



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

RAFAEL RODRIGUES DE SOUZA

**Expressão da sintase neuronal do óxido nítrico na displasia cortical focal
tipo Taylor.**

UBERABA – MG

2015

RAFAEL RODRIGUES DE SOUZA

Expressão da sintase neuronal do óxido nítrico na displasia cortical focal tipo Taylor.

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas. Área de concentração I: Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Roberto Martins.

UBERABA– MG

2015

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

S718e Souza, Rafael Rodrigues de
Expressão da sintase neuronal do óxido nítrico na displasia cortical focal
tipo Taylor / Rafael Rodrigues de Souza. -- 2016.
54 f. : il., fig., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) -- Universidade
Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2016
Orientador: Prof. Dr. Antonio Roberto Martins

1. Epilepsia. 2. Malformações do desenvolvimento cortical. 3. Óxido nítrico sintase. 4. Neurónios. I. Martins, Antonio Roberto. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.853

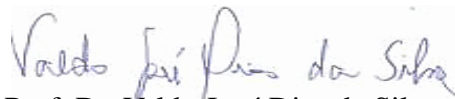
RAFAEL RODRIGUES DE SOUZA

EXPRESSÃO DA SINTASE NEURONAL DO ÓXIDO NÍTRICO NA DISPLASIA
CORTICAL FOCAL TIPO TAYLOR

Esta dissertação foi submetida ao processo de avaliação da Banca Examinadora para obtenção do título de:

MESTRE EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

e aprovada em sua versão final em 29 de outubro de 2015, atendendo às normas da legislação vigente da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Área de concentração I: Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia.



Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva
Coordenador do CPGCF/UFTM

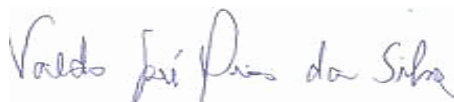
BANCA EXAMINADORA



Dr. Antônio Roberto Martins
Orientador
Universidade Federal do Triângulo Mineiro



Dr. João Pereira Leite
Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto



Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos,

Primeiramente a Deus, que todos os dias da minha vida me deu força para nunca desistir.

Aos meus pais José Wilson e Elza Helena, e aos meus irmãos Rogério e Rodrigo, pelo amor e pelo incentivo sempre.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, pela oportunidade oferecida para realização do mestrado.

A Prof. Dr. Dulcineia Gonçalves Teixeira (*in memoriam*) que me mostrou os primeiros passos da pesquisa científica.

Ao Prof. Dr. Antonio Roberto Martins, pelo apoio, orientação e ensinamentos.

A Dr. Thaís Caroline Dombroski, pela paciência e ensinamentos no início do mestrado.

A Mestre Gleice Kelly de Sousa, pela amizade sincera, pela confiança, pela disposição e pela ajuda de sempre. Tornamo-nos verdadeiros amigos.

Aos meus colegas de mestrado, Eduardo, Sarah, Daniel, Livia, Carol e Lidiane, pelo convívio divertido, pela amizade e companheirismo durante essa caminhada.

A secretária do programa Bete, inestimável amizade, pela disponibilidade de sempre, simpatia e gentileza. Obrigado pela ajuda!

Aos técnicos do laboratório, pelo apoio e disponibilidade em contribuir sempre.

Agradeço também a CAPES pelo apoio financeiro concedido.

A todos os professores do mestrado que de alguma forma contribuíram para minha formação.

Finalmente agradeço todas as pessoas que de algum modo, sempre estiveram presentes em todos os momentos desta jornada.

RESUMO

Expressão da sintase neuronal do óxido nítrico na displasia cortical focal tipo Taylor.

Displasias corticais focais (FCDs) são caracterizadas por uma desorganização focal da estrutura normal do córtex cerebral, as quais são malformações causadas por anormalidades no desenvolvimento cortical (MCDs). FCD IIB ou displasia cortical focal tipo Taylor, estudada nesse trabalho, se caracteriza pela desorganização das camadas corticais e pela presença de *Balloon cells* (BCs) e neurônios dismórficos (DNs). Tais anormalidades são encontradas em pacientes com epilepsia resistentes ao tratamento medicamentoso, resultando no aumento do número de pacientes candidatos ao tratamento cirúrgico. A epileptogenicidade nas FCDs tem sido descrita como um desequilíbrio entre o balanço excitação-inibição. As propriedades do óxido nítrico (NO) tornam-no um candidato em potencial para participar do balanço excitação-inibição. O NO é um gás difusível, radical livre hidrofóbico que pode permear membranas celulares. A avaliação de cada paciente incluiu história clínica detalhada e exames neurológicos, tais como: eletroencefalograma (EEG) interictal/ictal, monitoramento interictal/ictal por vídeo-EEG, extensa bateria de testes neuropsicológicos e registros corticais intra-operatórios. Os córtices provenientes do processo cirúrgico foram estudados usando rotinas de coloração (H&E, cresil de violeta e impregnação por prata pelo método de Bielschowsky). A expressão de óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), marcador de neurofilamento pan-neuronal (SMI311), proteína acídica fibrilar glial (GFAP), foi detectada utilizando anticorpos específicos através de técnicas de imunohistoquímica. Foram estudados 23 pacientes com FCD IIB. As lesões epileptogênicas nos pacientes FCD foram amplamente distribuídas nas diversas regiões corticais. Displasia cortical, BCs e DNs foram encontrados em todos os 23 pacientes estudados. Neurônios hipertróficos (HNs), DNs, e BCs expressaram nNOS com intensidade variável. Célula bipolar, multipolar e inter neurônios sem nome específico foram observados com imunomarcção positiva para nNOS. Longos processos varicosos foram observados em todos os casos de FCD IIB. Em alguns casos com intensidade variada, a expressão de nNOS em núcleos ocorreu aparentemente na maioria dos tipos neuronais. A marcação de ambos, citoplasma e núcleos, em balloon cells foi variável. A expressão de nNOS em diferentes tipos de células e estruturas celulares do neocórtex com displasia cortical focal IIB, representa uma primeira abordagem para a identificação de uma base celular para compreender o envolvimento de nNOS na patogênese das crises epiléticas nesta doença.

Palavras-chave: Displasia cortical focal tipo IIB, óxido nítrico sintase neuronal, neurônios dismórficos, *balloon cells*, epilepsia.

ABSTRACT

Expression of neuronal nitric oxide synthase in Taylor's dysplasia.

