROBERTS, J.M. Control of the reversibility of cellular quiescence by the transcriptional repressor HES1. **Science**, v. 321, p. 1095-100, Aug 22 2008.

SARNAT, H.B. **Cerebral dysgeneses: embryology and clinical expression**. New York: Oxford Univ Pr, 1992.

SARNAT, H.B.; MENKES, J.H. How to construct a neural tube. **J Child Neurol**, v. 21, p. 109-24, 2000.

SARNAT, H.B.; FLORES-SARNAT, L. Infantile taupathies: hemimegalencephaly, tuberous sclerosis complex, focal cortical dysplasia 2, ganglioglioma. **Brain**, 2015, v. 37, p. 553-62.

SARNAT, H.; FLORES-SARNAT, L.; CRINO, P.; HADER, W.; BELLO-ESPINOSA, L. Hemimegalencephaly: foetal tauopathy with mTOR hyperactivation and neuronal lipidosis. **Folia Neuropathol**, v. 50, n. 4, p.330-45, 2012.

SATO, T.; SATO, F.; KAMEZAKI, A.; SAKAGUCHI, K.; TANIGOME, R.; KAWAKAMI, K.; SEHARA-FUJISAWA, A. Neuregulin 1 Type II-ErbB Signaling Promotes Cell Divisions Generating Neurons from Neural Progenitor Cells in the Developing Zebrafish Brain. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0127360, May 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0127360.

SAURA, C.A.; CHOI, S.Y.; BEGLOPOULOS, V.; MALKANI, S.; ZHANG, D.; SHANKARANARAYANA RAO, B.S.; CHATTARJI, S.; KELLEHER, R.J.; KANDEL, E.R.; DUFF, K.; KIRKWOOD, A.; SHEN, J. Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration. **Neuron**, v. 42, n. 1, p. 23-36, Apr 2004.

SHIMIZU, C.; AKAZAWA, C.; NAKANISHI, S.; KAGEYAMA, H. MATH-2, a mammalian helix-loop-helix factor structurally related to the product of *Drosophila* proneural gene, atonal, is specifically expressed in the nervous system. **Eur J Biochem**, v. 229, p. 239-48, 1995.

SHIMOJO, H.; OHTSUKA, T.; KAGEYAMA, R. Oscillations in Notch signaling regulate maintenance of neural progenitors. **Neuron**, v. 58, n. 1, p. 52-64. Apr 2008. doi:10.1016/j.neuron.2008.02.014

SIRICHOAT, A.; CHAIJAROONKHANARAK, W.; PRACHANEY, P.; PANNANGRONG, W.; LEKSOMBOON, R.; CHAICHUN, A.; WIGMORE, P.; WELBAT, J.U. Effects of Asiatic Acid on Spatial Working Memory and Cell Proliferation in the Adult Rat Hippocampus. **Nutrients**, v. 7, n. 10, p. 8413-423, Oct 2015.

SISODYA, S.M. Malformations of cortical development: burdens and insights from important causes of human epilepsy. **Lancet Neurol**, v. 3, n. 1, p. 29-38, Jan 2004.

SONG, S.; SANCHEZ-RAMOS, J. Preparation of neural progenitors from bone marrow and umbilical cord blood. **Methods Mol Biol**, v. 438, p. 123-34, 2008.

- SRIKANTH, P.; YOUNG-PEARSE, T.L. Stem cells on the brain: modeling neurodevelopmental and neurodegenerative diseases using human iPSCsCs. **J Neurogenet**, v. 28, n. 1-2, p. 5-29, Mar-Jun 2014.
- TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, M.; ICHISAKA, T.; TOMODA, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861-72, Nov 2007.
- TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663-76, Aug 25 2006.
- TASSI, L.; COLOMBO, N.; GARBELLI, R.; FRANCIONE, S.; LO RUSSO, G.; MAI, R.; CARDINALE, F.; COSSU, M.; FERRARIO, A.; GALLI, C.; BRAMERIO, M.; CITTERIO, A.; SPREAFICO, R. Focal cortical dysplasia: neuropathological subtypes, EEG, neuroimaging and surgical outcome. **Brain**, v. 125, n. 8, p.1719-32, Aug 2002.
- TASSI, L.; PASQUIER, B.; MINOTTI, L.; GARBELLI, R.; KAHANE, P.; BENABID, A.L.; BATTAGLIA, G.; MUNARI, C.; SPREAFICO, R. Cortical Dysplasia: Electroclinical, Imaging, and Neuropathologic Study of 13 Patients. **Epilepsia**, v. 42, n. 9, p.1112-23, Sep 2001.
- TAVERNA, E.; HUTTNER, W.B. Neural progenitor nuclei IN motion. **Neuron**, v. 67, n. 6, p. 906-14, Sep 2010.
- TAYLOR, D.C.; FALCONER, M.A.; BRUTON, C.J.; CORSELLIS, J.A.N. Focal dysplasia of the cerebral cortex in epilepsy. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 34, n. 4, p. 369-87, Aug 1971.
- TAYLOR JP, SATER R, FRENCH J, BALTUCH G, CRINO PB. Transcription of intermediate filament genes is enhanced in focal cortical dysplasia. **Acta Neuropathol**. 102(2):141–48, 2001.
- THOM, M.; MARTINIAN, L.; SEN, A.; CROSS, J.H.; HARDING, B.N.; SISODIYA, S.M. Cortical neuronal densities and lamination in focal cortical dysplasia. **Acta Neuropathol**, v. 110, p. 383-92, 2005.
- THOMSON, J.A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S.S.; WAKNITZ, M.A.; SWIERGIEL, J.J.; MARSHALL, V.S.; JONES, J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, n.5391, p.1145-47, Nov 1998.
- TINT, I.; JEAN, D.; BAAS, P.W.; BLACK, M.M. Doublecortin associates with microtubules preferentially in regions of the axon displaying actin-rich protrusive structures. **J Neurosci**, v. 29, n.35, p.10995-1010, 2009.
- UEDA, M.; SUGIURA, C.; OHNO, K.; KAKITA, A.; HORI, A.; OHAMA, E.; VINTERS, H.V.; MIYATA, H. Immunohistochemical expression of fibroblast growth factor-2 in developing human cerebrum and epilepsy-associated malformations of cortical development. **Neuropathology**, v. 31, n. 6, p. 589-98, Dec 2011.
- UITTENBOGAARD, M.; BAXTER, K.K.; CHIARAMELLO, A. Cloning and characterization of the 5'UTR of the rat anti-apoptotic bcl-w gene. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 389, n. 4, p.657-62, Nov 2009.
- UITTENBOGAARD, M.; CHIARAMELLO, A. The basic helix–loop–helix transcription factor nex-1/Math-2 promotes neuronal survival of PC12 cells by modulating the dynamic

expression of anti-apoptotic and cell cycle regulators. **J Neurochem**, v. 92, n. 3, p. 585-96, Feb 2005.

VASCONCELOS, F.F.; CASTRO, D.S. Transcriptional control of vertebrate neurogenesis by the proneural factor *Ascl1*. **Front Cell Neurosci**, v. 8, p. 412, Dec 2 2014.

VIERBUCHEN, T.; OSTERMEIER, A.; PANG, Z.P.; KOKUBU, Y.; SÜDHOF, T.C.; WERNIG, M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. **Nature**, v. 463, n. 7284, p. 1035-41, Feb 25 2010.

VUONG, C.K.; BLACK, D.L.; ZHENG, S. The neurogenetics of alternative splicing. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, p. 265-81, 2016.

YING, Z.; GONZALEZ-MARTINEZ, J.; BINGAMAN, W.; NAJM, I. Expression of Neural stem cell surface marker CD133 in balloon cells of human Focal cortical dysplasia. **Epilepsia**, v. 46, p.1716-23, 2005.

WANG, L.; WANG, L.; HUANG, W.; SU, H.; XUE, Y.; SU, Z.; LIAO, B.; WANG, H.; BAO, X.; QIN, D.; HE, J.; WU, W.; SO, K.F.; PAN, G.; PEI, D. Generation of integration-free neural progenitor cells from cells in human urine. **Nat Methods**, v. 10, n. 1, p. 84-9, Jan 2013.

WANG, X.; HUANG, X.; FANG, X.; ZHANG, Y.; WANG, W. CRISPR-Cas9 System as a Versatile Tool for Genome Engineering in Human Cells. **Molecular Therapy Nucleic Acids**, v. 5, n. 11, p. e388, 2016. doi:10.1038/mtna.2016.95.

WHITFORD, K.L.; DIJKHUIZEN, P.; POLLEUX, F.; GHOSH, A. Molecular control of cortical dendrite development. **Annu Rev Neurosci**, v. 25, p.127-49, Mar 2002.

WHITFORD, K.L.; MARILLAT, V.; STEIN, E.; GOODMAN, C.S.; TESSIER-LAVIGNE, M.; CHEDOTAL, A.; GHOSH, A. Regulation of Cortical Dendrite Development by Slit-Robo Interactions. **Neuron**, v. 33, p. 47-61, 2002.

WICHTERLE, H.; TURNBULL, D.H.; NERY, S.; FISHELL, G.; ALVAREZ-BUYLLA, A. In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. **Development**, v.128, n.19, p. 3759-771, Oct 2001.

WILKINSON, G.W.G.; AICHELER, R.J.; WANG, E.C.Y. **Natural Killer Cells and Human Cytomegalovirus**. In: Reddehase M, editor. Cytomegaloviruses: From Molecular Pathogenesis to Intervention. Caister Academic Press, p. 172-90, 2013.

WINES-SAMUELSON, M.; HANDLER, M.; SHEN, J. Role of presenilin-1 in cortical lamination and survival of Cajal-Retzius neurons. **Dev Biol**, v. 277, n. 2, p. 332-46, 2005.

WU, S.X.; GOEBBELS, S.; NAKAMURA, K.; NAKAMURA, K.; KOMETANI, K.; MINATO, N.; KANEKO, T.; NAVE, K.A.; TAMAMAKI, N. Pyramidal neurons of upper cortical layers generated by NEX-positive progenitor cells in the subventricular zone. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 102, p. 17172-177, Nov 2005.

ZENG, H.; SHEN, E.H.; HOHMANN, J.G.; OH, S.W.; BERNARD, A.; ROYALL, J.J.; GLATTFELDER, K.J.; SUNKIN, S.M.; MORRIS, J.A.; GUILLOZET-BONGAARTS, A.L.; SMITH, K.A.; EBBERT, A.J.; SWANSON, B.; KUAN, L.; PAGE, D.T.; OVERLY, C.C.; LEIN, E.S.; HAWRYLYCZ, M.J.; HOF, P.R.; HYDE, T.M.; KLEINMAN, J.E.; JONES, A.R. Large-scale cellular-resolution gene profiling in human neocortex reveals species-specific molecular signatures. **Cell**, v. 149, p. 483-96, Apr 2012.

ZHANG, S.; CHUNG, W.; WU, G.; EGAN, S.E.; XU, K. Tumor-Suppressive Activity of Lunatic Fringe in Prostate through Differential Modulation of Notch Receptor Activation. **Neoplasia**, v. 16, n. 2, p. 158-67, Feb 2014.

ZHOU, T.; BENDA, C.; DUZINGER, S.; HUANG, Y.; LI, X.; LI, Y.; GUO, X.; CAO, G.; CHEN, S.; HAO, L.; CHAN, Y.C.; NG, K.M.; HO, J.C.; WIESER, M.; WU, J.; REDL, H.; TSE, H.F.; GRILLARI, J.; GRILLARI-VOGLAUER, R.; PEI, D.; ESTEBAN, M.A. Generation of induced pluripotent stem cells from urine. **J Am Soc Nephrol**, v. 22, n. 7, p.1221-28, Jul 2011.

ZHOU, Y.; ZHEN, H.; MEI, Y.; FENG, J.; XU, S.; FU, X. PI3K/AKT mediated p53 downregulation participates in CpG DNA inhibition of spontaneous B cell apoptosis. **Cell Mol Immunol**, v. 6, n. 3, p. 175-80, Jun 2009.

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

MECANISMOS DE SINALIZAÇÃO DURANTE A NEURODIFERENCIAÇÃO E NEUROGÊNESE DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS (iPS) DERIVADAS DE FIBROBLASTOS HUMANOS

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa intitulado “Mecanismos de sinalização durante a neurodiferenciação e neurogênese de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) derivadas de fibroblastos humanos”

I. Justificativa e objetivos da pesquisa: As células-tronco se comunicam por mecanismos de sinalização celular, um complexo sistema de comunicação que coordena as atividades e funções celulares. Os fibroblastos são células que compõem o tecido conjuntivo (tecido que é responsável pela organização e estrutura dos órgãos do corpo) e são encontrados em diferentes locais, principalmente na pele. No laboratório, os fibroblastos da pele podem ser transformados em células imaturas, podendo assim ser utilizados como única oportunidade para pesquisar os mecanismos de sinalização durante a neurodiferenciação e neurogênese de células-tronco.

II. O objetivo desse projeto: Transformar células da pele em linhagens de células-tronco pluripotente induzidas (células imaturas) para estudar os mecanismos envolvidos durante a neurodiferenciação e neurogênese dessas células.

III. Procedimentos a serem utilizados: Durante seu procedimento cirúrgico, uma amostra residual de pele de cerca de 6 cm² será coletada pelo seu cirurgião. Essa amostra coletada não irá gerar nenhum tipo de intercorrência no procedimento cirúrgico, será retirada das bordas da incisão cirúrgica não gerando nenhum tipo de cicatriz adicional ou influência na recuperação normal do procedimento cirúrgico que o(a) senhor(a) irá se submeter. Esse fragmento de pele será encaminhado ao laboratório onde será colocado em um ambiente controlado para o crescimento das células (fibroblastos) que compõem a camada mais interna (derme) da pele. Após esse procedimento, as células cultivadas serão tratadas com um conjunto de fatores genéticos para que assumam um papel semelhante às células que compõem os tecidos no início do desenvolvimento do sistema nervoso. As células serão então colocadas em um ambiente semelhante aos que estimulam a formação do sistema nervoso para que possam ser estudadas as possíveis alterações nas trajetórias de maturação e de migração das células que formariam os tecidos do sistema nervoso.

IV. Desconfortos ou riscos esperados: Não existe nenhum risco na participação desse projeto. O material coletado será retirado da borda da incisão cirúrgica durante o procedimento padrão, não gerando nenhum tipo de alteração, desconforto ou dor no processo. A coleta é rápida e será realizada pelo cirurgião, não interferindo na atenção do cirurgião nem mesmo no tempo normal do procedimento cirúrgico e nos desfechos de cicatrização e recuperação.

V. Os benefícios que se pode obter: O único benefício em participar deste programa é que, doando um fragmento de pele durante seu procedimento cirúrgico, você estará contribuindo para um estudo que buscará compreender os mecanismos envolvidos na neurodiferenciação e neurogênese de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) derivadas de fibroblastos humanos, com isso, contribuindo para responder algumas questões pertinentes aos mecanismos de ação das células-tronco em reparos ao sistema nervoso central.