Focal cortical dysplasias (FCDs) are characterized by a focal disorganization of the normal structure of the cerebral cortex, which has been ascribed to malformations of cortical development (MCD). Focal cortical dysplasia type IIb or Taylor type, studied here, is characterized by the loss of cortical organization, dysmorphic neurons (DNs) and balloon cells (BCs). Patients with the disturbance presented drug-resistant epilepsy that underwent surgical resection of the epileptogenic region for the treatment of epilepsy. Epileptogenicity in FCD has usually been ascribed to a disturbance(s) of the excitation-inhibition balance. The properties of nitric oxide (NO) make it a putative candidate to participate in excitation-inhibition balance. NO is a hydrophobic, freely diffusible radical gas that can permeate cell membranes. Patients evaluation included a detailed history and neurologic examination, interictal-ictal scalp EEG, interictal/ictal video-EEG monitoring, an extensive neuropsychological test battery and intra-operative cortical recording. The resected cortices were studied using routine stains (H&E, cresyl violet and silver impregnation by the Bielschowsky method. Neuronal NOS (nNOS), pan-neuronal neurofilament marker (SMI311) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) expressions were detected using specific antibodies in immunohistochemistry. We studied 23 patients presenting FCD IIb. The epileptogenic lesions in FCD patients were widely distributed over diverse cortical regions. Cortical dysplasia, BCs and DNs were found in all twenty-three patients. Hypertrophic, and dysmorphic neurons, and balloon cells expressed nNOS with variable intensity. Bipolar, multipolar or unnamed interneurons were found to stain for nNOS. Long varicose processes were observed in all FCD IIb cases. In some cases there was a variable intensity, nuclear expression of nNOS, apparently in most neuron types. Staining of both cytoplasm and nucleus of BCs was variable. The expression nNOS in different cell types and cellular structures of neocortex were detected in patient with focal cortical dysplasia IIb.

Keywords: Focal cortical dysplasia type IIb, neuronal nitric oxide synthase, dysmorphic neurons, balloon cells, epilepsy.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Estrutura e o mecanismo funcional da nNOS.....	17
FIGURA 2: Mecanismo molecular da LTP.....	20
FIGURA 3: Diagnóstico da displasia cortical focal tipo IIb.....	28
FIGURA 4: Expressão de nNOS no córtex de pacientes diagnosticados com displasia cortical focal tipo Taylor.....	30
FIGURA 5: Expressão de NOS neuronal em todos os tipos celulares característicos de FCD IIb	31
FIGURA 6: Expressão de nNOS em diferentes tipos de interneurônios.....	33
FIGURA 7: Processos varicosos foram detectados através do neocórtex e da substância branca de pacientes com FCD IIb	34
FIGURA 8: Expressão de nNOS em núcleos celulares no neocórtex FCD IIb.....	35

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1: Caracterização dos casos FCD IIb.....	25
TABELA 2: Anticorpos usados nos ensaios de imunohistoquímica.....	26

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BH4 – 6R- 5,6,7,8 Tetrahydro – L – bipterina

BCs – Balloon Cells

cGMP – Monofosfato cíclico de guanosina

CAPON – Carboxi-Terminal PDZ ligante de nNOS

DNs – Neurônios Dismórficos

EDRF – Fator de relaxamento derivado do endotélio

EEG – Eletroencefalograma

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial

FAD – Flavina adenina dinucleotídeo

FCD – Displasia cortical focal

FMN – Flavina mononucleotídeo

GFAP – Proteína acídica fibrilar glial

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível

LPS - Lipopolissacarídeo

LTP – Potenciação de longo prazo

MCD – Anormalidades no desenvolvimento cortical

MRI – Ressonância magnética de alta resolução

NADPH – Nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato

NMDA – N metil – D- aspartato

nNOS - Óxido nítrico sintase neuronal

NO – Óxido nítrico

NOS – Óxido nítrico sintase

PIN – Proteína inibitória de nNOS

PSD95 – Proteína de densidade pós-sináptica

RMS – Fluxo migratório rostral

SNC – Sistema nervoso central

SNP – Sistema nervoso periférico

sCG – Guanilil ciclase solúvel

SPECT – Tomografia computadorizada ictal/inter ictal por emissão de um único fóton

SVZ – Zona subventricular

VZ – Zona Ventricular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1	Materiais	23
3.2	Pacientes.	23
3.3	Processamento dos tecidos e imunohistoquímica	24
3.4	Obtenção das imagens	24
4	RESULTADOS	27
4.1	Achados clínicos	27
4.2	Diagnóstico histopatológico	27
4.3	Expressão do óxido nítrico sintase neuronal em displasia cortical focal tipo Taylor	29
5	DISCUSSÃO	36
5.1	Características diagnósticas de neurônios dismórficos, hipertróficos e <i>balloon cells</i>	36
5.2	Expressão de nNOS no neocortex de pacientes com FCD IIb que sofreram ressecção cirúrgica para tratamento da epilepsia	37
6	REFERÊNCIAS	40

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do córtex cerebral ocorre através de um programa coordenado de eventos celulares, incluindo divisão celular, migração, diferenciação e morte celular programada (Hannan et al, 1999). O modelo da unidade radial descrito por Rakic, 1988, fornece uma ferramenta para a compreensão do desenvolvimento cortical. A regulação epigenética das áreas citoarquitetônicas é uma entrada para o entendimento de certas desordens corticais em humanos. O neocórtex adulto é constituído de neurônios e células gliais.

Os neuroblastos são gerados a partir de uma população de células tronco neurais que estão presentes antes da neurogênese na zona ventricular (VZ). Essas células dividem – se simetricamente gerando mais células, algumas se diferenciam em glia radial, uma célula com o processo apical dirigido radialmente a superfície pial. Essa célula tem como função orientar a migração do neuroblasto até seu destino final que é determinado pelo seu programa genético (Rakic, 2007). O neuroblasto também pode ser gerado por precursores neurais presentes na VZ e Subventricular (SVZ), que constituem a matriz germinativa. As células progenitoras neurais podem, por divisão assimétrica gerar neuroblasto e glia radial. As células resultantes da divisão assimétrica da glia radial podem ser neurônios que irão formar o córtex cerebral ou progenitores neuronais com processos curtos que habitam as VZ e SVZ e produzirão todos os neurônios de projeção e interneurônios.

A glia radial estende seu cabo da superfície ventricular até a superfície pial pelo qual o neuroblasto pós-mitótico migra intimamente ligado a fibras da glia radial, passando da zona intermediária até a placa cortical, onde o neuroblasto termina sua migração em uma das seis camadas que formam o neocórtex e se diferencia em algum tipo de neurônio específico daquela camada (Rakic, 1995; 2007).

Além da migração radial, outra forma de migração tem sido descrita durante o desenvolvimento neural, denominada migração tangencial, que é caracterizada por deslocamento neuronal paralelamente à superfície pial e perpendicularmente às fibras da glia radial. Este tipo de migração é comum no bulbo olfativo. Os neuroblastos, por sua vez, migram através de uma via denominada fluxo migratório rostral (RMS), em cadeia através de túneis gliais e se diferenciam em neurônios no bulbo olfativo. A segunda região onde

existe neurogênese no cérebro adulto é no hipocampo, onde os neuroblastos gerados migram a curtas distâncias e se integram ao giro denteado (Lois et al., 1996).

A migração neuronal é uma etapa do desenvolvimento do SNC antecipada por um período onde ocorre intensa proliferação neuronal e um período posterior de crescimento de axônios e dendritos. Os neurônios gerados ao fim do desenvolvimento cortical passam por outros que foram gerados antecipadamente, o que possibilita a comunicação entre os neurônios formados nos estágios anteriores estabelecendo conexões sinápticas definidas. Assim a formação cortical é estabelecida por neurônios que são gerados no início do desenvolvimento, constituindo as primeiras camadas corticais e os gerados tardiamente, que formam as camadas superficiais. O córtex ao fim do desenvolvimento é formado por seis camadas corticais com neurônios específicos, que estabelecem conexões sinápticas (Rakic, 1988, 1990).

Alterações durante a formação cortical levam a malformações causadas por anormalidades no desenvolvimento cortical, conhecidas como displasias corticais, estão relacionadas a desordens na migração neuronal, proliferação e diferenciação. Tais anormalidades são encontradas em pacientes com epilepsia resistentes ao tratamento medicamentoso, resultando no aumento do número de pacientes candidatos ao tratamento cirúrgico (Kuzniecky et al., 1991). Malformações do neocórtex humano estão presentes em > 1% da população em geral e em 20 – 40% das epilepsias intratáveis (Hardiman et al., 1988; Farrell et al., 1992).

Durante o desenvolvimento cortical a sequência ordenada e espacial de eventos é necessária para migração neuronal e formação cortical. Ambos os mecanismos genéticos e ambientais estão envolvidos na corticogênese (Bentivoglio et al., 2003). Proliferação celular, migração, diferenciação, maturação, bem como morte celular programada representam eventos fundamentais envolvidos no desenvolvimento normal do córtex cerebral. Distúrbios nesses processos podem levar a alterações severas, causando malformações e interrupção da estrutura cortical. É sugerido que pelo menos três principais mecanismos estejam envolvidos nas MCDs: anormalidades na diferenciação e proliferação neuronal e glial; anormalidades na migração de neuroblastos (neurônios imaturos) e anormalidades na organização cortical (Palmini 2000). Estas malformações caracterizam-se por alterações na organização do córtex cerebral e são acompanhadas por anormalidades na arquitetura e citoarquitetura cortical; as células anormais são principalmente neurônios dismórficos (NDs), citomegálicos e *balloon cells* (BCs) (Palmini et al., 2004).

A displasia cortical focal (FCD) foi identificada primeiramente como uma entidade neuropatológica em 1971 por Taylor e colaboradores após relatarem anormalidade na laminação cortical e morfologia celular anormal em tecidos cerebrais a partir de ressecções terapêuticas (Taylor et al., 1971). Técnicas de alta resolução de imagem, particularmente por ressonância magnética possibilitam o diagnóstico das displasias corticais focais (FCDs) *in vivo* e fornecem correlações entre imagens e resultados eletroclínicos desses pacientes que apresentam malformações e crises epiléticas (Palmini et al., 1994).

Ao longo dos anos, diferentes sistemas de classificação para FCDs foram propostos. Barkovitch e colaboradores (1996) propuseram um esquema de classificação baseado em aspectos embriológicos, anatômicos e histopatológicos. Anos após, Palmini e colaboradores (2004) dividiram as FCDs em dois tipos principais: as FCDs tipo I, caracterizadas pela perda do padrão laminar do córtex, sem a presença de células anormais, ou seja, de NDs ou BCS, células muito grandes, com citoplasma intensamente eosinofílico, e as FCDs tipo II, caracterizadas pela presença destas células anormais, NDs ou BCs, que se associam também à perda da laminação cortical. De forma mais detalhada, as FCDs tipo II subdividem-se em dois subtipos: no subtipo IIA as células anormais são NDs, enquanto no subtipo IIB, além destes NDs encontra-se também BCs. (Palmini et al., 2004).

FCD do tipo II é uma das displasias mais encontradas em tecidos cirúrgicos de pacientes com epilepsia refratária ao tratamento medicamentoso, ocorrendo em cerca de 20 – 25% dos pacientes que apresentam crises epiléticas (Fauser et al., 2006; Tassi et al., 2002). Os dados sugerem que os indivíduos com FCD tipo II apresentam início das crises com idade mais jovem e maior frequência de crises quando comparadas aos pacientes diagnosticados com FCD do Tipo I (Palmini et al., 2004; Fauser et al., 2006).

Em 2011, Blumcke e colaboradores, após análises de diversos trabalhos publicados na literatura propuseram um novo sistema de classificação para as FCDs. A maior alteração proposta por esse grupo, quando comparada com a classificação proposta por Palmini em 2004, foi a adição de um novo tipo de displasia cortical, denominada Tipo III, que ocorre em combinação com outra patologia.

De acordo com a nova classificação a FCD tipo I é uma malformação das camadas corticais com comprometimento da migração radial (neurônios alinhados em uma direção vertical) e maturação de neurônios (FCD tipo IA) ou na migração tangencial do neocórtex (FCD tipo IB). A combinação de ambas as variantes é classificada como

FCD Tipo IC. Na FCD tipo IIA ocorre perda da organização cortical e presença de NDs que apresentam núcleo e corpo celular aumentado, substância de Nissl distribuída anormalmente e acúmulo de proteínas de neurofilamentos. Não existe presença de BCs e isto pode ser confirmado por imunohistoquímica. A discriminação das camadas corticais é quase sempre impossível com exceção da primeira camada; NDs podem ser localizados dentro da substância branca (Blumcke et al., 2011). Na FCD tipo IIB existe perda da laminação cortical com presença de NDs e BCs. Outras anormalidades são encontradas, como a presença de neurônios heterotópicos (NHs) na primeira camada ou na substância branca. BCs são células que apresentam múltiplos núcleos. São visualizadas por todo o córtex, incluindo a primeira camada, assim como na substância branca.