VI. Custos de participação, liberdade de abandono e garantia de privacidade: Não haverá, para o participante, nenhum custo com a realização da pesquisa proposta. Caso você decida não participar do programa, não sofrerá nenhum prejuízo no atendimento dispensado a você. A decisão de não participar do programa não irá afetar o seu atendimento no hospital. Será garantida toda privacidade em relação à participação nesse projeto, bem como os dados obtidos com o resultado dos experimentos, sendo esses utilizados apenas em produções científicas com total sigilo em relação à identidade dos participantes.

VII. Caso tiver novas perguntas sobre esse estudo, posso chamar a Dra. Denise Cantarelli Machado (pesquisador responsável) no telefone: (51) 3320-3000 ramal: 2364, a pesquisadora Fernanda Majolo, pelo fone 96742336 ou o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS no telefone: 0xx51 – 33203345. Localizado à Av. Ipiranga, 6681, Prédio 40, sala 505, CEP 90619-900, nos horários das 08:00 às 11:30 e das 14:00 às 17:30.

Assinatura do paciente

Assinatura do pesquisador

CONSENTIMENTO PARA DOAÇÃO FRAGMENTO DE PELE

Declaro que li as informações anteriormente descritas a respeito do projeto de pesquisa “Mecanismos de sinalização durante a neurodiferenciação e neurogênese de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) derivadas de fibroblastos humanos” e tive a oportunidade de esclarecer todas as minhas dúvidas.

Aceito participar da doação de um fragmento de pele para o projeto proposto, com o objetivo de pesquisa, não sendo usado para doação. Este material poderá ser depositado, armazenado e utilizado durante o prazo de vigência do projeto.

Assinatura do paciente Nome do paciente Data

Assinatura do pesquisador Nome do pesquisador Data

Este formulário foi lido para _____ (paciente) em
____/____/____ pelo _____ (pesquisador) enquanto eu
estava presente.

Assinatura da testemunha Nome da testemunha Data

AFIRMAÇÃO DO INVESTIGADOR: foi oferecido ao participante a oportunidade de tirar dúvidas a respeito dos riscos e desconfortos que podem se associar à participação no programa. Todas as respostas foram devidamente respondidas.

ANEXO 2

PROTOCOLLO: SPINΩ FOREBRAIN ORGANOIDS

SPINΩ FOREBRAIN ORGANOIDS

DAY 0: Make embryoid bodies (EBs) using AggreWell 800

Plate desired # of cells (I usually use 6×10^6 cells/well) in AggreWell 800 in either:

- mTeSR1 with rock inhibitor (50 μ M, use at 200x)
- hPSC medium + rock inhibitor (50 μ M) (use this if iPSCs were maintained in TeSR-E8: I have found that TeSR-E8 does not support the formation of EBs very well) for 50 mL:
 - 39 mL DMEM/F12
 - 10 mL knockout serum
 - 0.5 mL MEM/NEAA
 - 0.5 mL GlutaMAX
 - 1x BME
 - 4 ng/mL FGF

DAY 1: transfer EBs to flask in dorsomorphin/A-83 medium

Transfer EBs to a T-25 ultra low-attachment flask; one flask can accommodate EBs from one well of an AggreWell 800. Use 12 mL of media per flask. Make sure to shake the flask side-to-side/back-and-forth to distribute EBs evenly to prevent them from clumping together in the incubator.

Dorsomorphin/A83 medium:

Component	50 mL	100 mL
DMEM/F12	38.5 mL	77 mL
20% Knockout serum	10 mL	20 mL
1x GlutaMAX (100x stock)	0.5 mL	1 mL
1x MEM/NEAA (100x stock)	0.5 mL	1 mL
1x BME (1000x stock)	50 μ L	100 μ L
2 μ M Dorsomorphin (10 mM stock)	10 μ L	20 μ L
2 μ M A-83 (20 mM stock)	5 μ L	10 μ L

DAY 2 – 4: maintain EBs in dorsomorphin/A-83 medium

On the next day (day 2), use a 5 mL pipette to gently pipette the EBs in the flask to remove any debris on the EB surface. Lay the flask at a 45° angle to let the EBs settle into the corner. Change the media and again on day 4.

DAY 5: gradually change the media to CS induction media

Remove half the media (6 mL) and replace with CS induction media (6 mL).
The media should now be 50% Dorso/A83 and 50% CS.

CS Induction medium:

Component	50 mL	100 mL
DMEM/F12	48 mL	96 mL
1x N2 (100x stock)	0.5 mL	1 mL
1x GlutaMAX (100x stock)	0.5 mL	1 mL
1x MEM/NEAA (100x stock)	0.5 mL	1 mL
1x Pen/Strep (100x stock)	0.5 mL	1 mL
10 µg/mL Heparin (20 mg/mL stock)	25 µL	50 µL
1 µM CHIR 99021 (10 mM stock)	5 µL	10 µL
1 µM SB431542 (10 mM stock)	5 µL	10 µL

DAY 6: change half the media to CS induction media

Remove half the media (6 mL) and replace with CS induction media (6 mL).
The media should now be 25% Dorso/A83 and 75% CS. Thaw Matrigel at 4°C O/N.

DAY 7: embed EBs in Matrigel

1. Take ~ 20 EBs in 50 µL of CS media and add to 100 µL of Matrigel. Mix well.
2. Spread this mixture onto the bottom of a ultra low-attachment dish. You can comfortably fit 6-8 of these “pies” on a 10 cm dish. You can also use a ultra-low attachment 6-well plate and just place a single “pie” per well.
3. Use a 20 µL pipette tip to move the EBs around so that they do not aggregate.
4. Place in 37°C incubator for 30 minutes.
5. Add CS media to each well. If using 10 cm dish, add 15 mL of media. If using 6-well plate, add 3 mL of media/well. Be gentle and try not to disturb the “pies.” Some of them will detach and float and others will not- either is fine and does not affect the final organoid.

DAY 9 – 13: change CS media every other day

Fully change the media with CS media every other day. Be careful to not disturb the pies. It is okay if some of them are floating and some of them are stuck to the bottom. It is okay if you cannot aspirate all the media out of the dish.

DAY 14: transfer organoids to SpinΩ

1. Pipette everything (media + matrigel + organoids) into a 15 mL conical tube
2. Triturate 3 times with a 5 mL pipette to remove the Matrigel mechanically
3. Let the organoids settle to the bottom of the tube while leaving the supernatant + debris at the top
4. Aspirate off the supernatant + debris: it is okay if there is still some matrigel and miscellaneous debris left in the tube (don't aspirate the organoids!)
5. Transfer to spinΩ in **differentiation media (without vitamin A)** using a 5 mL pipette
 - Use B27 without vitamin A for 2 weeks (D14-D28) to allow the progenitors to divide and then switch to B27 with vitamin A afterwards
 - Each well of the 12-well plate can accommodate 10-20 organoids although the Song lab frequently puts in more than this
 - Sometimes the organoids can stick to the bottom of the plate when you first put them in because of the remaining matrigel, you can try to triturate the organoids in the 12-well plate with a pipette before putting the spinning lid on
 - We normally add 3.5 mL of media to each well

Differentiation media:

Component	50 mL	100 mL
DMEM/F12	47 mL	94 mL
1x N2 (100x stock)	0.5 mL	1 mL
1x B27 (50x stock)	1 mL	2 mL
1x GlutaMAX (100x stock)	0.5 mL	1 mL
1x MEM/NEAA (100x stock)	0.5 mL	1 mL
1x Pen/Strep (100x stock)	0.5 mL	1 mL
2.5 µg/mL insulin (10 mg/mL stock)	12.5 µL	25 µL
1x BME (1000x stock)	50 µL	100 µL

DAY 15-28: maintain organoids in differentiation media

Change differentiation media using B27 without vitamin A every 2 days for 2 weeks.

DAY 29-70: maintain organoids in differentiation media

Begin using B27 with vitamin A at this point and change media every 2 days until day 70.

DAY 71: maintain organoids in maturation media

Change media to maturation media, change media every 2 days.

Maturation media:

Component	50 mL	100 mL
Neurobasal	47.8 mL	95.6 mL
1x B27 (50x stock)	1 mL	2 mL
1x GlutaMAX (100x stock)	0.5 mL	1 mL
1x Pen/Strep (100x stock)	0.5 mL	1 mL
20 ng/mL BDNF (100 µg/mL stock)	10 µL	20 µL
20 ng/mL GDNF (100 µg/mL stock)	10 µL	20 µL
1 ng/mL TGF-β (10 µg/mL stock)	5 µL	10 µL
0.2 mM ascorbic acid (0.2M stock)	50 µL	100 µL
0.5 mM dbcAMP (0.2M stock)	125 µL	250 uL

ANEXO 3

PEÇAS NECESSÁRIAS PARA A MONTAGEM DO SPINΩ

Peças necessárias para a montagem do SPINΩ.

Parts	Catalog #	Vendor	Vendor description	# per unit	Inventory (3/16/17)	To purchase 3/16/17, to make 3 more units
Motor	TD-060-090	SuperDr oid Robots	IG16 6VDC 090 RPM Gear Motor	1	0	
Motor (new one)	a12042600u x0294	Amazon/ uxcell	0.7A 6V 90RPM Electric Speed Reducing DC Gear Box Geared Motor	1	6	
Gear with insert	A 1Z 2MYZ05052 06	SDP/SI	Module 0.5, 52 Teeth, 20° Pressure Angle, Acetal / Brass Insert Spur Gear	12	16	25
Gear without insert	A 1M 2MYZ05052	SDP/SI	Module 0.5, 52 Teeth, 20° Pressure Angle, Acetal / No Insert Spur Gear	12	0	
Bearing	2685T11	McMaste r-Carr	Metric PTFE Sleeve Bearing, for 6MM Shaft Diameter, 12MM OD, 10MM Length	12	16	25
Aluminum rod	92510A308	McMaste r-Carr	Aluminum Unthreaded Spacer, 1/4" OD, 3/4"	2	6	
Nut	91841A005	McMaste r-Carr	Type 18- 8 Stainless Steel Hex Nut	1 box contains 100	4	3
Long Screw	91772A118	McMaste r-Carr	18-8 Stainless Steel Pan Head Phillips Machine Screw, 4-40 Thread, 1-1/8" Length	1 box contains 100	4	3
Screw for motor	91420A002	McMaste r-Carr	Metric Flat Head Phillips Machine Screw Zinc-Plated Steel, M2 Size, 5mm Length, .4mm Pitch	1 box contains 100	about 50	
Charger	NA	Amazon	Hosa Cable ACD477 Universal AC Power Supply	1	0	3
Socket	NA	Amazon	DC005 PCB Mount 3 Pins	1 pack contains 10	9	

Wire	NA	Amazon	2.1mmx5.5mm DC Female Socket Power Jack 10 Pcs VIMVIP® 10 Pairs 100mm JST 2 Pin Connector Plug Lead Wire for Rc Lipo Battery Discharge Esc Bec Board Line Male & Female Pack of 20pcs	1 pack contains 10	plenty		
Tool set	NA	Amazon	Kingsmith 6092C 70 in 1 Professional Screwdriver Set Magnetic Screwdriver Kit Auto and Homeowner's Tool Kit for Phones, Cameras, Watches, Small and Large Appliances	1			
12-well plate	CLS3737- 100EA	Sigma	Corning® Costar® cell culture plates	1 box contains 100			
Male wire connectors				2	2		10
Female wire connectors				2	0		10
3D PRINTED PARTS							
Spin shaft					24		
Spin shaft mirror					19		
Well covers					3		
Motor mount					2		2

ANEXO 4
APROVAÇÃO DO CEP

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Mecanismos de sinalização durante a neurodiferenciação e neurogênese de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) derivadas de fibroblastos humanos.

Pesquisador: Denise Cantarelli Machado

Área Temática: Projetos de pesquisa que envolvam organismos geneticamente modificados (OGM), células-tronco embrionárias e organismos que representem alto risco coletivo, incluindo organismos relacionados a eles, nos âmbitos de: experimentação, construção, cultivo, manipulação, transporte, transferência, importação, exportação, armazenamento, liberação no meio ambiente e descarte;

Versão: 3

CAAE: 37977114.3.0000.5336

Instituição Proponente: UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 915.598

Data da Relatoria: 10/01/2015

Apresentação do Projeto:

tese de doutorado de aluno, orientado pela pesquisadora conta com os principais elementos necessários, foi aprovada pela comissão científica e enviada pelo sistema sipesq

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Determinar o perfil de sinalização dos receptores tirosina quinases envolvidos na neurodiferenciação e neurogênese de fibroblastos humanos desdiferenciados (células-tronco pluripotentes induzidas-iPS).

Objetivo Secundário:

- Investigar a expressão das proteínas Oct4, Nanog, Sox2, nas células desdiferenciadas; - Investigar a expressão das proteínas neurais Nestin, - tubulina, GFAP, NeuN, Neurofilament, Mash1 e de proliferação celular (Ki67) durante o processo de neurodiferenciação e neurogênese; -

Endereço: Av.Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505

Bairro: Partenon

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3320-3345

Fax: (51)3320-3345

E-mail: cep@pucrs.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 915.598

Determinar a expressão dos genes Oct3, Nanog, Sox2, Nestin, Mash1, GFAP e GAPDH por PCR em tempo real (QT-PCR) durante o processo de neurodiferenciação e neurogênese; - Determinar os níveis dos fatores tróficos BDNF, VEGF, Neurotrofina 3 e 4, NGF e FGF durante o processo de neurodiferenciação e neurogênese; - Determinar os níveis de ativação dos receptores tirosina quinases (RTKs) durante o processo de neurodiferenciação e neurogênese.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não existe nenhum risco na participação desse projeto. O material coletado será retirado da borda da incisão cirúrgica durante o procedimento padrão, não gerando nenhum tipo de alteração, desconforto ou dor no processo. A coleta é rápida e será realizada pelo neurocirurgião, não interferindo na atenção do cirurgião nem mesmo no tempo normal do procedimento cirúrgico e nos desfechos de cicatrização e recuperação.

Benefícios:

Este estudo buscará compreender os mecanismos envolvidos na neurodiferenciação e neurogênese de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) derivadas de fibroblastos humanos, com isso, contribuindo para responder algumas questões pertinentes aos mecanismos de ação das células-tronco em reparos ao sistema nervoso central.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

na metodologia não está claro como serão trabalhados os dados estatísticos, pois são apenas 3 pessoas e não aparece claramente em quantos 'pedaços' será dividido cada segmento, para possibilitar análises matemáticas significativas

explicação recebida: está escrita de forma semelhante à do projeto-- serão 3 pessoas e a divisão celular possibilita análise estatística!

no termo de consentimento faltam endereço e horário de funcionamento do cep- arrumado

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505
Bairro: Partenon **CEP:** 90.619-900
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3320-3345 **Fax:** (51)3320-3345 **E-mail:** cep@pucls.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 915.598

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

no orçamento aparece um alto valor, a ser desembolsado pelo pesquisador: explicar melhor de onde virá (o cronograma do projeto não combina como o da plataforma explicação - todo material já está comprado, é de projetos anteriores

revisto na última redação

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

liberado

Recomendações:

liberado

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

liberado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

PORTO ALEGRE, 15 de Dezembro de 2014

Assinado por:
Rodolfo Herberto Schneider
(Coordenador)

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505
Bairro: Partenon **CEP:** 90.619-900
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3320-3345 **Fax:** (51)3320-3345 **E-mail:** cep@pucrs.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Mecanismos de sinalização durante a neurodiferenciação e neurogênese de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) derivadas de fibroblastos humanos.

Pesquisador: Denise Cantarelli Machado

Área Temática: Projetos de pesquisa que envolvam organismos geneticamente modificados (OGM), células-tronco embrionárias e organismos que representem alto risco coletivo, incluindo organismos relacionados a eles, nos âmbitos de: experimentação, construção, cultivo, manipulação, transporte, transferência, importação, exportação, armazenamento, liberação no meio ambiente e descarte;

Versão: 4

CAAE: 37977114.3.0000.5336

Instituição Proponente: UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.002.011

Data da Relatoria: 25/03/2015

Apresentação do Projeto:

O presente protocolo foi enquadrado como pertencente à(s) seguinte(s) Área(s) Temática(s) Especial(is) "Projetos de pesquisa que envolvam organismos geneticamente modificados (OGM), células-tronco embrionárias e organismos que representem alto risco coletivo, incluindo organismos relacionados a eles, nos âmbitos de: experimentação, construção, cultivo, manipulação, transporte, transferência, importação, exportação, armazenamento, liberação no meio ambiente e descarte.".

No documento intitulado "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_418921.pdf", item introdução, lê-se: "Terapia celular e seus mecanismos As células-tronco como todas as outras, se comunicam por mecanismos de sinalização celular, que fazem parte de um complexo sistema de comunicação que governa e coordena as atividades e funções celulares. A habilidade que as células possuem em perceber e responder corretamente ao seu ambiente forma a base do desenvolvimento, reparo e homeostasia dos tecidos. Erros existentes no processamento da informação celular são responsáveis por diversas doenças. A melhor compreensão dos processos de sinalização celular

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.002.011

permitirá, no futuro, o tratamento de muitas doenças de maneira mais eficaz. Como o grande diferencial das células tronco está na sua capacidade de diferenciação, a terapia celular traz consigo uma questão crucial. Quem ou o que é responsável pela diferenciação das células-tronco em um tipo de tecido específico? Serão as células residentes? Serão os sinais ali localizados? Serão os sinais emitidos pelas células que ali irão se alojar? Ou será o contato entre as células residentes com as células recém chegadas? Assim, a identificação dos receptores que são ativados, das moléculas que se ligam a esses receptores e das vias de sinalização que possam atuar durante a diferenciação das células-tronco adultas irá auxiliar na elucidação de, pelo menos, parte dos mecanismos envolvidos na diferenciação de células tronco adultas em diversas linhagens celulares.

Neurogênese e seus reguladores O desenvolvimento do sistema nervoso central é um processo que inclui a expressão de genes pró-neurais e o subsequente comprometimento e migração de seus precursores, bem como a formação de sinapses funcionais. A neurogênese é um processo essencialmente regulado por genes pró-neurais, alguns já identificados, que respondem a uma gama de moléculas sinalizadoras. É consenso entre os pesquisadores, que a produção de distintas subpopulações neuronais, a partir das células-tronco neurais e suas progenitoras, requer reguladores temporais e que o desenvolvimento neuronal bem sucedido está diretamente relacionado com a precisão e o momento da entrada e saída destas células no ciclo celular. Muitos fatores de transcrição neuronais atuam em conjunto com proteína reguladoras do ciclo celular e esses mecanismos reguladores transcricionais e epigenéticos são regulados por meio das vias de transdução de sinais. As neurotrofinas e outros fatores de crescimento são expressos em quantidades limitadas tanto no sistema nervoso central quanto periférico, controlando o número de prolongamento axonais necessários para uma densidade adequada de dendritos e conexões neurais. Essas proteínas se ligam aos receptores das quinases relacionadas com a tropomiosina que subsequentemente emitem sinais para o citoplasma e núcleo. O fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o fator de crescimento epidérmico (EGF), juntamente com outros fatores que possuem atividade neurotrófica formam uma família de receptores de tirosina quinases (RTKs) associadas com uma grande variedade de respostas intra-neuronais necessárias para a sobrevivência, diferenciação, regeneração e plasticidade (Hausott et al, 2009). Os RTKs neuronais mais relevantes, principalmente os receptores Trks, FGF e EGF tem a capacidade de influenciar as vias de sinalização neuronais intrínsecas e sua expressão gênica moldando a morfologia neuronal e determinando seu fenótipo neuroquímico. A ligação do ligante induz a ativação induzida e a auto-fosforilação que resulta no recrutamento de várias moléculas adaptadoras aos resíduos de tirosina quinase presentes no domínio intracelular dos RTKs. As proteínas adaptadoras

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.002.011

desencadeiam a ativação de várias vias de sinalização intracelular, cuja principal cascata ativada pelos RTKs envolve a via da Ras/Raf/MEK/ERK, a PI3K/Akt e a da fosfolipase C. A principal função da sinalização dos RTKs é manter os níveis de proteínas necessários para a sobrevivência, crescimento axonal e coordenar as alterações na transcrição gênica, síntese e degradação de proteínas. É provável que a plasticidade do sistema nervoso não exija, necessariamente, uma série distinta de programas transcricionais, mas que utilize os mecanismos existentes de sobrevivência, extensão do axônio e outros para se adaptar as alterações das condições ambientais. Distintos reguladores transcricionais atuam em conjunto para regular a diferenciação, migração, posicionamento do corpo celular, crescimento axonal e sobrevivência dos neurônios durante o desenvolvimento bem como para o neurônio adulto, relacionado com as funções cognitivas como aprendizado, memória, adição, depressão e ansiedade. Células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) As células-tronco embrionárias (ESC) são derivadas da massa celular interna do blastocisto e possuem habilidade de crescimento indefinido mantendo-se indiferenciadas. A reprogramação de células somáticas adultas, como fibroblastos, é uma abordagem atraente e promissora para a medicina regenerativa. Recentemente, alguns trabalhos relataram a indução de pluripotência em fibroblastos de camundongos e logo após de humanos através da transdução com vetores virais contendo os genes OCT4, C-MYC, KLF4 e SOX2. As chamadas células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) têm morfologia característica de CTEs, expressam marcadores de células pluripotentes e são capazes de se diferenciar in vitro e in vivo em tecidos derivados dos três folhetos embrionários. Assim, a geração de iPS a partir da indução de células somáticas por fatores específicos, poderia representar uma alternativa para a obtenção de células tronco histo-compatíveis. Atualmente, as células-tronco pluripotentes induzidas oferecem a oportunidade de investigação in vitro dos diversos aspectos envolvidos na gênese e desenvolvimento de doenças neurodegenerativas."

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Determinar o perfil de sinalização dos receptores tirosina quinases envolvidos na neurodiferenciação e neurogênese de fibroblastos humanos desdiferenciados (células-tronco pluripotentes induzidas-iPS).

Objetivo Secundário:

- Investigar a expressão das proteínas Oct4, Nanog, Sox2, nas células desdiferenciadas;

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.002.011

- Investigar a expressão das proteínas neurais Nestin,
- tubulina, GFAP, NeuN, Neurofilament, Mash1 e de proliferação celular (Ki67) durante o processo de neurodiferenciação e neurogênese;
- Determinar a expressão dos genes Oct3, Nanog, Sox2, Nestin, Mash1, GFAP e GAPDH por PCR em tempo real (QT-PCR) durante o processo de neurodiferenciação e neurogênese;
- Determinar os níveis dos fatores tróficos BDNF, VEGF, Neurotrofina 3 e 4, NGF e FGF durante o processo de neurodiferenciação e neurogênese;
- Determinar os níveis de ativação dos receptores tirosina quinases (RTKs) durante o processo de neurodiferenciação e neurogênese.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conteúdo não analisado pela CONEP.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo de "Delineamento Experimental", coleta de amostra residual de pele de cerca de 6 cm², visando determinar o perfil de sinalização dos receptores tirosina quinases envolvidos na neurodiferenciação e neurogênese de fibroblastos humanos. Compreender os mecanismos das cascatas de sinalização durante a neurodiferenciação e neurogênese é o objetivo deste estudo, que irá permitir responder questões pertinentes aos mecanismos de ação das células-tronco no reparo do sistema nervoso central. De acordo com a Resolução CNS nº 466 de 2012, o protocolo em tela não se enquadra na área temática referida "Projetos de pesquisa que envolvam organismos geneticamente modificados (OGM), células-tronco embrionárias e organismos que representem alto risco coletivo, incluindo organismos relacionados a eles, nos âmbitos de: experimentação, construção, cultivo, manipulação, transporte, transferência, importação, exportação, armazenamento, liberação no meio ambiente e descarte", não cabendo a apreciação da CONEP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não se aplica.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, a CONEP entende que o protocolo de pesquisa em tela, não se enquadra nas Áreas Temáticas Especiais "Projetos de pesquisa que envolvam organismos geneticamente

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

**COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA**

Continuação do Parecer: 1.002.011

modificados (OGM), células-tronco embrionárias e organismos que representem alto risco coletivo, incluindo organismos relacionados a eles, nos âmbitos de: experimentação, construção, cultivo, manipulação, transporte, transferência, importação, exportação, armazenamento, liberação no meio ambiente e descarte.”. (considerando as informações do item IX.4 da Resolução CNS nº 466/2012), não cabendo a sua análise ética à CONEP, mas sim delegada somente ao CEP.

Situação do Parecer:

Devolvido

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP - delibera pela devolução do protocolo de pesquisa ao Comitê de Ética em Pesquisa - CEP, por não se enquadrar em nenhuma das áreas temáticas descritas no item IX.4 da Resolução CNS nº 466 de 2012.

BRASILIA, 27 de Março de 2015

**Assinado por:
Gabriela Marodin
(Coordenador)**

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Mecanismos de sinalização durante a neurodiferenciação e neurogênese de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) derivadas de fibroblastos humanos.

Pesquisador: Denise Cantarelli Machado

Área Temática: Projetos de pesquisa que envolvam organismos geneticamente modificados (OGM), células-tronco embrionárias e organismos que representem alto risco coletivo, incluindo organismos relacionados a eles, nos âmbitos de: experimentação, construção, cultivo, manipulação, transporte, transferência, importação, exportação, armazenamento, liberação no meio ambiente e descarte;

Versão: 5

CAAE: 37977114.3.0000.5336

Instituição Proponente: UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.164.991

Data da Relatoria: 29/08/2015

Apresentação do Projeto:

O CEP-PUCRS apreciou e aprovou a seguinte solicitação referente ao projeto "Mecanismos de sinalização durante a neurodiferenciação e neurogênese de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) derivadas de fibroblastos humanos":

- Inclusão de fibroblastos de pacientes com Displasia Cortical, de um outro projeto já aprovado pelo CEP-PUCRS no ano de 2013, intitulado "AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO E NEURODIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTE INDUZIDAS (iPS) DE PACIENTES COM DISPLASIA CORTICAL".

Objetivo da Pesquisa:

O CEP-PUCRS apreciou e aprovou a seguinte solicitação referente ao projeto "Mecanismos de sinalização durante a neurodiferenciação e neurogênese de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) derivadas de fibroblastos humanos":

- Inclusão de fibroblastos de pacientes com Displasia Cortical, de um outro projeto já aprovado pelo CEP-PUCRS no ano de 2013, intitulado "AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO E NEURODIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTE INDUZIDAS (iPS) DE PACIENTES COM DISPLASIA CORTICAL".

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505

Bairro: Partenon

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3320-3345

Fax: (51)3320-3345

E-mail: cep@pucls.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 1.164.991

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O CEP-PUCRS apreciou e aprovou a seguinte solicitação referente ao projeto "Mecanismos de sinalização durante a neurodiferenciação e neurogênese de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) derivadas de fibroblastos humanos":

- Inclusão de fibroblastos de pacientes com Displasia Cortical, de um outro projeto já aprovado pelo CEP-PUCRS no ano de 2013, intitulado "AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO E NEURODIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTE INDUZIDAS (iPS) DE PACIENTES COM DISPLASIA CORTICAL".

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O CEP-PUCRS apreciou e aprovou a seguinte solicitação referente ao projeto "Mecanismos de sinalização durante a neurodiferenciação e neurogênese de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) derivadas de fibroblastos humanos":

- Inclusão de fibroblastos de pacientes com Displasia Cortical, de um outro projeto já aprovado pelo CEP-PUCRS no ano de 2013, intitulado "AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO E NEURODIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTE INDUZIDAS (iPS) DE PACIENTES COM DISPLASIA CORTICAL".

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos apresentados.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505
Bairro: Partenon **CEP:** 90.619-900
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3320-3345 **Fax:** (51)3320-3345 **E-mail:** cep@pucls.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 1.164.991

PORTO ALEGRE, 30 de Julho de 2015

Assinado por:
Rodolfo Herberto Schneider
(Coordenador)

Endereço: Av.Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505

Bairro: Partenon

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3320-3345

Fax: (51)3320-3345

E-mail: cep@pucrs.br

ANEXO 5

ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO EM REVISTA INDEXADA

Taylor-type focal cortical dysplasia: An update review on cellular and molecular aspects and current developments

Fernanda Majolo^{12*}, Daniel Rodrigo Marinowic¹², Denise Cantarelli Machado¹²

¹ *Brain Institute of Rio Grande do Sul (BraIns)*; ² *Postgraduate Program in Medicine and Health Sciences (PUCRS)*.

***Corresponding author:** Postgraduate Program in Medicine and Health Sciences, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90610000, Brazil. *E-mail address:* fernandamajolo@hotmail.com

Abstract

Focal cortical dysplasia (FCD) is the most commonly encountered developmental malformation that causes refractory epilepsy, being Taylor-type focal cortical dysplasia (TTFCD) one of the most usual neuropathological findings in tissue resected therapeutically from patients with drug-resistant epilepsy. Clinical symptoms are more severe in TTFCD frequently seen in children. Unlike the other types of FCD, it is characterized by laminar disorganization and dysplastic neurons, compromising the organization of the cortex in six-layers histologically known, morphology and/or cell location can be altered. To review the pathogenesis of this disease is important due to the necessity to update the results found from the publications that have been growing over the years. Here, we presented an update review, related to the classification, clinical presentations, pathogenesis and diagnostic findings for TTFCD. Also, through a search in Pubmed, we included all data until now related to cellular and molecular aspects, in humans for this disease. It was found a wide variety of aspects covered in 53 publications related to molecular and cellular biology, among them: down and upregulation of different genes, mutations, alterations of the micro RNA expression profile, expression patterns of different genes, protein expression, multidrug-resistance and cell analysis. The most of publications are related to FCD type IIB studies. Within the published topics, mutations in PIK3A-Akt3-mTOR signaling pathway genes have the higher amount of publications by different research groups.

Keywords: Drug-resistant epilepsy; humans; Pubmed.