Pesquisas citológicas focam na possibilidade das BCs serem células ainda imaturas: seus filamentos intermediários mostram expressão preferencial por vimentina, nestina e GFAP - proteína ácida fibrilar glial- e ainda são GFAP positivas para astrócitos maduros (Lamparello et al., 2007; Martinian et al., 2009). Em alguns casos BCs expressam imunomarcagem para CD133 e CD34 que são marcadores de células precursoras (Ying et al., 2005; Fauser et al., 2004). As propriedades alteradas de tipos de células anormais podem fornecer algumas pistas sobre o motivo por FCDs serem epileptogênicas.

Displasia cortical focal tipo III refere-se a anormalidades de laminação corticais associadas a uma lesão principal. Quatro variantes foram descritas: FCD Tipo IIIA, associada a esclerose hipocampal; FCD tipo IIIB, associada a tumores; FCD tipo IIIC, associada a malformações vasculares e FCD tipo IIID, associada a qualquer outra lesão adquirida durante a vida (exemplos: lesão traumática, lesão isquêmica ou encefalite) (Blumcke et al., 2011).

As células do córtex exibem um equilíbrio entre a excitação e inibição e tal relação entre condutâncias inibitórias e excitatórias levam a uma perda deste equilíbrio que favorece a excitação podendo gerar uma crise epiléptica. Estudos têm demonstrado que o NO desempenha um papel na manutenção do balanço excitação/inibição no córtex visual (Hardingham et al., 2013).

O envolvimento funcional do óxido nítrico na gênese e duração das crises é largamente investigado por anos. Porém, a elucidação desses processos ainda permanece desconhecida. Diante do exposto, algumas patologias nas quais ocorrem malformações causadas por anormalidades no desenvolvimento cortical (MCD), cujo principal sintoma é a epilepsia, os mecanismos envolvidos na geração das crises aguarda elucidação.

Um das principais funções fisiológicas do óxido nítrico (NO) foi inicialmente demonstrada no relaxamento do músculo liso, mostrando que o fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) formado em células endoteliais era o NO (Furchot e Zawadzki, 1984). Desde então, estudos evidenciaram que o NO é um importante mensageiro celular que atua em diversos processos fisiológicos, incluindo transmissão neuronal, regulação do tônus vascular, modulação imunológica e inflamatória, apoptose, proliferação e diferenciação celular (Dimmeler e Zeiher, 1997; Madhusoodanan e Murad, 2007).

A molécula do NO é formada a partir de três isoformas de óxido nítrico sintases, (NOS), codificadas por genes separados. As constitutivas, isoformas ativadas pelo complexo cálcio/calmodulina são denominadas óxido nítrico sintase neuronal, (nNOS), e óxido nítrico sintase endotelial, (eNOS). A terceira isoforma, óxido nítrico induzível (iNOS), é uma enzima ativada de maneira independente de cálcio (Griffith e Stuehr, 1995). A (figura 1) mostra a estrutura e mecanismo funcional da nNOS.

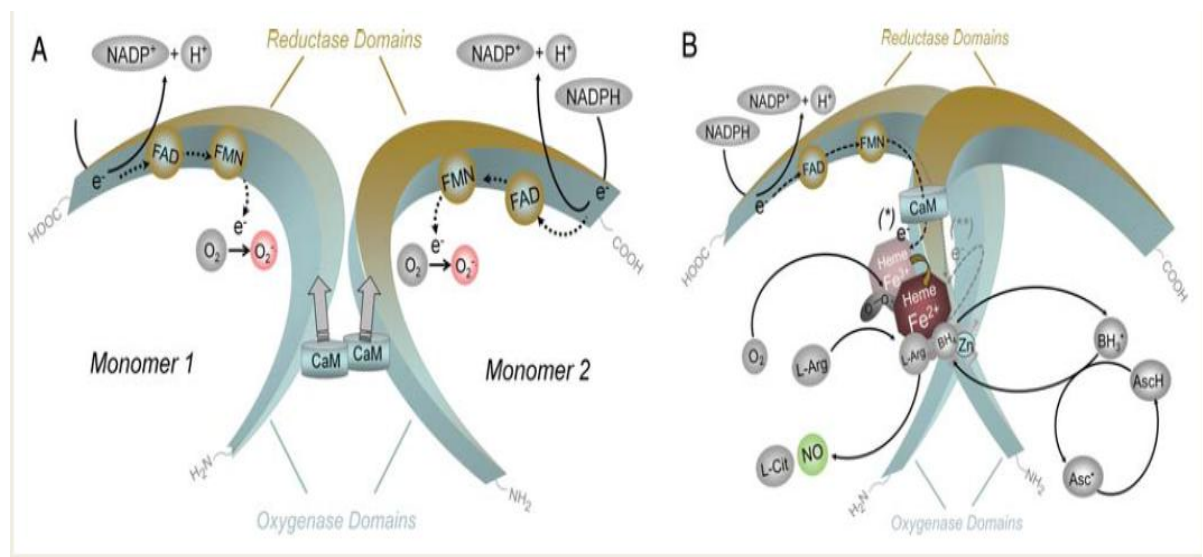


Figura 1: Estrutura e o mecanismo funcional da nNOS. Todas as isoformas utilizam L-arginina e oxigênio molecular como substrato e nicotinamina-adenina-dinucleotídeo fosfato (NADPH) como co-substrato. Flavina adenina dinucleotídeo (FAD), Flavina mononucleotídeo (FMN) e 6R - 5,6,7,8 tetrahidro-L-biopterina (BH4) são cofatores de todas as isoformas (Crane, 1998; Alderton, 2001). A nNOS possui dois domínios oxigenase e dois redutase (A). Ambos os domínios permitem a ligação de calmodulina na presença de cálcio, o qual é ativado para a enzima torna-se cataliticamente ativa formando um dímero. A presença do grupo heme é importante para transferência de elétrons entre os dímeros. A síntese de NO ocorre através de dois mecanismos: primeiramente a nNOS hidroxila L-arginina a N-hidroxi-L-arginina e em seguida ocorre oxidação de N-hidroxi-L-arginina a L-citrulina e NO (B) (Noble et al., 1999).