1. Introduction

Focal cortical dysplasia (FCD) is the most common developmental malformation that can cause refractory epilepsy (Lee & Kim, 2013). It's a subtype of cortical maldevelopment, constituting the major class of cortical malformations between series of surgical brain specimens obtained from patients with intractable epilepsies (Blümcke et al., 2009). FCD type I presents mild symptomatic expression and late onset, is more often seen in adults, with changes present in the temporal lobe. FCD type II, also known as Taylor-type focal cortical dysplasia (TTFCD), focus of this review, is one of the most common neuropathological findings in tissue resected therapeutically from patients with drug-resistant epilepsy, being FCD type IIB the most frequent (Sisodiya et al., 2009). In type IIB more extensive changes occur outside the temporal lobe with predilection for the frontal lobes, presenting clinical symptoms more severe usually seen in children. Drug treatment for FCD commonly proves ineffective, whereas appropriate surgical treatment can be curative in many cases.

The TTFCD characteristics include cytological abnormalities with hypertrophic neurons outside the anatomical site found in the V layer and/or malformed cells with poorly defined membrane, single or multiple nucleus, and eosinophilic cytoplasm with neuronal cell and glial lineage characteristics (Kabat & Krol, 2012; Taylor et al., 1971).

Many studies have shown promising results and important insights beyond TTFCD allowing to understand more about cellular and molecular aspects. Given the growing interest in neurodevelopment, the aim of the present review is to present an update on TTFCD type A and B, primarily focusing on its classification, clinical presentations, pathogenesis and diagnostic findings. Here, we also present all publications on cellular and molecular biology, in humans, about the disease until now.

2. Classification

FCD classification undergo several modifications since 1971 when was first distinguished from developmental malformations in 10 patients by Taylor and colleagues. In his original article, Taylor described FCD as a distinct pathology characterized by laminar disorganization and dysplastic neurons, with a compromise of the cortex organization in its six histological layers traditionally known. Described histopathological findings similar to the abnormalities found in tuberous sclerosis, however, when compared in more detail, differences between the images could be noticed and classified (Taylor et al., 1971).

Palmini et al. (2004) classified FCD according to white matter and cortical layer architecture (Figure 1). In FCD type I there is presence of heterotopic neurons in the white

matter, alteration in the architecture of the cortical layer and presence of giant neurons. FCD type IA refers to architectural disturbances of cortical lamination and FCD type IB includes additional cytoarchitectural abnormalities, i.e. hypertrophic pyramidal neurons outside layer V (Tassi et al., 2002). Already the TTFCD, presents with gross histopathological changes including dysmorphic neurons (TTFCD type A) and additional balloon cells (TTFCD type B).

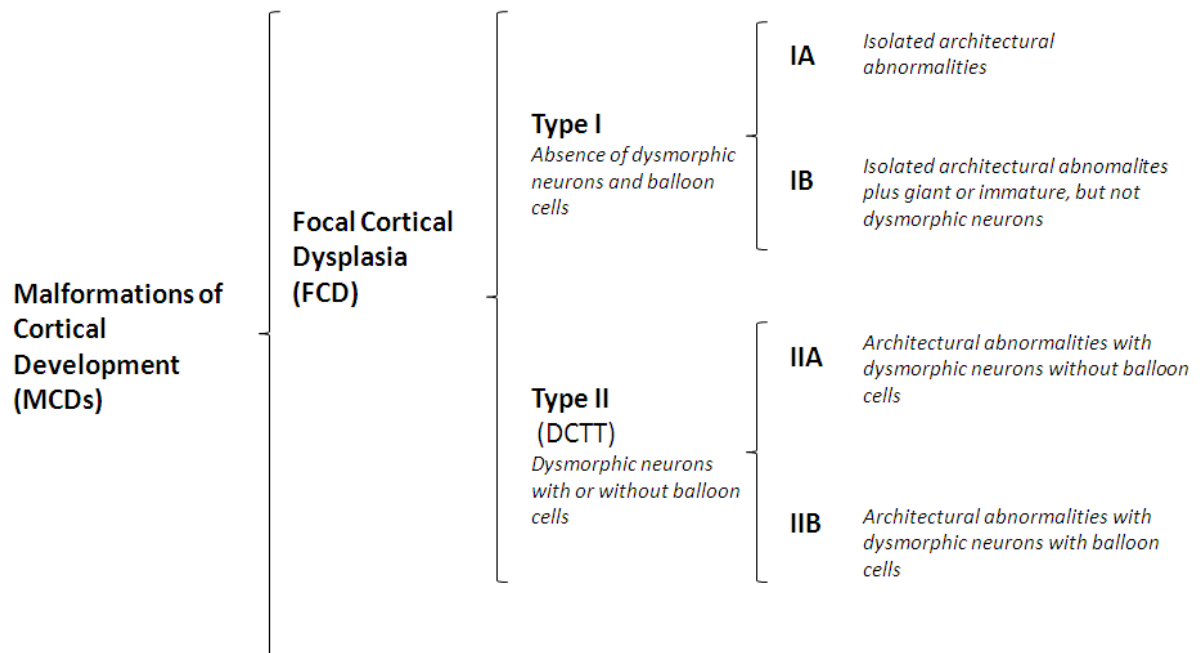


Figure 1. Illustrative scheme of Palmini classification. Figure taken from: Palmini, A. et al. Terminology and classification of the cortical dysplasias. *Neurology*, 2004.

Since then the “Palmini classification” system (Palmini et al., 2004) has been re-structured and classified into neuropathological subtypes (type IA, IB, IIA, IIB, AND III) based on the severity of cytoarchitectural disruption—tangential or radial dispersion, or loss of laminar structure and the presence of unique cells types such as cytomegalic neurons or balloon cells (Crino, 2015). In 2012, a classification was created dividing FCD into three groups based mainly on histological findings, which is accepted by the International League Against Epilepsy (Blümcke et al., 2011). This classification provides evidence of differences in the morphology and expression of reliable proteins that differentiate FCD subtypes. It presents an association between FCDs and other brain lesions, such as tumors, hippocampal sclerosis, and vascular malformations. This classification is entirely descriptive and does not consider the molecular genetic etiologies in FCD.

3. Clinical presentations and pathogenesis

TTFCD is one of the most common neuropathological findings in tissue resected therapeutically from patients with drug-resistant epilepsy (Sisodiya et al., 2009). In relation to its prevalence, there is a lack of data, is diagnosed in 29–39% of all patients with FCD who undergo surgery, with a higher proportion reported in paediatric series (Tassi et al., 2002; Fauser et al., 2006; Harvey et al., 2008). Aspects like size of lesion (Palmini et al., 1995) its location (Wyllie et al., 1994; Chassoux et al., 2000) and age at epilepsy onset (Fauser et al., 2006; Wyllie et al., 1994; Chassoux et al., 2000) are highly variable from patient to patient having a wide range of clinical presentations.

With 30–40% of cases not adequately controlled with medication, epilepsy poses a huge burden to individuals and families. The FCD does not have its causes firmly established, and until now the ability to cause seizures do not have explanations. TTFCD presents the most severe clinical symptoms of cortical dysplasia, and it is often seen in children. In this type, more extensive changes occur outside the temporal lobe with predilection for the frontal lobes. Patients with severe type II dysplasia present at a younger age, and have a higher frequency of seizures per day including status epilepticus, and more extratemporal lesions than those with mild type I dysplasia (which usually present with lesions in the temporal lobe)(Harvey et al., 2008). Investigators report that 60–70% of patients with FCD type II have a below average full-scale IQ and are more likely to have neuropsychological deficits than patients with FCD type I (Widdess-Walsh et al., 2005). Patients with epilepsy onset in early childhood are more commonly affected by mental retardation (Lortie et al., 2002) than adults (Chassoux et al., 2000; Bast et al., 2006). According to Majores (2005) insulin-growth factor receptor cascade may be involved in the pathogenesis of FCD type IIB and indicate that FCD type IIA and IIB are pathogenetically distinct (Majores et al., 2005).

Areas of type II dysplasia involve an earlier failure of cortical development compared with mild type I dysplasia based on studies from morphologic and *in vitro* cellular electrophysiologic (Cepeda et al., 2006, 2007; Andre et al., 2010). So, the seizure generation can be the consequence of incomplete cellular maturation, and varying from mild to severe cortical dysplasia tissue the mechanisms producing seizures (Andre et al., 2010).

4. Diagnostic

Diagnosis will have a major effect on management of this pathology, as it should prompt referral for specialist assessment. There are some limitations in the correct

identification of different FCD types or subtypes (Tassi et al., 2002; Colombo, et al., 2012; Tarsi, et al., 2012; Chamberlain, et al., 2009) and a high number of false negatives is detected with FCD type I and slightly fewer with FCD type IIA (about 50% sensitivity). FCD IIB is more easily to be identified (about 90% sensitivity) (Colombo et al., 2012; Tarsi et al., 2012).

FCD remains underdiagnosed, even with well-developed methods of neuroimaging and quite effective surgical techniques. According to Kabat (2012) the hope is MR imaging using magnetic field of higher intensity – 3T, the development of DTI technique, dynamic perfusion MRI, fMRI and computed analysis of white and gray matter abnormalities, as well as the new PET ligands and modified EEG using a higher number of electrodes.

Mature white matter neurons and cortical neurons share morphological and phenotypic characteristics. In contrast, in FCD type II, the dysmorphic neurons are typically present in the white matter, and more easily appreciated as abnormal (Blümcke, et al., 2009). Seizures with early onset in neonatal period or childhood are more likely FCD type II with multilobar or hemispheric lesion, while FCD type I with a small focus, usually in the temporal lobe, predominates in adults (Fauser, et al., 2006; Fauser, et al., 2004; Krsek, et al., 2008).

5. Ongoing research

Electronic databases, using Pubmed, were searched for articles to collect all data until now related to cellular and molecular aspects of FCD type II, in humans. Only full-text English-language articles were included. Studies were excluded if they did not relate to cellular and molecular aspects. Articles about seizures and imaging were excluded, for example, antiepileptic drugs in controlling seizures in epilepsy or magnetic resonance imaging abnormalities and histopathological comparisons. If the abstract met the inclusion criteria, the full-text article was obtained and reviewed.

A total of 53 studies were identified. Articles directly analyzing aspects of molecular and cellular biology in patients affected by DCFTT are relatively recent, since the first publications appeared in 2004. In September 2004, Fassunke et al (2004) published the first article in patients with DCFTT, entitled “Analysis of chromosomal instability in focal cortical dysplasia of Taylor's balloon cell type”, and then, in October of the same year, Fauser et al. (2004) published the second article entitled “CD34-immunoreactive balloon cells in cortical malformations” where they analyzed the immunohistochemical distribution pattern of the CD34 epitope in surgical specimens from 34 patients with FCD IIB. In Fassunke et al (2004) article they tested the hypothesis of whether chromosomal instability constitutes a genome-wide phenomenon in a patient cohort. Seven microsatellite markers were analyzed in 14

surgical FCD IIB specimens. DNA from single laser-microdissected cells, i.e., balloon cells versus control neurons obtained from adjacent cortex was harvested for PCR amplification and subsequent fluorescent fragment length gel electrophoresis.

To date, the largest number of articles published for cellular and molecular biology has been in 2015, with the publication of 8 articles (Figure 2). From all publications, the vast majority of publications were on the study of FCD type IIB, being 36 studies, comparing to the lack of study with FCD type IIA, only 6 studies. Eleven studies are applicable to both types (Table 1).

Figure 2. Annual amount of articles published to date, in humans, related to all molecular and cellular biology studies involving Focal cortical dysplasia type IIA e IIB.

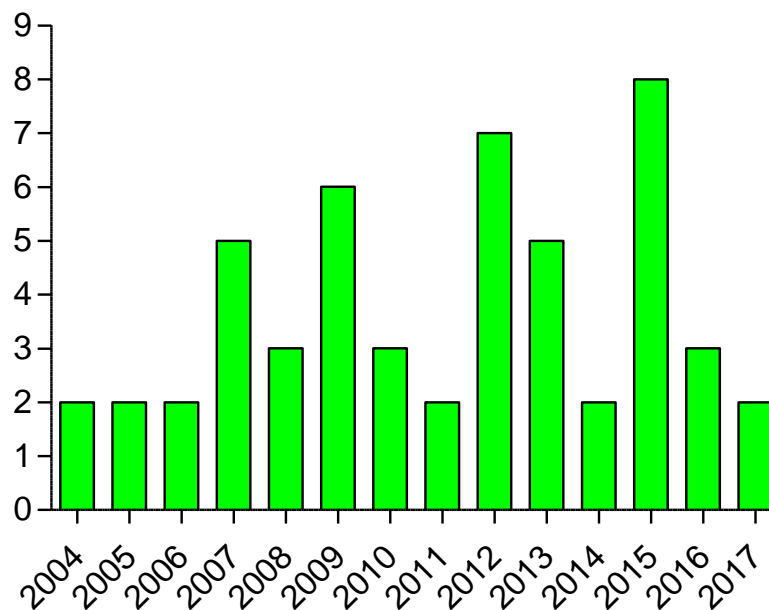


Table 1. List of all molecular and cellular studies, in humans, published until now related to Focal cortical dysplasia type IIA e IIB.

Type	Target	Article title	Major findings	References	Year
IIA e IIB	mTOR pathway genes	Somatic Mutations in TSC1 and TSC2 Cause Focal Cortical Dysplasia.	Brain somatic mutations in TSC1 and TSC2 cause FCD and that in utero application of the CRISPR-Cas9 system is useful for generating neurodevelopmental disease models of somatic mutations in the brain.	Lim et al.	2017
IIB	Pan-neuronal neuronal nuclei (NeuN) and layer-specific protein	Characterization of focal cortical dysplasia with balloon cells by layer-specific markers:	Parvalbumin-positive, inhibitory interneurons are highly vulnerable in contrast to other interneuron subtypes, possibly related to the epileptic condition.	Nakagawa et al.	2017

		expression (Reelin, Calbindin, Calretinin, SMI32 (nonphosphorylated neurofilament H), Parvalbumin, transducin-like enhancer protein 4 (TLE4), and Vimentin	Evidence for differential vulnerability of interneurons.		
IIA e IIB	Levetiracetam	Paradoxical Effect of Levetiracetam in Newly Diagnosed Type II Focal Cortical Dysplasia.	We document a paradoxical effect induced by LEV monotherapy in a patient with type II focal cortical dysplasia at LEV serum levels within the therapeutic range.	Fois et al	2016
IIB	CD47 and CD200	Downregulation of CD47 and CD200 in patients with focal cortical dysplasia type IIB and tuberous sclerosis complex.	Microglial activation may be partially caused by CD47/SIRP- α - and CD200/CD200R-mediated reductions in the immune inhibitory pathways within FCD IIB and TSC cortical lesions where chronic neuroinflammation has been established. Upregulation or activation of CD47/SIRP- α and CD200/CD200R may have therapeutic potential for controlling neuroinflammation in human FCD IIB and TSC.	Sun et al.	2016
IIA	mTOR	Association of MTOR Mutations With Developmental Brain Disorders, Including Megalencephaly, Focal Cortical Dysplasia, and Pigmentary Mosaicism.	Mutations of MTOR may be sufficient to cause cellular hypertrophy in cultured neurons and may provide a demonstration of the pattern of mosaicism in brain and substantiate the link between mosaic mutations of MTOR and pigmentary mosaicism in skin.	Mirzaa GM et al.	2016
IIB	Micro RNA	Analysis of Altered Micro RNA Expression Profiles in Focal Cortical Dysplasia IIB.	The hippo signaling pathway was proposed to be highly related with the pathogenesis of focal cortical dysplasia type IIB.	Li L et al.	2016
IIA	mTOR	Hemispheric cortical dysplasia secondary to a mosaic somatic mutation in MTOR.	Somatic-specific mutations in mTOR and related genes should be considered in a broader spectrum of patients with hemispheric malformations and more restricted forms of cortical dysplasia.	Leventer RJ et al.	2015
IIA	DEPDC5	Familial cortical dysplasia type IIA caused by a germline	Histopathological features of cortical dysplasia associated with a DEPDC5 mutation, confirms mTOR dysregulation in the	Scerri T et al.	2015