A principal via de sinalização fisiológica do NO ocorre através da ativação de receptores de guanilil ciclase solúvel (sGC) e a geração de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), (Furchgoot et al., 1984; Forstermann et al., 1986). Existem dois subtipos de receptores de sGC - $\alpha 1\beta 1$ e $\alpha 2\beta 1$ - com expressão regional complexa, como por exemplo o receptor $\alpha 2\beta 1$ que está presente em altos níveis no cérebro e tem sido mostrado que a subunidade $\alpha 2$ está ligada a membrana celular através de proteína de densidade pós-sináptica (PSD95), o que sugere uma localização pós-sináptica (Gibb e Garthwaite, 2001).

A NOS endotelial é expressa em células endoteliais, e é conhecida por sua participação na regulação do fluxo sanguíneo. É um regulador homeostático de inúmeras funções cardiovasculares (Garthwaite et al., 2006). O óxido nítrico derivado da eNOS dilata todos os tipos de vasos sanguíneos por estimulação da sGC e aumento de cGMP em células do músculo liso (Rapoport 1983; Forstermann et al., 1986).

A isoforma induzível não é normalmente expressa em células, mas sua expressão pode ser induzida por vários tipos celulares em resposta a lipopolissacarídeos, citocinas ou outros agentes. A iNOS gera uma grande quantidade de NO que tem efeitos citostáticos em células-alvo parasitárias, contribuindo para a fisiopatologia de doenças inflamatórias e choque séptico (Forstermann e Sessa, 2012). Também participa da resposta imune, sendo tipicamente formadas em macrófagos e neutrófilos, incluindo a microglia no sistema nervoso central (MacMicking et al., 1997).

Existem cinco isoformas de nNOS. Dentre elas, as isoformas nNOS- α , nNOS- β e nNOS- μ , são as principais isoformas relacionadas a produção de NO no cérebro; as isoformas nNOS- β e nNOS- γ são encontradas no citoplasma. A isoforma nNOS-2 é uma variante encontrada em camundongos e é considerada inativa pela falta de um grupo amino, o qual é importante para a ligação da L-arginina na isoforma nNOS- α (Luo e Zhu, 2011).

A nNOS está presente no sistema nervoso central (SNC) e no sistema nervoso periférico (SNP), em neurônios, células epiteliais, mácula densa do rim, medula adrenal, músculo esquelético, órgão sexual masculino, células β pancreáticas, dentre outras regiões (Forstermann et al., 1994).

Martins e colaboradores, em 2011, demonstraram por imunohistoquímica a localização de isoformas de NOS. Foi observada a imunorreatividade para nNOS no córtex cerebelar humano. A expressão de iNOS em células inflamatórias de pulmão humano com tuberculose e expressão de eNOS em glomérulos, arteríolas glomerulares

aferentes e eferentes em rim de rato. A análise da distribuição de nNOS no cérebro humano mostrou que no córtex cerebral os corpos das células neuronais exibiram imunorreatividade para nNOS ao longo de todo o córtex, com maior marcação de neurônios em suas últimas camadas. Contudo, a maior densidade de células positivas no córtex foi observada na junção entre a substância cinzenta e branca (Egberongbe et al., 1994; Ohyu e Takashima, 1998). Evidência atual sugere que nNOS está localizada em dois compartimentos neuronais diferentes: no citoplasma de uma pequena subpopulação de células GABAérgicas e em uma grande população de neurônios excitatórios no córtex e no hipocampo (Hardingham et al., 2013).

A maior parte da ação de NO no sistema nervoso está associada a ativação do receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) (Dawson et al., 1993; Schuman e Madison, 1994). A associação física do nNOS ao receptor de NMDA com a proteína (PSD-95) através de seus domínios PDZ ajudam a explicar a ligação preferencial aos receptores de NMDA e a produção de NO (Brenman et al., 1996; Garthwaite et al., 1988). No SNC o glutamato está envolvido com a neurotransmissão excitatória, exercendo ação sobre uma variedade de receptores de membrana, incluindo receptores de glutamato ionotrópicos. A ligação do glutamato é essencial para mediar plasticidade neuronal, pois é capaz de converter padrões específicos de atividade neuronal em alterações sinápticas como potenciação de longo prazo (LTP), fenômeno envolvido com funções cognitivas. A LTP é um aumento prolongado da magnitude da resposta sináptica de um neurônio, quando o neurônio pré-sináptico é estimulado por uma corrente de alta frequência. Este é um fenômeno típico de sinapses excitatórias glutamatérgicas que já foi demonstrado em diferentes regiões do SNC, tais como, córtex cerebral (Bear e Kivkwood, 1993; Katz e Shatz, 1996). Esse fenômeno é melhor ilustrado na (figura 2), (Lent, 2010).