		mutation in DEPDC5.	malformed tissue and expands the spectrum of neurological manifestations of DEPDC5 mutations to include severe phenotypes with large areas of cortical malformation.		
IIB	TRPC1	Expression Patterns of TRPC1 in Cortical Lesions from Patients with Focal Cortical Dysplasia.	The overexpression and specific cellular location of TRPC1 might be related to the epileptogenesis of FCD.	Zang Z et al.	2015
IIB	p57/Kip2	Characteristic expression of p57/Kip2 in balloon cells in focal cortical dysplasia.	Some functional significance of the protein on the cytoplasmic processes of balloon cells and appear consistent with the notion that the cells are abnormally differentiated progenitor cells.	Kimura T et al.	2015
IIB	mTOR	Somatic Mutations in the MTOR gene cause focal cortical dysplasia type IIB.	Low-prevalence somatic mutations in mTOR in FCD type IIB, indicates that activating somatic mutations in MTOR cause FCD type IIB.	Nakashima M et al.	2015
IIB	Autophagy-related proteins	Expression of autophagy-related proteins in malformations of cortical development.	The dysmorphic neurons and balloon cells/giant cells of TSC and FCD IIB show abnormality in autophagy, resulting in intracytoplasmic protein accumulation. There are differences in molecular pathogenesis in these cell types.	Chen S et al.	2015
IIB	Adenosine kinase	Adenosine kinase expression in cortical dysplasia with balloon cells: analysis of developmental lineage of cell types.	Adenosine kinase might be a target in the treatment of epilepsy associated with FCD.	Luan G et al.	2015
IIA	PI3K/AKT	PI3K/AKT pathway mutations cause a spectrum of brain malformations from megalencephaly to focal cortical dysplasia.	PI3K/AKT pathway mutations is an important cause of epileptogenic brain malformations and megalencephaly, hemimegalencephaly, and focal cortical dysplasia is part of a single pathogenic spectrum.	Jansen LA et al.	2015
IIA e IIB	Growth-associated protein 43	Growth-associated protein 43 and progressive epilepsy in	GAP-43 proteins are not only associated with intrinsic epileptogenicity but may be markers of progressive epilepsy	Ying Z et al.	2014

		cortical dysplasia.	and predictors of postoperative seizure outcome in patients with pharmacoresistant epilepsy due to FCD IIA/B.		
IIA e IIB	Astrocyte-related receptors	Expression of astrocyte-related receptors in cortical dysplasia with intractable epilepsy.	Overexpression of these receptors in the brains of patients with intractable epilepsy may be associated with activation of intracellular and glio-neuronal signaling pathways that contribute to epileptogenesis.	Sukigara S et al.	2014
IIA e IIB	akt1-positive neurons	Interaction between akt1-positive neurons and age at surgery is associated with surgical outcome in children with isolated focal cortical dysplasia.	Astrogliosis and overexpression of neuronal Akt1 protein may be important factors in the pathogenesis of FCD and suggests that the pathogenesis of FCD Type I may differ from that of FCD Type II in children.	Miles L et al.	2013
IIB	Bone morphogenetic protein-4	Expression of bone morphogenetic protein-4 in the cortical lesions of focal cortical dysplasia IIB and the tuberous sclerosis complex.	The downregulation and altered cellular distribution of BMP-4 protein observed in MCDs suggests that BMP-4 may be involved in the pathogenesis of abnormal cortical development.	Guo W et al.	2013
IIB	TRPV1	Expression of TRPV1 in cortical lesions from patients with tuberous sclerosis complex and focal cortical dysplasia type IIB.	The over-expression of TRPV1 in cortical lesions of TSC and FCDIIB suggested the possible involvement of TRPV1 in the intrinsic and increased epileptogenicity of malformations of cortical development associated epilepsy diseases and may represent a potential antiepileptogenic target.	Shu HF et al.	2013
IIA e IIB	Interleukin 17	The interleukin 17 system in cortical lesions in focal cortical dysplasias.	The overexpression of the IL-17 system and the activation of the IL-17 signal transduction pathway may be involved in the epileptogenicity of cortical lesions in FCDs, thus representing a novel potential target for antiepileptic therapy.	He JJ et al.	2013
IIA e IIB	Major histocompatibility complex class I	Differential expression of major histocompatibility complex class I in developmental glioneuronal lesions.	The induction of MHC-I in neuronal cells appears to be a feature of type II FCD, TSC and GG and may represent an important accompanying event of the immune response, associated	Prabowo AS et al.	2013

			with blood-brain barrier dysfunction, in these developmental lesions.		
IIB	Human papillomavirus	Detection of human papillomavirus in human focal cortical dysplasia type IIB.	A new association between HPV16 E6 and FCDIIB and demonstrate for the first time HPV16 E6 in the human brain.	Chen J et al.	2012
IIA e IIB	Layer-specific marker	Delayed maturation and differentiation of neurons in focal cortical dysplasia with the transmantle sign: analysis of layer-specific marker expression.	Differences between FCD IIB and FCD IIA with more cells having the immature marker in upper layer markers in the former. By analyzing layer-specific marker expression patterns, we identified apparent neuronal maturation differences between FCD IIA and FCD IIB in cases of transmantle dysplasia.	Sakakibara T et al.	2012
IIB	Nogo-A system	Expression of the Nogo-A system in cortical lesions of pediatric patients with tuberous sclerosis complex and focal cortical dysplasia type IIB.	The activation of Nogo-A via the NgR/LINGO-1/TROY signal transduction pathways, but not NgR/LINGO-1/P75, may be involved in the development and/or seizure activity of cortical lesions in tuberous sclerosis complex and focal cortical dysplasia type IIB.	Yu SX et al.	2012
IIB	Matrix metalloproteinase 9	Increased expression of matrix metalloproteinase 9 in cortical lesions from patients with focal cortical dysplasia type IIB and tuberous sclerosis complex.	Overexpression and spatial distribution patterns of MMP9 may be linked with the intractable epilepsy caused by FCDIIB and TSC.	Li S et al.	2012
IIB	Voltage-gated sodium channel Nav1.3	Upregulated expression of voltage-gated sodium channel Nav1.3 in cortical lesions of patients with focal cortical dysplasia type IIB.	Upregulation of Nav1.3 protein and a specific cellular distribution of Nav1.3 proteins in FCDIIB lesion tissue samples, suggesting that Nav1.3 may be involved in the generation of epileptic activity in FCDIIB.	Yu S et al.	2012
IIA e IIB	Tuberous sclerosis	Altered inhibition in tuberous sclerosis and type IIB cortical dysplasia.	Expression and function of GABA(A)Rs in TSC and FCD type IIB suggest the relative benzodiazepine insensitivity and more excitatory action of GABA compared to FCD type IIA. These factors may contribute to resistance of seizure activity to	Talos DM et al.	2012

			anticonvulsants that increase GABAergic function, and may justify add-on trials of the NKCC1 inhibitor bumetanide for the treatment of TSC and FCD type IIB-related epilepsy.		
IIA e IIB	PI3K	Expression of PI3K pathway proteins in refractory epilepsy associated with cortical malformation development.	PI3K pathway, at least in part, involves in the occurrence of MCD, and may play an important role in the pathogenesis.	Ni HC et al.	2012
IIB	Connexin 43	Expression of connexin 43 in the human epileptic and drug-resistant cerebral cortex.	A rearrangement of Cx43-positive elements is part of abnormal tissue organization in FCD type IIB, and that cryptogenic epilepsies include forms with increased Cx43 mRNA expression. The data implicate functional consequences of altered Cx43 expression, and therefore of altered gap junctional coupling, in abnormal network properties of subtypes of human refractory epilepsies.	Garbelli R et al.	2011
IIB	Aquaporin 4	Aquaporin 4 expression in control and epileptic human cerebral cortex.	As the efficiency of AQP4 in regulating water and ion homeostasis in extracellular space depends on its spatial distribution in astrocytes, the different distribution of AQP4 protein in the FCD type IIB samples may modify fluid homeostasis control and the regular functioning of neuronal cells.	Medici V et al.	2011
IIB	Innate and adaptive immunity	Evaluation of the innate and adaptive immunity in type I and type II focal cortical dysplasias.	Indicate a prominent activation of both innate and adaptive immunity, with involvement of different inflammatory pathways in FCD II cases, supporting the possible involvement of inflammation in the epileptogenesis of these lesions, as well as the notion that FCD II is pathologically distinct from FCD I.	Iyer A et al.	2010
IIB	Interleukin 6 system	Expression of the interleukin 6 system in cortical lesions from	Overexpression in the IL-6 system and activation of IL-6 signal transduction pathways may	Shu HF et al.	2010

		patients with tuberous sclerosis complex and focal cortical dysplasia type IIB.	contribute to the pathogenesis of cortical lesions in TSC and FCDIIB.		
IIB	GFAP Delta164/Deltaexon 6	Immunohistochemical characterization of the out-of frame splice variants GFAP Delta164/Deltaexon 6 in focal lesions associated with chronic epilepsy.	The possible role of this subpopulation of astrocytes in epilepsy is likely minor, compared to astrocytes expressing other GFAP isoforms.	Boer K et al.	2010
IIB	Doublecortin-like (DCL)	Doublecortin-like (DCL) expression in focal cortical dysplasia and cortical tubers.	The prominent postnatal expression of DCL by BCs/GCs and DNPs in FCD and TSC supports an important role for this microtubule associated protein, also during early human cortical development, which could be relevant to the pathogenesis of these developmental glioneuronal malformations.	Boer K et al.	2009
IIB	Doublecortin	Doublecortin expression in focal cortical dysplasia in epilepsy.	Persistent cellular DCX expression is confirmed in normal adult cortex. Characteristic expression patterns in layer II of FCD IA could indicate delayed or abnormal cortical maturation rather than ongoing cytotogenesis. This could be indicative of enhanced local cortical plasticity as well as a potential diagnostic feature of this type of pathology.	Srikandarajah N et al.	2009
IIB	Hamartin variants	Hamartin variants that are frequent in focal dysplasias and cortical tubers have reduced tuberin binding and aberrant subcellular distribution in vitro.	Fundamental functional impairment of hamartin and the TSC1 stop mutants hamartin and hamartin in vitro.	Lugnier C et al.	2009
IIB	Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-delta	Expression patterns of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-delta in epilepsy-associated lesional pathologies.	GFAP-delta expression patterns in HS overall appears to mirror regional reactive gliosis. It is a useful marker for the demonstration of balloon cells in FCD and TSC, which may be relevant to their abnormal size and localization. The lack of GFAP-delta within heterotopia supports their composition from	Martinian L et al.	2009

			cells destined for deeper cortical layers.		
IIA	Synaptic vesicle protein 2A	Expression patterns of synaptic vesicle protein 2A in focal cortical dysplasia and TSC-cortical tubers.	The pattern of SV2A immunoreactivity with reduced neuropil expression and altered cellular and subcellular distribution suggests a possible contribution of SV2A to the epileptogenicity of these malformations of cortical development. Knowledge of the expression pattern of SV2A in epilepsy-associated pathologies may be valuable for the evaluation of the effectiveness of AEDs targeting this protein.	Toering ST et al.	2009
IIB	Pleomorphic xanthoastrocytoma	Pleomorphic xanthoastrocytoma associated with long-standing Taylor-type IIB-focal cortical dysplasia in an adult.	The tumor was assumed to be associated with the brain, with Taylor-type-IIB focal cortical dysplasia. The patient's condition deteriorated, with tumor recurrence and widespread leptomeningeal seeding to the whole spinal cord.	Kim B et al.	2009
IIB	Vascular endothelial growth factor A (VEGFA) and B (VEGFB) and VEGF receptors 1	Cellular distribution of vascular endothelial growth factor A (VEGFA) and B (VEGFB) and VEGF receptors 1 and 2 in focal cortical dysplasia type IIB.	These autocrine/paracrine effects could play a role in the development of FCD, preventing the death of abnormal neuronal cells. The expression of VEGFA and its receptors in glial cells within the dysplastic cortex indicates that VEGF-mediated signaling could contribute to astroglial activation and associated inflammatory reactions.	Boer K et al.	2008
IIB	Granule cell dispersion	Balloon cells associated with granule cell dispersion in the dentate gyrus in hippocampal sclerosis.	This observation opens up the debate regarding the origin of balloon cells and CD34 expression and their temporal relationship to seizures.	Thom M et al.	2008
IIB	Tuberin and hamartin	Expression of tuberin and hamartin in tuberous sclerosis complex-associated and sporadic cortical dysplasia of Taylor's balloon cell type.	Loss of TSC1 and TSC2 products expression in balloon cells of both cortical dysplasia type IIB in TSC-related and sporadic patients suggests that FCD type IIB may represent the focal form of TSC.	Grajkowska W et al.	2008

IIB	G1-phase cell cycle proteins	An investigation of the expression of G1-phase cell cycle proteins in focal cortical dysplasia type IIB.	Dysregulation of cell cycle pathways may occur in focal cortical dysplasia, which opens further areas for exploration as potential new treatment avenues.	Thom M et al.	2007
IIB	Developmental lineage of cell types	Developmental lineage of cell types in cortical dysplasia with balloon cells.	There is a heterogeneous and differential profile of lineage and neurochemical marker proteins in human FCD that provide insights into the developmental and cellular phenotype of BCs and DNs.	Lamparello P et al.	2007
IIB	Pi3K	Differential Pi3K-pathway activation in cortical tubers and focal cortical dysplasias with balloon cells.	Recruitment of different Pi3K-cascade factors in the molecular pathogenesis of giant cells in cortical tubers vs. balloon cells in FCD(IIB) and provides new implications for the development of treatment strategies for these cortical malformations.	Schick V et al.	2007
IIB	Chloride transporters, Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ -cotransporter and K ⁺ -Cl ⁻ -cotransporter	Differential expression patterns of chloride transporters, Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ -cotransporter and K ⁺ -Cl ⁻ -cotransporter, in epilepsy-associated malformations of cortical development.	The cellular distribution of CCTs, with high expression of NKCC1 in dysplastic neurons and altered subcellular distribution of KCC2 resembles that of immature cortex and suggests a possible contribution of CCTs to the high epileptogenicity of malformations of cortical development.	Aronica E et al.	2007
IIB	Phosphatidylinositol 3-kinase	Alterations of phosphatidylinositol 3-kinase pathway components in epilepsy-associated glioneuronal lesions.	These alterations may relate to compromised interactions of dysplastic cellular components in epilepsy-associated glioneuronal lesions and be involved in aberrant PI3K-pathway signaling in epilepsy-associated malformations.	Schick V et al.	2007
IIA	Parvalbumin-	Densities of parvalbumin-immunoreactive neurons in non-malformed hippocampal sclerosis-temporal neocortex and in cortical dysplasias.	Reduction of inhibitory parvalbumin-immunoreactive interneurons in the epileptic neocortex affected by MCD as well as in morphologically unaffected epileptic temporal neocortex, thus representing a possible mechanism for their epileptogenicity.	Zamecnik J et al.	2006
IIB	P-glycoprotein	Vascular colocalization of P-glycoprotein,	The demonstrated colocalization of P-gp, BCRP and MVP in	Sisodiya SM	2006

		multidrug-resistance associated protein 1, breast cancer resistance protein and major vault protein in human epileptogenic pathologies.	microvascular endothelium in epileptogenic human brain tissue has important implications for functional experiments (including single knock-out mice studies), work with specific and broad-spectrum inhibitors of transport function, and any eventual trials of treatment of refractory epilepsy involving modulation of the function of these proteins.	et al.	
IIB	Mcm2	Mcm2 labelling of balloon cells in focal cortical dysplasia.	As Mcm2 specifically identifies balloon cells populations, this marker may be of diagnostic value in the subtyping of FCD lesions in patients with epilepsy.	Thom M et al.	2005
IIB e IIA	Cortical neuronal densities and lamination	Cortical neuronal densities and lamination in focal cortical dysplasia.	The preservation of relative differences in neuronal densities between cortical layers and laminar patterns of neurofilament staining in FCD would support the view that the temporal sequence of lamination is not affected.	Thom M et al.	2005
IIB	CD34	CD34-immunoreactive balloon cells in cortical malformations.	No significant correlation was found between CD34 expression and genetic alterations of the TSC1 gene, which is affected in many FCD and TSC patients and which plays a role in the regulation of cell size.	Fauser S et al.	2004
IIB	Chromosomal instability	Analysis of chromosomal instability in focal cortical dysplasia of Taylor's balloon cell type.	The molecular pathogenesis of FCD IIB is associated with TSC1.	Fassunke J et al.	2004

We found a wide variety of aspects covered in 53 publications related to molecular and cellular biology, among them: down and upregulation of different genes, mutations, altered micro RNA expression profile, expression patterns of different genes, protein expression, multidrug-resistance and also cell analysis. Among the published topics, mutations in PIK3A-Akt3-mTOR signaling pathway genes has the higher amount of publications by different research groups.

Several studies demonstrated that the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT3/mechanistic target of rapamycin (mTOR)–signaling pathway is activated in FCD type IIB (Baybis et al., 2004; Sato et al., 2010; Ljungberg et al., 2006; Takei et al., 2014; Crino et al., 2011; Poduri et al., 2013; Schick et al., 2007). This pathway regulates cell proliferation, metabolism, autophagy, and apoptosis in developing cerebral cells. Furthermore, some cortical malformations are demonstrated to possess somatic mutations in genes of the PI3K/AKT3/mTOR-signaling pathway (Riviere et al., 2012; Lee et al., 2012; Lindhurst et al., 2011; Poduri et al., 2012; D’Gama et al., 2015; Baulac et al., 2015; Schick et al., 2006; Jansen et al., 2015).

Brain somatic mutations in mTOR account for 15%–25% of TTFCD, characterized by cortical dyslamination and dysmorphic neurons. However, the genetic etiologies of FCDII-affected individuals who lack the mTOR mutation remain unclear. Recently, Lim et al. (2017) performed deep hybrid capture and amplicon sequencing (read depth of 100×–20,012×) of five important mTOR pathway genes—PIK3CA, PIK3R2, AKT3, TSC1, and TSC2—by using paired brain and saliva samples from 40 FCDII individuals negative for mTOR mutations. All identified mutations induced hyperactivation of the mTOR pathway by disrupting the formation or function of the TSC1-TSC2 complex. Furthermore, in utero CRISPR-Cas9-mediated genome editing of *Tsc1* or *Tsc2* induced the development of spontaneous behavioral seizures, as well as cytomegalic neurons and cortical dyslamination. These results show that brain somatic mutations in TSC1 and TSC2 cause FCD and that in utero application of the CRISPR-Cas9 system is useful for generating neurodevelopmental disease models of somatic mutations in the brain.

Nakashima et al. (2015), found in their studies that mTOR inhibitors would be able to alleviate intractable epilepsy in FCD type IIB, the low-prevalence somatic mutations in mTOR in FCD type IIB, indicating that activating somatic mutations in mTOR cause FCD type IIB. In the same year, Leventer et al. (2015) reported the novel finding of an mTOR mutation associated with nonsyndromic cortical dysplasia. Somatic-specific mutations in mTOR and related genes should be considered in a broader spectrum of patients with hemispheric malformations and more restricted forms of cortical dysplasia. One year later, Mirzaa et al. (2016), show in their data that mutations of mTOR are associated with a spectrum of brain overgrowth phenotypes extending from FCD type 2 to diffuse megalencephaly, distinguished by different mutations and levels of mosaicism. These mutations are sufficient to cause cellular hypertrophy in cultured neurons.

Schick et al. (2007) addressed whether PI3K-pathway activation differentiates balloon cells from giant cells. They observed phosphorylated (p-)PDK1, p-Akt, p-tuberin, and p-p70-kDa S6-kinase (p-p70S6K; residue T229) in balloon cells, whereas giant cells showed only equivalent levels of p-tuberin, p-p70S6K and stress fibers. Furthermore, PI3K-cascade activity in balloon cells may reflect pathway “cross-talk”. An *in vitro* assay revealed S6, a major target of p70S6K, to increase phosphorylation of Akt. The data suggest recruitment of different PI3K-cascade factors in the molecular pathogenesis of giant cells in cortical tubers vs. balloon cells in FCDIIb. The same author, in 2015, observed aberrant expression of ezrin, radixin and moesin (ERM) proteins in FCDs and gangliogliomas that may relate to compromised interactions of dysplastic cellular components in epilepsy-associated glioneuronal lesions and be involved in aberrant PI3K-pathway signaling in epilepsy-associated malformations. However, the underlying cause of PI3K-pathway activation and the functional relationship of PI3K-pathway activity to generation of seizures in epilepsy-associated glioneuronal lesions will need to be determined in the future.

In relation to epileptogenesis, Jansen et al (2015) identify PI3K/AKT pathway mutations as an important cause of epileptogenic brain malformations and establish megalencephaly, hemimegalencephaly, and focal cortical dysplasia as part of a single pathogenic spectrum. Their results show that megalencephaly (MEG), HMEG and FCD comprise a complete series of overlapping phenotypes associated with upregulation of the PI3K/AKT/mTOR pathway. The authors accordingly propose that they be classified as a single malformation of cortical development with variable expressivity rather than as separate disorders.

6. Challenges and opportunities for research

FCD may include dysfunction of a subtle nature, for example, synaptic or dendrite development, abnormalities of systems connectivity, and pathophysiological components common to molecular mechanisms of neurodevelopment. Both genetic and environmental factors play in the genesis of MCDs (Spreafico, et al., 2012). A big challenge for researchers is to find answers to the many questions that remain regarding the neurological alterations. Even with high investments, the lack of predictive preclinical models that can be used to study the pathophysiology mechanisms, mechanisms study, identification of therapeutic targets and new drug testing, are scarce (Dolmetsch et al., 2011). Animal models are valuable for elucidating diseases and in directing the markers and genes related to certain diseases, however they have a weakened history when it comes to translate the therapeutic discovery

for human use (Dragunow, et al., 2008). Studies from the use of *post-mortem* tissue use can provide a great window of structural changes in the brain at cellular and molecular level.

The advent of the induced pluripotent stem cell (iPSC) method by Yamanaka and colleagues in 2006 (Takahashi & Yamanaka, 2006) redefined the field of translational research by providing access to patient-derived cells for clinical disease studies (Takahashi et al. 2007). The use of induced pluripotent cells (iPSC) differentiated into neurons offers the opportunity to study brain development in monolayers, since such cells are similar to embryonic stem cells, a feat that was nearly impossible during a subject's lifetime. iPSC-derived neurons are derived from patients and thus harbor the genetic variants that underlie human disease susceptibility (Dolmetsch et al., 2011). Since the advent of iPSC technology, CNS disorders have comprised a large portion of published disease models.

iPSCs are generated by the introduction and forced expression of specific transcription factors, the most common being the four original "Yamanaka" factors, Oct3/4, Klf4, Sox2, and c-Myc, into somatic cells, a process termed "reprogramming". Recently, Marinowic et al (2016) established the first cellular model of the world from the iPSCs technique from patients fibroblasts with FCD to study the embryonic development of epilepsy that does not respond to any medication and are caused by the disease. The proposal is to understand what happens in the formation of the brain that results in many changes and in the occurrence of epilepsy. This model enable the generation of unique results on embryonic neurogenesis and all processes involved during the cortical formation of individuals with FCD and relate the new findings to the pathophysiology of the disease.

Billions of neurons and glial cells constitute the human brain, elaborating and determining pattern of circuit in the adult individual. This complexity reflects in its development, which takes place through out most of embryonic and fetal development (Malik et al., 2013), and is composed of an intricate sequence of changes in the progenitor population with different proliferation potentials. The use of these two-dimensional (2D) methods, such as differentiation protocols of pluripotent stem cells in monolayers have led to the generation of a variety of neural cell types, but these kind of method are unlikely to recapitulate the cytoarchitecture of the developing three-dimensional (3D) nervous system or the complexity and functionality of in vivo neural circuits. The solution is the 3D approaches that are cultures containing mixed ectodermal derivatives, the so-called organoids (Mariani J, et al. 2012; Kadoshima, et al. 2013; Lancaster, et al. 2013). On a cellular level, organoids show a high level of similarity to the in vivo developing human brain in the early stages of development.

The faithful recapitulation of brain developmental processes is a relatively new event, and the field of developmental organoid research is currently booming (Fatehullah et al., 2016; Huch and Koo, 2015; Passier et al., 2016; Suzuki and Vanderhaeghen, 2015; Yin et al., 2016). An important advance that could bring great discoveries to FCD is generate pyramidal neurons from hiPSCs in a 3D cerebral cortex-like structure, generated from intact hiPSC colonies that were cultured and minimally patterned in exclusively nonadherent conditions and in the absence of extracellular scaffolding. This approach enables recapitulate many aspects of corticogenesis and display a level of self-organization beyond what is possible in 2D cultures.

iPSC and organoid models are ways among all tools needed to understand and treat diseases related to neurodevelopment. The use of models to advance treatments of human diseases needs to reach a systems-level understanding of disease pathophysiology, which need leveraging and integrating multiple levels of analysis (Geschwind and Konopka, 2009).

Regarding the selective inhibitors of PI3K and AKT, they are currently in clinical trials for treatment of cancer (Bellacosa et al., 2005; Engelman, 2009; Willems et al., 2012). Jansen et al (2015) discusses in his article that is tempting to hypothesize that these agents may be useful in the management of epilepsy and associated conditions in the segmental cortical dysplasia spectrum, similar to what has been suggested for the use of mTOR inhibitors in tuberous sclerosis (Krueger et al., 2013; Wiegand et al., 2013; Cardamone et al., 2014). An important step is to test these compounds in mouse and *in vitro* models of abnormal neuronal PI3K/AKT pathway activation evaluating the possible benefits of these compounds for treatment of children with dysplastic brain malformations (Jansen et al., 2015).

7. Conclusion

Focal cortical dysplasia (FCD) is one of the most frequent forms of malformations of cortical development, being the pathology underlying a significant portion of partial epilepsy refractory to drug treatment. FCD type II is considered one of the most common neuropathological findings in tissue resected therapeutically from patients with drug-resistant epilepsy. To review the pathogenesis of this disease is important due to the necessity to update the results found from the publications that have been growing over the years. From the 53 articles found in this review, most of the molecular and cellular findings are referents to FCD type IIB presenting 36 publications. With the advancement of techniques and greater access of molecular and cellular experiments by laboratories, it is believed that the trend is

increasing the number of publications contributing to the achievement of new discoveries, especially for FCD type IIA.

Findings from the pathogenesis, including cellular and molecular aspects, clinical presentations, diagnostic and epileptogenesis enhanced the quality of life for people with FCD. Further understanding involved in the coordination of the abnormal processes in FCD type II, like molecular and cellular pathways, development, differentiation, and loss of brain cells, using different approaches, such as iPSCs and organoids, can increase the knowledge of the neurodevelopment process of the disease.

Acknowledgement: The authors are grateful to CAPES-Brazil and the Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) for the scholarships for the first and second authors.

Competing interests: The authors have no conflict of interest to declare.

References

- Andre VM, Cepeda C, Vinters HV, Huynh M, Mathern GW, Levine MS. (2010) Interneurons, GABAA currents, and subunit composition of the GABAA receptor in type I and type II cortical dysplasia. *Epilepsia* 51(Suppl. 3):166–170.
- Arai N. Classification of epileptogenic cerebral malformations: guide to understand the present conditions. *Brain Nerve*. 2013 May;65(5):531-40.
- Aronica E, Boer K, Redeker S, Spliet WG, van Rijen PC, Troost D, Gorter JA. Differential expression patterns of chloride transporters, Na⁺-K⁺-2Cl⁻-cotransporter and K⁺-Cl⁻-cotransporter, in epilepsy-associated malformations of cortical development. *Neuroscience*. 2007 Mar 2;145(1):185-96. Epub 2007 Jan 3.
- Barba C, Montanaro D, Frijia F, Giordano F, Blümcke I, Genitori L, De Masi F, Guerrini R. Focal cortical dysplasia type IIb in the rolandic cortex: functional reorganization after early surgery documented by passive task functional MRI. *Epilepsia*. 2012 Aug;53(8):e141-5.
- Barkovich A.J., Guerrini R., Kuzniecky R.I., Jackson G.D., Dobyns W.B. (2012) A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012. *Brain*. 2012;135:1348–1369.
- Bast T, Ramantani G, Seitz A, Rating D. Focal cortical dysplasia: prevalence, clinical presentations and epilepsy in children and adults. *Acta Neurol Scand* 2006; 113: 72–81.
- Bernasconi N., Bernasconi A., Caramanos Z., Dubeau F., Richardson J., Andermann F., et al. (2001). Entorhinal cortex atrophy in epilepsy patients exhibiting normal hippocampal volumes. *Neurology* 56, 1335–1339 10.1212/WNL.56.10.1335

Bilgüvar K, Oztürk AK, Louvi A, et al. (2009) Whole-exome sequencing identifies recessive WDR62 mutations in severe brain malformations. *Nature* 2010;467:207-10.

Blümcke I, Vinters HV, Armstrong D, Aronica E, Thom M, Spreafico R. Malformations of cortical development and epilepsies: neuropathological findings with emphasis on focal cortical dysplasia. *Epileptic Disord.* 2009 Sep;11(3):181-93.

Blümcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Vinters HV, Palmini A, Jacques TS, Avanzini G, Barkovich AJ, Battaglia G, et al. (2011) The clinicopathologic spectrum of focal cortical dysplasias: a consensus classification proposed by an ad hoc Task Force of the ILAE Diagnostic Methods Commission. *Epilepsia.*2011;52:158–174.