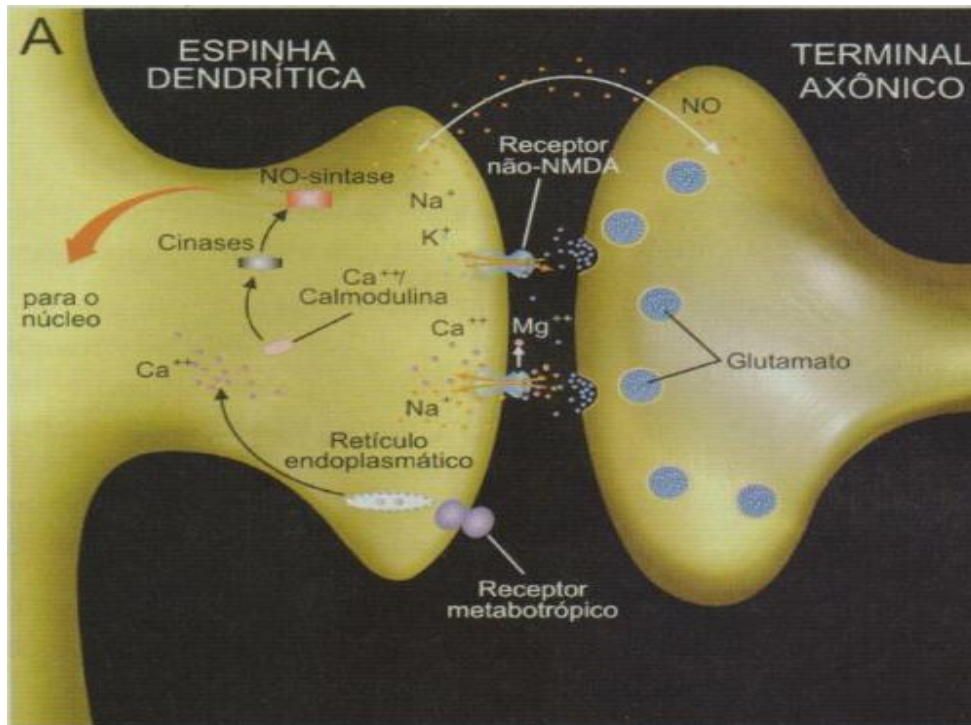


Figura 2. O mecanismo molecular da LTP envolve três receptores glutamatergicos. O primeiro a ser ativado é o receptor não NMDA, que permite à entrada de cálcio e conseqüentemente, despolarizam a membrana sináptica. A despolarização resulta em remoção do íon Mg^{++} do receptor NMDA, e conseqüentemente, mais cátions atravessam a membrana, acentuando a despolarização. O terceiro receptor, metabotrópico, ativa uma cadeia de reações intracelulares que acabam por liberar íons Ca^{++} para o citosol. O efeito despolarizante prolonga-se ainda mais com a ativação da nNOS, produtor do óxido nítrico, que por sua vez, atravessa livremente as membranas e facilita a liberação de mais glutamato pelo terminal pré-sináptico. Modificado de Lent (2010).

Aoki e colaboradores (1997) mostraram que a nNOS e a subunidade dos receptores NMDA funcionais co-existem em espinhas dendríticas e terminais do córtex visual de ratos adultos. Esses resultados sugerem que uma possível geração de NO possa ser temporariamente coordenada pela transmissão sináptica glutamatergica. No entanto, o NO pode modular outros tipos de neurotransmissão. Estudos indicam que a liberação de neurotransmissores monoaminérgicos dentro de uma área do cérebro possa ser regulada pelo NO (Kiss e Vizi, 2001).

Receptores de NMDA provavelmente desempenhem um importante papel na epileptogênese, principalmente devido à sua permeabilidade ao Ca^{++} . Estudos mostraram uma associação no aumento da expressão de NMDA e sua subunidade NR2B em córtex displásico epiléptico (Crino et al., 2001; Najm et al., 2000).

No sistema nervoso central, o óxido nítrico é um possível mensageiro molecular que modula a função neural (Brenman e Brecht, 1997). Está envolvido em uma variedade de funções, incluindo controle da plasticidade sináptica e sinalização sensorial

(Leite et al., 2002). Estudos sugerem que NO atue como um mensageiro retrógrado entre elementos pré-sinápticos em uma variedade de sinapses excitatórias (Garthwaite, 2008).

Estudos anteriores com doadores de NO e inibidores da (NOS) revelaram que este gás está certamente envolvido com a regulação da excitabilidade neural, potenciação e depressão em longo prazo e processamento de memória (Babbedge et al., 1993; Borowicz et al., 2000).

Têm sido proposto mecanismos de regulação da atividade de nNOS. Um dos mecanismos está baseado na ligação do PIN (Proteína inibidora de nNOS) que desestabiliza o dímero de nNOS (Jaffrey e Snyder, 1996). Após indução de isquemia cerebral global foi observado um aumento rápido na expressão de PIN em neurônios piramidais presentes na região CA3 do hipocampo e células granulares do giro dentado, sugerindo que a indução na expressão de PIN neutralize o aumento da atividade de nNOS protegendo os neurônios dos danos causados pelo excesso de liberação de NO (Gillardon, et al. 1998). Chang e colaboradores (2000) forneceram evidências de um mecanismo regulatório ligado a ciclooxigenase (COX), no qual COX-2 estimula PIN, que conseqüentemente inibe morte celular programada por prevenir o aumento na atividade de nNOS.

2. OBJETIVOS

Investigar a expressão imuno-histoquímica de nNOS no córtex cerebral dos pacientes tratados cirurgicamente que apresentam displasia cortical focal tipo IIb ou tipo Taylor, como uma primeira abordagem para estudos quantitativos.

Analisar o padrão de distribuição de neurônios imunorreativos para nNOS.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Ácido Clorídrico (HCl): Merck, Darmstadt, Germany; Ácido ortofosfórico: Merck, Darmstadt, Germany; Álcool: Merck, Darmstadt, Germany; *Biotin Blocking Kit*: DAKO, Carpinteria, U.S.A.; Diaminobenzidina (DAB): Pierce, Rockford, U.S.A.; Formalina tamponada: Merck, Darmstadt, Germany; Fosfato de sódio: Merck, Darmstadt, Germany; Glisina: Sigma, Steinheim Germany; Kit Elite ABC: Vector, Burlingame, U.S.A.; Cloreto de Sódio (NaCl): Merck, Darmstadt, Germany; Parafina: Histosek, Darmstadt, Germany, Peróxido de hidrogênio: Merck, Darmstadt, Germany, Permunt: Fisher, Fair Law, U.S.A; Soro de cabra: doado pelo Prof. Dr. José M. B. Duarte, Unesp-Jaboticabal; soro de jumento, doado pelo Dr. Marcelo B. Duarte; Soro-albumina bovina: Sigma Place, Steinheim, Germany; Tris, USB, Cleveland, U.S.A. Triton X-100: USB, Creveland, U.S.A. Trizma Base: Sigma, Steinheim Germany; Xileno: Synth, Diadema, Brasil.

3.2 Pacientes

Pacientes com FCD IIb (Tab. 1) foram avaliados no Programa de Cirurgia de Epilepsia de Ribeirão Preto da FMRPU-SP (CIREP-USP), no programa de Cirurgia de Epilepsia de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil, na unidade experimental de neurofisiologia e clínica de epilepsia, fundação IRCCS e no Centro de Cirurgia para Epilepsia do *Istituto Neurologico* Camilo Besta, Itália, utilizando protocolos padronizados e aprovados pelos Comitês de Ética de cada instituição (HCFMRP Nos. 6554/2007 e 6591/2007 e CEP/UFTM processo No. 1929). Todos os casos para este estudo foram selecionados de pacientes com epilepsia resistente ao uso de medicamentos que sofreram ressecção cirúrgica da região epileptogênica para tratamento das crises epiléticas, com consentimento prévio de todos os pacientes antes da cirurgia.