Blumcke I, Aronica E, Urbach H, Alexopoulos A, Gonzalez-Martinez JA. (2014) A neuropathology-based approach to epilepsy surgery in brain tumors and proposal for a new terminology use for long-term epilepsy-associated brain tumors. *Acta Neuropathol.*2014;128:39–54.

Boer K, Lucassen PJ, Spliet WG, Vreugdenhil E, van Rijen PC, Troost D, Jansen FE, Aronica E. (2009) Doublecortin-like (DCL) expression in focal cortical dysplasia and cortical tubers. *Epilepsia.* 2009 Dec;50(12):2629-37. doi: 10.1111/j.1528-1167.2009.02191.x. Epub 2009 Jul 2.

Boer K, Troost D, Spliet WG, van Rijen PC, Gorter JA, Aronica E. (2008) Cellular distribution of vascular endothelial growth factor A (VEGFA) and B (VEGFB) and VEGF receptors 1 and 2 in focal cortical dysplasia type IIB. *Acta Neuropathol.* 2008 Jun;115(6):683-96. doi: 10.1007/s00401-008-0354-6. Epub 2008 Mar 4.

Boer K, Lucassen PJ, Spliet WG, Vreugdenhil E, van Rijen PC, Troost D, Jansen FE, Aronica E. Doublecortin like (DCL) expression in focal cortical dysplasia and cortical tubers. *Epilepsia.* 2009 Dec;50(12):2629-37.

Boer K, Middeldorp J, Spliet WG, Razavi F, van Rijen PC, Baayen JC, Hol EM, Aronica E. (2010) Immunohistochemical characterization of the out-of frame splice variants GFAPDelta164/Deltaexon 6 in focal lesions associated with chronic epilepsy. *Epilepsy Res.* 2010 Jun;90(1-2):99-109.

Boonyapisit K, Najm I, Klem G, Ying Z, Burrier C, LaPresto E, Nair D, Bingaman W, Prayson R, Luders H. (2003) Epileptogenicity of focal malformations due to abnormal cortical development: direct electrocorticographic-histopathologic correlations. *Epilepsia* 44:69–76.

Bronen, R. A., Fulbright, R. K., King, D., Kim, J. H., Spencer, S. S., Spencer, D. D., et al. (1997). Qualitative MR imaging of refractory temporal lobe epilepsy requiring surgery, correlation with pathology and seizure outcome after surgery. *Am. J. Roentgenol.* 169, 875–882. doi: 10.2214/ajr.169.3.9275915

Cepeda C., Hurst RS, Calver CR, et al. Transient and progressive electrophysiological alterations in the corticostriatal pathway in a mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci.* 2003; 23:961-969.

Cepeda, N.J., Pashler, H., Vul, E., Wixted, J.T., & Rohrer, D. (2006). Distributed practice in verbal recall tasks: A review and quantitative synthesis. *Psychological Bulletin*, 132, 354–380.

Cepeda C, Wu N, André VM, Cummings DM, Levine MS. The corticostriatal pathway in Huntington's disease. *Prog Neurobiol.*2007;81:253–271.

Cepeda C, Andre VM, Hauptman JS, Yamazaki I, Huynh MN, Chang JW, Chen JY, Fisher RS, Vinters HV, Levine MS, Mathern GW. (2012) Enhanced GABAergic network and receptor function in pediatric cortical dysplasia Type IIB compared with tuberous sclerosis complex. *Neurobiol Dis* 45:310–321.

Chamberlain WA, Cohen ML, Gyure KA, Kleinschmidt-DeMasters BK, Perry A, Powell SZ, Qian J, Staugaitis SM, Prayson RA. (2009) Interobserver and intraobserver reproducibility in focal cortical dysplasia(malformations of cortical development). *Epilepsia*. 2009 Dec;50(12):2593-8.

Chassoux F, Deveaux B, Landre E, et al. Stereoelectroencephalography in focal cortical dysplasia: a 3 D approach to delineate the dysplastic cortex. *Brain* 2000; 123: 1733–51.

Chen J, Tsai V, Parker WE, Aronica E, Baybis M, Crino PB. (2012) Detection of human papillomavirus in human focal cortical dysplasia type IIB. *Ann Neurol*. 2012 Dec;72(6):881-92.

Chen S, Piao Y, Fu Y, Li Z, Liu C, Lu D. (2015) Expression of autophagy-related proteins in malformations of cortical development]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 2015 May;44(5):305-9.

Colombo N, Tassi L, Deleo F, et al. Focal cortical dysplasia type IIa and IIb: MRI aspects in 118 cases proven by histopathology. *Neuroradiology* 2012; 54: 1065-77.

Coras R, de Boer OJ, Armstrong D, et al. Good interobserver and intraobserver agreement in the evaluation of the new ILAE classification of focal cortical dysplasias. *Epilepsia* 2012;53:1341–1348.

Cossu M, Fuschillo D, Bramerio M, Galli C, Gozzo F, Pelliccia V, Casaceli G, Tassi L, Lo Russo G. (2013) Epilepsy surgery of focal cortical dysplasia-associated tumors. *Epilepsia*.2013; 54 Suppl 9:115–122.

Dolmetsch, R.; Geschwind, D. H. (2011) The human brain in a dish: the promise of iPSC-derived neurons. *Cell*, v. 145, n. 6, p. 831-4, Jun 10 2011.

Dragunow, M. (2008) The adult human brain in preclinical drug development. *Nat Rev Drug Discov*, v. 7, n. 8, p. 659-66, Aug 2008.

Duchowny M. Clinical, functional, and neurophysiologic assessment of dysplastic cortical networks: Implications for cortical functioning and surgical management. *Epilepsia*. 2009 Oct; 50 Suppl 9:19-27.

Englot DJ, Berger MS, Barbaro NM, Chang EF. (2011) Predictors of seizure freedom after resection of supratentorial low-grade gliomas. A review. *J Neurosurg*. 2011;115:240–244.

Fassunke J, Blümcke I, Lahl R, Elger CE, Schramm J, Merkelbach-Bruse S, Mathiak M, Wiestler OD, Becker AJ. (2004) Analysis of chromosomal instability in focal cortical dysplasia of Taylor's balloon cell type. *Acta Neuropathol*. 2004 Aug;108(2):129-34.

Fatehullah, A., Tan, S. H., Barker, N., 2016. Organoids as an in vitro model of human development and disease. *Nat. Cell Biol*.18, 246–254.

Fauser S, Becker A, Schulze-Bonhage A, Hildebrandt M, Tuxhorn I, Pannek HW, Lahl R, Schramm J, Blümcke I. (2004) CD34-immunoreactive balloon cells in cortical malformations. *Acta Neuropathol*. 2004 Oct;108(4):272-8. Epub 2004 Jun 19.

Fauser S, Huppertz HJ, Bast T, et al. Clinical characteristics in focal cortical dysplasia: a retrospective evaluation in series of 120 patients. *Brain* 2006; 129: 1907–16.

Garbelli R, Frassoni C, Condorelli DF, Trovato Salinaro A, Musso N, Medici V, Tassi L, Bentivoglio M, Spreafico R. (2011) Expression of connexin 43 in the human epileptic and drug-resistant cerebral cortex. *Neurology*. 2011 Mar 8;76(10):895-902. Garganis K, Kokkinos V, Zountsas B. (2011) Limited resection of focal cortical dysplasia and associated epileptogenic cortex may lead to positive surgical outcome. *Epileptic Disord*. 2011 Dec;13(4):422-9.

German Reference Center for Epilepsy Surgery (www.epilepsie-register.de) and European Epilepsy Brain Bank (www.epicure-bank.org)

Geschwind, D.H. and Konopka, G. (2009) Neuroscience in the era of functional genomics and systems biology. *Nature* 461(7266):908-15.).

Giulioni M, Rubboli G, Marucci G, Martinoni M, Marliani AF, Bartiromo F, Calbucci F. (2013) Focal epilepsies associated with glioneuronal tumors: review article. *Panminerva Med.*2013;55:225–238.

Giulioni M, Marucci G, Martinoni M, Volpi L, Riguzzi P, Marliani AF, Bisulli F, Tinuper P, Tassinari CA, Michelucci R, et al. (2013) Seizure outcome in surgically treated drug-resistant mesial temporal lobe epilepsy based on the recent histopathological classifications. *J Neurosurg.* 2013; 119:37–47.

Grajkowska W, Kotulska K, Matyja E, Larysz-Brysz M, Mander M, Roszkowski M, Domańska-Pakieła D, Lewik-Kowalik J, Józwiak S. (2008) Expression of tuberin and hamartin in tuberous sclerosis complex-associated and sporadic cortical dysplasia of Taylor's balloon cell type. *Folia Neuropathol.* 2008;46(1):43-8.

Guo W, Zhang CQ, Shu HF, Yang MH, Yin Q, Yang H. (2013) Expression of bone morphogenetic protein-4 in the cortical lesions of focal cortical dysplasia IIb and the tuberous sclerosis complex. *J Mol Neurosci.* 2013 May;50(1):7-13. doi: 10.1007/s12031-012-9841-2. Epub 2012 Jul 3.

Harvey AS, Cross JH, Shinnar S, Mathern BW; ILAE Pediatric Epilepsy Surgery Survey Taskforce. Defining the spectrum of international practice in pediatric epilepsy surgery patients. *Epilepsia* 2008; 49: 146–55.).

He JJ, Li S, Shu HF, Yu SX, Liu SY, Yin Q, Yang H. (2013) The interleukin 17 system in cortical lesions in focal cortical dysplasias. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2013 Feb;72(2):152-63.

Hirtz D, Thurman D, Gwinn-Hardy K, et al. How common are the “common” neurologic disorders? *Neurology.* 2007; 68:326–337.

Huch, M., Koo, B.-K., 2015. Modeling mouse and human development using organoid cultures. *Development* 142, 3113–3125.

Iyer A, Zurolo E, Spliet WG, van Rijen PC, Baayen JC, Gorter JA, Aronica E. (2010) Evaluation of the innate and adaptive immunity in type I and type II focal cortical dysplasias. *Epilepsia.* 2010 Sep;51(9):1763-73.

Jansen, L. A. et al. (2015) PI3K/AKT pathway mutations cause a spectrum of brain malformations from megalencephaly to focal cortical dysplasia. *Brain*, v. 138, n. Pt 6, p. 1613-28, Jun 2015.

Kabat, J.; Krol, P. (2012) Focal cortical dysplasia - review. *Pol J Radiol*, v. 77, n. 2, p. 35-43, Apr 2012.

Kadoshima T, Sakaguchi H, Nakano T, Soen M, Ando S, Eiraku M, Sasai Y. Self-organization of axial polarity, inside-out layer pattern, and species-specific progenitor dynamics in human ES cell-derived neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:20284–20289.

Kim B, Chung CK, Myung JK, Park SH. (2009) Pleomorphic xanthoastrocytoma associated with long-standing Taylor-type IIB-focal cortical dysplasia in an adult. *Pathol Res Pract.* 2009; 205(2):113-7.

Kimura T, Kitaura H, Masuda H, Kameyama S, Saito Y, Sugai K, Otsuki T, Nakazawa A, Morota N, Yamamoto T, Iida K, Nakagawa M, Mizuno T, Takahashi H, Kakita A. (2015) Characteristic

expression of p57/Kip2 in balloon cells in focal cortical dysplasia. *Neuropathology*. 2015 Oct;35(5):401-9. doi: 10.1111/neup.12199. Epub 2015 May 7.

Krsek P., Maton B.B., Korman E. Different features of histopathological subtypes of pediatric focal cortical dysplasia. *Ann Neurol*. 2008; 63:758-769. 6

Lamparello P, Baybis M, Pollard J, Hol EM, Eisenstat DD, Aronica E, Crino PB. (2007) Developmental lineage of cell types in cortical dysplasia with balloon cells. *Brain*. 2007 Sep; 130(Pt 9): 2267-76.

Lancaster, M. A. et al. (2013) Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, v. 501, n. 7467, p. 373-9, Sep 19 2013

Lee JH, Huynh M, Silhavy JL, et al. (2012) De novo somatic mutations in components of the PI3K-AKT3-mTOR pathway cause hemimegalencephaly. *Nature Genet* 2012;44:941-5.

Lerner, R. M., & Steinberg, L. (2009). The scientific study of adolescent development: Past, present and future. In R. M. Lerner & L. Steinberg (Eds.), *Handbook of Adolescent Psychology: Vol. 1. Individual Bases of Adolescent Development* (pp. 3-14). New York: Wiley.

Leventer RJ, Scerri T, Marsh AP, Pope K, Gillies G, Maixner W, MacGregor D, Harvey AS, Delatycki MB, Amor DJ, Crino P, Bahlo M, Lockhart PJ. (2015) Hemispheric cortical dysplasia secondary to a mosaic somatic mutation in MTOR. *Neurology*. 2015 May 19;84(20):2029-32.

Li L, Liu CQ, Li TF, Guan YG, Zhou J, Qi XL, Yang YT, Deng JH, Xu ZQ, Luan GM. (2016) Analysis of Altered Micro RNA Expression Profiles in Focal Cortical Dysplasia IIB. *J Child Neurol*. 2016 Apr;31(5):613-20.

Li S, Yu S, Zhang C, Shu H, Liu S, An N, Yang M, Yin Q, Yang H. Increased expression of matrix metalloproteinase 9 in cortical lesions from patients with focalcortical dysplasia type IIB and tuberous sclerosis complex. *Brain Res*. 2012 May 9;1453:46-55.

Lortie A, Plouin P, Chiron C, Delalande O, Dulac O. Characteristics of epilepsy in focal cortical dysplasia in infancy. *Epilepsy Res* 2002; 51: 133-45.

Luan G, Gao Q, Zhai F, Zhou J, Liu C, Chen Y, Li T. (2015) Adenosine kinase expression in cortical dysplasia with balloon cells: analysis of developmental lineage of cell types. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2015 Feb;74(2):132-47.

Lugnier C, Majores M, Fassunke J, Pernhorst K, Niehusmann P, Simon M, Nellist M, Schoch S, Becker A. (2009) Hamartin variants that are frequent in focal dysplasias and cortical tubers have reduced tuberin binding and aberrant subcellular distribution in vitro. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2009 Oct; 68(10): 1136-46.

Majores M, Blumcke I, Urbach H, et al. Distinct allelic variants of TSC1 and TSC2 in epilepsy-associated cortical malformations without balloon cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; 64: 629-37.

Mariani J, Simonini MV, Palejev D, Tomasini L, Coppola G, Szekely AM, Horvath TL, Vaccarino FM. Modeling human cortical development in vitro using induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jul 31; 109 (31): 12770-5.

Malik, S., Vinukonda, G., Vose, L. R., Diamond, D., Bhimavarapu, B. B. R., Hu, F., Zia, M. T., Hevner, R., Zecevic, N., Ballabh, P., 2013. Neurogenesis continues in the third trimester of pregnancy and is not suppressed by premature birth. *J. Neurosci*. 33, 411-423.

Marinowic DR, Majolo F, Sebben AD, da Silva VD, Lopes TG, Paglioli E, Palmmini A, Machado DC, da Costa JC. Induced pluripotent stem cells from patients with focal cortical dysplasia and refractory epilepsy. *Mol Med Rep*. 2017 Apr;15(4):2049-2056. doi: 10.3892/mmr.2017.6264. Epub 2017 Mar 1.