A avaliação de cada paciente incluiu história clínica detalhada e exames neurológicos, tais como: eletroencefalograma (EEG) interictal/ictal, monitoramento interictal/ictal por vídeo-EEG, extensa bateria de testes neuropsicológicos e registros corticais intra-operatórios. Exames de neuroimagem, ressonância magnética de alta resolução (MRI) e tomografia computadorizada ictal/interictal por emissão de um único fóton (SPECT), foram

realizados. As regiões epileptogênicas identificadas foram então submetidas à ressecção cirúrgica.

3.3 Processamento dos tecidos e imunohistoquímica

Os tecidos corticais foram fixados em formalina 10% (volume/volume) e embebidos em parafina. A expressão de nNOS neuronal, marcador de neurofilamento pan-neuronal (SMI311) e proteína acídica fibrilar glial (GFAP) foi detectada utilizando anticorpos específicos (Tab. 2).

A detecção de todos os epítomos em tecidos corticais com 4-8 µm de espessura foi realizada de acordo com o protocolo padronizado por Martins et al., (1999; 2011). A recuperação antigênica foi realizada em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 9,5 e a detecção foi feita através da técnica ABC e diaminobenzidina como cromógeno. As interações inespecíficas foram bloqueadas com tampão de bloqueio, constituído por tampão Triton (Fosfato de sódio 50 mM, Cloreto de sódio 0,9% massa/volume e triton X-100 0,3% volume/volume), soro de cabra 15% (volume/volume) e soro albumina-bovina 3% (massa/volume). As secções foram incubadas *overnight* com os anticorpos primários diluídos em tampão de bloqueio, como indicado na Tab. 2. Após cada incubação, as secções foram lavadas com tampão Triton. A biotina endógena foi bloqueada usando *Biotin Blocking System*. As secções foram então incubadas durante 30 minutos com anticorpos secundários anti-*rabbit* ou anti-*mouse* biotinilados, IgG (Dako, diluição 1:100) diluídos em tampão de bloqueio, (Tampão triton contendo 15% (vol/vol) soro normal de cabra e 3% (massa/volume) de albumina em soro bovino, (Sigma). Todas as operações foram realizadas em temperatura ambiente. A omissão do anticorpo primário foi usada como controle em cada ensaio.

3.4 Obtenção das imagens

Fotografias das secções coradas por Hematoxilina-Eosina (H&E) ou tratadas na imunohistoquímica foram feitas com câmera AxioCamMR5 acoplada em um microscópio axio Imager M1 (Zeiss) e alimentado para o programa Axiovision 4.8.1 (Zeiss) em um computador Windows. Todas as imagens foram feitas com aumento de 200x e com iluminação constante (3V, 100%, 60 ms de exposição).

Tabela 1. Caracterização dos casos FCD IIb

Nº do caso	Sexo	Idade na cirurgia (anos)	Zona epileptogênica
1	M	6	F-D
2	F	19	T-D
3	F	34	T-D
4	F	41	F-D
5	M	5	TPO-D
6	F	2	T-D
7	F	5	TO-D
8	F	<1	F-E
9	M	3	F-E
10	F	16	F
11	M	22	F-E
12	F	21	F
13	F	12	?
14	F	9	P
15	M	40	T-D
16	F	36	P-D
17	M	36	F-E
18	M	20	F
19	M	1	FTP
20	M	36	F
21	M	1	F-E
22	F	2	P
23	M	14	T-E

M, masculino; F, feminino; F-D, lobo frontal direito; T-D, Lobo temporal direito; T-E, Lobo temporal esquerdo; TPO -D, Lobos temporal/ parietal/ occipital direitos; TO- D, Lobos temporal e occipital direitos; F-E, Lobo frontal esquerdo; P, Lobo parietal; FTP, Lobos frontal/ temporal/ parietal; F, Lobo frontal; FCD IIb, displasia cortical focal IIb.

Tabela 2. Anticorpos usados nos ensaios de imunohistoquímica

Anticorpo	Fabricante	Código do Produto	Diluição (vol/vol /μg/mL)
Polyclonal rabbit anti-nNOS	BD / Transduction Laboratories	610311	1:10 / 85
Monoclonal antibody against pan-neuronal neurofilament marker	Covance	SMI311R	1:2000 / 0,6
Polyclonal rabbit IgG anti-glial fibrillary acidic protein	Dako	Z0334	1:500/ 2
Biotinylated-rabbit IgG anti-mouse IgG	Dako	E0354	1:100/ 10
Biotinylated-swine IgG anti-rabbit IgG	Dako	E0353	1:100/ 10

4. RESULTADOS

4.1 Achados clínicos

Neste trabalho foram estudados 23 pacientes com FCD IIb (11 do sexo masculino e 12 do sexo feminino), com idade de 1 a 41 anos (Tabela 1) e operados com idade média de 14 ± 14 anos (média \pm desvio padrão). As lesões epileptogênicas nos pacientes FCD foram amplamente distribuídas nas diversas regiões corticais, mas predominaram no córtex frontal (12/23) e temporal (8/23) com prevalência focal ou estendendo para outro(s) lobo(s). As lesões em mais de um lobo foram vistas em 3/23 casos. Quatro pacientes foram re-operados e um morreu após a cirurgia.

4.2 Diagnóstico histopatológico

Pacientes com epilepsia resistente ao uso de medicamentos dos quais os exames clínicos, de imagem e eletroencefalográficos indicaram lesão cortical compatível com FCD tipo IIb (Tabela 1), sofreram tratamento com ressecção cirúrgica. Os córtices provenientes do processo cirúrgico foram estudados usando rotinas de coloração (H&E, cresil de violeta e impregnação por prata pelo método de Bielschowsky) e ensaios de imunohistoquímica. Todos os anticorpos usados estão apresentados na tabela 2.