Martinian L, Boer K, Middeldorp J, Hol EM, Sisodiya SM, Squier W, Aronica E, Thom M. (2009) Expression patterns of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-delta in epilepsy-associatedlesional pathologies. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2009 Aug;35(4):394-405.

Marucci, R.C.; Cavichioli, R.R.; Zucchi, R.A. Espécies de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellinae) em pomares de citros da região de Bebedouro, SP, com descrição de uma nova espécie de *Acrogonia* Stål. *Revista Brasileira de Entomologia*, v.46, p.149-164, 2002.

Marucci G, Martinoni M, Giulioni M. (2013) Relationship between focal cortical dysplasia and epilepsy-associated low-grade tumors: an immunohistochemical study. *APMIS*. 2013; 121:22–29.

Mathern G, Cepeda C, Hurst R, Flores-Hernandez J, Mendoza D, Levine M. (2000) Neurons recorded from pediatric epilepsy surgery patients with cortical dysplasia. *Epilepsia* 41(suppl 6): S162–S167.

Medici V, Frassoni C, Tassi L, Spreafico R, Garbelli R. (2011) Aquaporin 4 expression in control and epileptic human cerebral cortex. *Brain Res*. 2011 Jan 7; 1367: 330-9.

Miles L, Greiner HM, Miles MV, Mangano FT, Horn PS, Leach JL, Seo JH, Lee KH. (2013) Interaction between akt1-positive neurons and age at surgery is associated with surgical outcome in children with isolated focal cortical dysplasia. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2013 Sep; 72(9): 884-91.

Miller D, Knake S, Menzler K, Krakow K, Rosenow F, Sure U. (2011) Intraoperative ultrasound in malformations of cortical development. *Ultraschall Med*. 2011 Dec; 32 Suppl 2: E69-74.

Mirzaa GM, Campbell CD, Solovieff N, Goold CP, Jansen LA, Menon S, Timms AE, Conti V, Biag JD, Olds C, Boyle EA, Collins S, Ishak G, Poliachik SL, Girisha KM, Yeung KS, Chung BH, Rahikkala E, Gunter SA, McDaniel SS, Macmurdo CF, Bernstein JA, Martin B, Leary RJ, Mahan S, Liu S, Weaver M, Dorschner MO, Jhangiani S, Muzny DM, Boerwinkle E, Gibbs RA, Lupski JR, Shendure J, Saneto RP, Novotny EJ, Wilson CJ, Sellers WR, Morrissey MP, Hevner RF, Ojemann JG, Guerrini R, Murphy LO, Winckler W, Dobyns WB. (2016) Association of MTOR Mutations With Developmental Brain Disorders, Including Megalencephaly, Focal Cortical Dysplasia, and Pigmentary Mosaicism. *JAMA Neurol*. 2016 Jul 1; 73(7):836-45.

Mischel, P.S., Nguyen, L. P. & Vinters, H. V. (1995). Cerebral cortical dysplasia associated with pediatric epilepsy. Review of neuropathologic features and proposal for a grading system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. 54, 137-153.

Nakashima M, Saitsu H, Takei N, Tohyama J, Kato M, Kitaura H, Shiina M, Shirozu H, Masuda H, Watanabe K, Ohba C, Tsurusaki Y, Miyake N, Zheng Y, Sato T, Takebayashi H, Ogata K, Kameyama S, Kakita A, Matsumoto N. (2015) Somatic Mutations in the MTOR gene cause focal cortical dysplasia type IIb. *Ann Neurol*. 2015 Sep;78 (3): 375-86.

Ni HC1, Sun FH, Piao YS, Ma XL, Lu DH. Noebels J. Pathway-driven discovery of epilepsy genes. *Nature neuroscience*. 2015; 18:344–350.

Olafsson E, Ludvigsson P, Hesdorffer D, et al. Incidence of unprovoked seizures and epilepsy in Iceland and assessment of the epilepsy syndrome classification: a prospective study. *The Lancet Neurology*. 2005; 4:627–634.

Palmmini, A. et al. (2004) Terminology and classification of the cortical dysplasias. *Neurology*, v. 62, n. 6 Suppl 3, p. S2-8, Mar 23 2004.

Pasquier B, Peoc HM, Fabre-Bocquentin B, Bensaadi L, Pasquie D, Hoffmann D et al. (2002) Surgical pathology of drug-resistant partial epilepsy. A 10-year-experience with a series of 327 consecutive resections. *Epileptic Disorder* 4:99-119.

Passier, R., Orlova, V., Mummery, C., 2016. Complex tissue and disease modeling using hiPSCs. *Cell Stem Cell* 18, 309–321.

Prabowo AS, Iyer AM, Anink JJ, Spliet WG, van Rijen PC, Aronica E. (2013) Differential expression of major histocompatibility complex class I in developmental glioneuronal lesions. *Neuroinflammation*. 2013 Jan 24; 10:12.

Prayson RA, Estes ML, Morris HH. (1993) Coexistence of neoplasia and cortical dysplasia in patients presenting with seizures. *Epilepsia* 34:609–615.

Rosenow F, Luders HO, Dinner DS, Prayson RA, Mascha E, Wolgamuth BR, et al. Histopathological correlates of epileptogenicity as expressed by electrocorticographic spiking and seizure frequency. *Epilepsia* 1998, 39: 850-6.

Sakakibara T, Sukigara S, Saito T, Otsuki T, Takahashi A, Kaneko Y, Kaido T, Saito Y, Sato N, Kimura Y, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Goto Y, Itoh M. (2012) Delayed maturation and differentiation of neurons in focal cortical dysplasia with the transmantle sign: analysis of layer-specific marker expression. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2012 Aug;71(8):741-9.

Sarnat HB, Flores-Sarnat L. Telencephalic Flexure and Malformations of the Lateral Cerebral (Sylvian) Fissure. *Pediatr Neurol*. 2016 Oct; 63:23-38.

Morphogenesis timing of genetically programmed brain malformations in relation to epilepsy. *Prog Brain Res*. 2014; 213:181-98.

Scerri T, Riseley JR, Gillies G, Pope K, Burgess R, Mandelstam SA, Dibbens L, Chow CW, Maixner W, Harvey AS, Jackson GD, Amor DJ, Delatycki MB, Crino PB, Berkovic SF, Scheffer IE, Bahlo M, Lockhart PJ, Leventer RJ. (2015) Familial cortical dysplasia type IIA caused by a germline mutation in *DEPDC5*. *Ann Clin Transl Neurol*. 2015 May; 2 (5):575-80.

Schick V, Majores M, Koch A, Elger CE, Schramm J, Urbach H, Becker AJ. (2007) Alterations of phosphatidylinositol 3-kinase pathway components in epilepsy-associated glioneuronal lesions. *Epilepsia*. 2007;48 Suppl 5:65-73. Review. Erratum in: *Epilepsia*. 2007 Dec; 48(12):2379.

Shoffner JM, Lott MT, Lezza AM, et al. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA Lys mutation. *Cell*. 1990; 61:931–937.

Shu HF, Zhang CQ, Yin Q, An N, Liu SY, Yang H. (2010) Expression of the interleukin 6 system in cortical lesions from patients with tuberous sclerosis complex and focal cortical dysplasia type IIb. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010 Aug;69(8):838-49.

Shu HF, Yu SX, Zhang CQ, Liu SY, Wu KF, Zang ZL, Yang H, Zhou SW, Yin Q. (2013) Expression of TRPV1 in cortical lesions from patients with tuberous sclerosis complex and focal cortical dysplasia type IIb. *Brain Dev*. 2013 Mar;35(3):252-60.

Sisodiya SM, Martinian L, Scheffer GL, van der Valk P, Scheper RJ, Harding BN, Thom M. (2006) Vascular colocalization of P-glycoprotein, multidrug-resistance associated protein 1, breast cancer resistance protein and major vault protein in human epileptogenic pathologies. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2006 Feb; 32(1):51-63.

- Spreafico R, Blumcke I. (2010) Focal Cortical Dysplasias: clinical implication of neuropathological classification systems. *Acta Neuropathol.* 2010; 120:359–367.
- Spreafico R and Tassi L. (2012) Cortical malformations. In: H Stefan, W H Theodore Eds. *Handbook of clinical neurology vol 108(3rd series): Epilepsy part.* Amsterdam: Elsevier, 2012; 536-557.
- Srikandarajah N, Martinian L, Sisodiya SM, Squier W, Blumcke I, Aronica E, Thom M. (2009) Doublecortin expression in focal cortical dysplasia in epilepsy. *Epilepsia.* 2009 Dec; 50(12): 2619-28.
- Sukigara S, Dai H, Nabatame S, Otsuki T, Hanai S, Honda R, Saito T, Nakagawa E, Kaido T, Sato N, Kaneko Y, Takahashi A, Sugai K, Saito Y, Sasaki M, Goto Y, Koizumi S, Itoh M. (2014) Expression of astrocyte-related receptors in cortical dysplasia with intractable epilepsy. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2014 Aug;73(8): 798-806.
- Sun FJ, Zhang CQ, Chen X, Wei YJ, Li S, Liu SY, Zang ZL, He JJ, Guo W, Yang H. (2016) Downregulation of CD47 and CD200 in patients with focal cortical dysplasia type IIb and tuberous sclerosis complex. *J Neuroinflammation.* 2016 Apr 19;13(1):85.
- Suzuki, I.K., Vanderhaeghen, P., 2015. Is this a brain which I see before me? Modeling human neural development with pluripotent stem cells. *Development* 142,3138–3150.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006; 126(4): 663–76.
- Takahashi K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007; 131(5): 861–72.
- Talos DM, Sun H, Kosaras B, Joseph A, Folkner RD, Poduri A, Madsen JR, Black PM, Jensen FE. (2012) Altered inhibition in tuberous sclerosis and type IIb cortical dysplasia. *Ann Neurol.* 2012 Apr;71(4):539-51.
- Tassi L, Colombo N, Garbelli R, Francione S, Lo Russo G, Mai R, Cardinale F, Cossu M, Ferrario A, Galli C, et al. (2002) Focal cortical dysplasia: neuropathological subtypes, EEG, neuroimaging and surgical outcome. *Brain.* 2002; 125:1719–1732.
- Tassi L, Colombo N, Garbelli R, et al. Focal cortical dysplasia: neuropathological subtypes, EEG, neuroimaging and surgical outcome. *Brain* 2002; 125: 1719–32.
- Tarsi A, Marliani AF, Bartiromo F, Giulioni M, Marucci G, Martinoni M, Volpi L, Leonardi M. (2012) MRI findings in low grade tumours associated with focal cortical dysplasia. *Neuroradiol J.* 2012;25:639–648.
- TAYLOR, D. C. et al. (1971) Focal dysplasia of the cerebral cortex in epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, v. 34, n. 4, p. 369-87, Aug 1971.
- THOM, M. et al. (2005) Cortical neuronal densities and lamination in focal cortical dysplasia. *Acta Neuropathol*, v. 110, n. 4, p. 383-92, Oct 2005.
- Thom M, Martinian L, Sen A, Squier W, Harding BN, Cross JH, Harkness W, McEvoy A, Sisodiya SM. (2007) An investigation of the expression of G1-phase cell cycle proteins in focal cortical dysplasia type IIB. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2007 Nov;66(11):1045-55.
- Thom M, Martinian L, Caboclo LO, McEvoy AW, Sisodiya SM. (2008) Balloon cells associated with granule cell dispersion in the dentate gyrus in hippocampal sclerosis. *Acta Neuropathol.* 2008 Jun;115(6):697-700.

Thurman DJ, Hesdorffer DC, French JA. Sudden unexpected death in epilepsy: assessing the public health burden. *Epilepsia*. 2014; 55:1479–1485.

Toering ST, Boer K, de Groot M, Troost D, Heimans JJ, Spliet WG, van Rijen PC, Jansen FE, Gorter JA, Reijneveld JC, Aronica E. (2009) Expression patterns of synaptic vesicle protein 2A in focal cortical dysplasia and TSC-cortical tubers. *Epilepsia*. 2009 Jun;50(6):1409-18.

Urbach, H. et al. (2002) Focal cortical dysplasia of Taylor's balloon cell type: a clinicopathological entity with characteristic neuroimaging and histopathological features, and favorable postsurgical outcome. *Epilepsia*, v. 43, n. 1, p. 33-40, Jan 2002.

Urbach H et al. (2008) MRI of long-term epilepsy-associated tumors. *Semin Ultrasound CT MRI*.; 29; 40-60.

Widdess-Walsh P, Kellinghaus C, Jeha L, et al. Electro-clinical and imaging characteristics of focal cortical dysplasia: correlation with pathological subtypes. *Epilepsy Res* 2005; 67: 25–33.

Yin, X., Mead, B. E., Safaee, H., Langer, R., Karp, J. M., Levy, O., 2016. Engineering Stem Cell Organoids. *Cell Stem Cell* 18, 25–38.

Ying Z, Najm I, Nemes A, Pinheiro-Martins AP, Alexopoulos A, Gonzalez-Martinez J, Bingaman W. (2014) Growth-associated protein 43 and progressive epilepsy in cortical dysplasia. *Ann Clin Transl Neurol*. 2014 Jul;1(7):453-61.

Yu SX, Li S, Shu HF, Zhang CQ, Liu SY, Yang H. (2012) Expression of the Nogo-A system in cortical lesions of pediatric patients with tuberous sclerosis complex and focal cortical dysplasia type IIb. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2012 Jul;71(7):665-77.

Yu S, Li S, Shu H, Zhang C, He J, Fan X, Yang H. (2012) Upregulated expression of voltage-gated sodium channel Nav1.3 in cortical lesions of patients with focal cortical dysplasia type IIb. *Neuroreport*. 2012 May 9;23(7):407-11.

Zamecnik J, Krsek P, Druga R, Marusic P, Benes V, Tichy M, Komarek V. (2006) Densities of parvalbumin-immunoreactive neurons in non malformed hippocampal sclerosis-temporal neocortex and in cortical dysplasias. *Brain Res Bull*. 2006 Feb 15;68(6):474-81.

Zang Z, Li S, Zhang W, Chen X, Zheng D, Shu H, Guo W, Zhao B, Shen K, Wei Y, Zheng X, Liu S, Yang H. (2015) Expression Patterns of TRPC1 in Cortical Lesions from Patients with Focal Cortical Dysplasia. *J Mol Neurosci*. 2015 Oct;57(2):265-72.

Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi. (2012) Expression of PI3K pathway proteins in refractory epilepsy associated with cortical malformation development Jun;41(6):391-5.

ANEXO 6
COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

11/12/2017

Email – fernandamajolo@hotmail.com

Successfully received: submission Taylor-type focal cortical dysplasia: An update review on cellular and molecular aspects and current developments for Epilepsy & Behavior

Epilepsy & Behavior <Evisesupport@elsevier.com>

seg 11/12/2017 22:57

Para:fernandamajolo@hotmail.com <fernandamajolo@hotmail.com>;

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: EB_2017_837

Title: Taylor-type focal cortical dysplasia: An update review on cellular and molecular aspects and current developments

Journal: Epilepsy & Behavior

Dear Miss. Majolo,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Epilepsy & Behavior. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=EB and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Epilepsy & Behavior

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2017 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.