Secção cortical corada por H&E (Fig. 3A), de paciente cujo córtex frontal foi retirado para tratamento de epilepsia resistente a medicamentos demonstrou rompimento da organização cortical que incluiu desorganização laminar e colunar. Esta displasia era severa uma vez que não era possível observar colunas e camadas, exceto a camada I (Figs. 3A, 3B marcação por anti-SMI311). Contudo, mesmo a camada 1 no caso 10 estava profundamente invadida por células grandes (Figs. 3A e 3C). Células grandes, observadas em nossos casos incluíram *balloon cells* (Figs. 3A, C e C inset esquerdo, D and D inset esquerdo) e neurônios dismórficos (Figs. 3A, D inset direito), os quais são achados histopatológicos da FCDIIb. Outras características da FCD IIb, observadas aqui, incluiu perda de orientação de dendritos (Figs. 3B, E), neurônios heterotópicos na substância branca (Fig. 3G) e neurônios hipertróficos (Fig. 3C inset direito, ver secção 3.3). Número e reatividade glial aumentados também foram observados conspicuamente na vizinhança de grandes neurônios corticais (Fig. 3H)

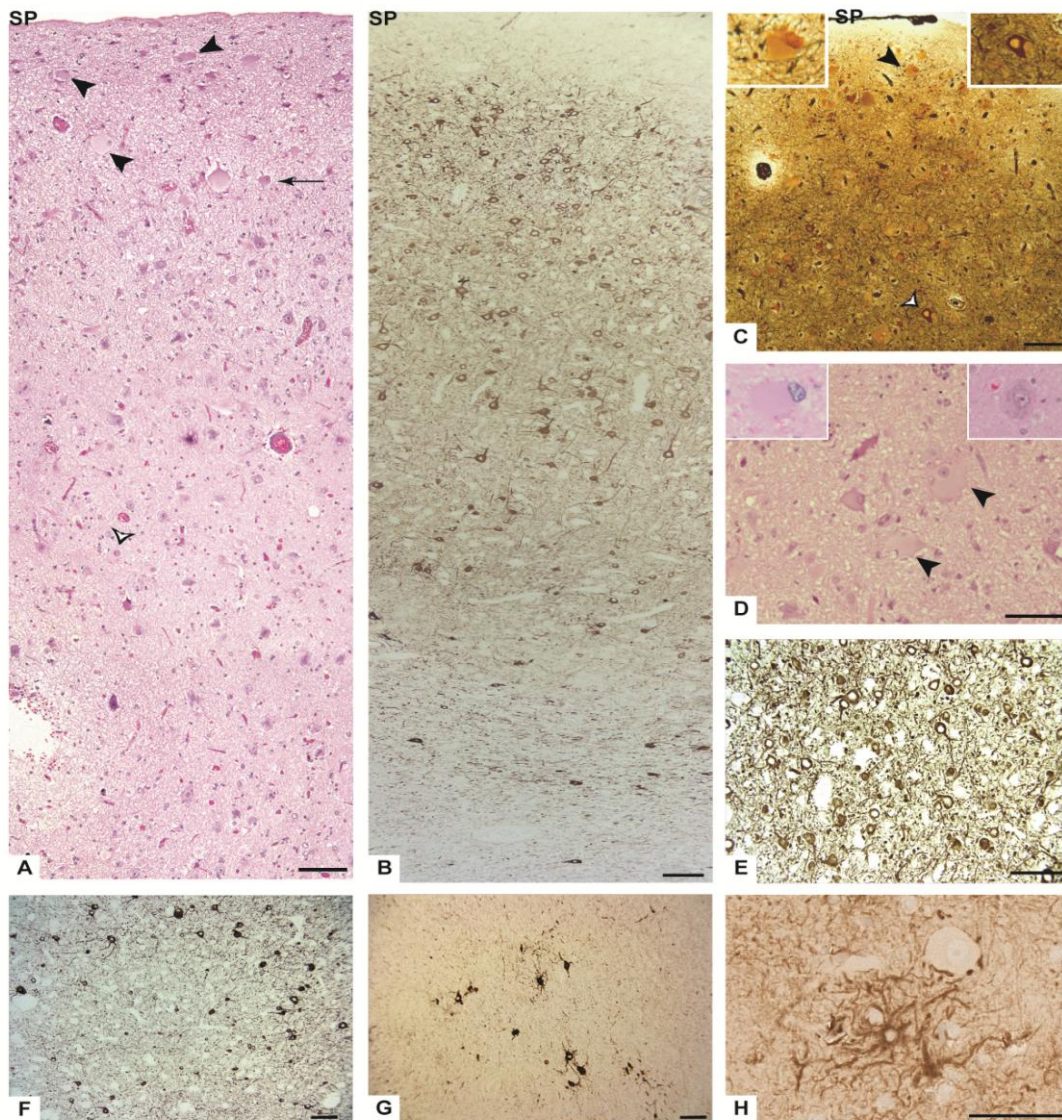


Fig. 3. Diagnóstico da displasia cortical focal tipo IIb. Secções de córtices frontal (casos 8 e 10) e parietal (caso 11), retirados de pacientes epiléticos demonstraram região fortemente displásica, caracterizadas por ambos tipo de desorganização citoarquitetural, laminar e colunar (**A, B, C**). Ambos *balloon cells* (cabeças de seta em **A, C** e **D** inset à esquerda) e neurônios dismórficos (setas em **A** e **D** inset à direita) foram observados e juntos com a displasia cortical, concluíram o diagnóstico histopatológico de FCD IIb. Note neurônio hipertrófico em **A, C** (cabeça de seta branca) e **C** inset à direita. Achados histopatológicos frequentes incluem: perda de orientação dos dendritos principais, muitos dos quais não estão orientados para a superfície pial (SP), (**B, E**); borramento na transição branco-cinzenta (**B, F**); neurônios heterotópicos presentes na substância branca (**G**), e intensa gliose na vizinhança de neurônios aglomerados (**H**). Cases: **8**, **D** (inset à direita); **10**, **A, B, C, D, E, G**; **11**, **H**; 1, **D** (inset à esquerda). Panels **A** and **D**, H&E; panels **B, E, F** e **G**, imunomarcacão com anti-SMI311; painel **H**, imunomarcacão com GFAP; painel **C**, coloracão por Bielschovsky's. Barras 100 μ m.

Displasia cortical, BCs e DNs foram encontrados em todos os vinte e três pacientes estudados aqui. *Balloon cells* foram observadas em todas as profundidades corticais, incluindo a camada I (Fig. 3A, C e C inset esquerdo), mas foram primeiramente localizadas na substância branca. *Balloon cells* frequentemente localizavam na junção entre a substância branca e cinzenta. Ambos BCs e DNs estendiam para dentro da substância branca, resultando no borramento do limite branco cinzento em comparação com o limite bem delimitado observado no córtex normal (Figs. 3A, B, F). Áreas corticais com aspecto normal foram observadas algumas vezes ao lado do córtex displásico.

4.3 Expressão da óxido nítrico sintase neuronal em displasia cortical focal tipo Taylor

Óxido nítrico sintase neuronal foi observada em todas as camadas do córtex cerebral obtido de pacientes que sofreram ressecção cirúrgica como tratamento de epilepsia (Fig. 4). Alguns pacientes exibiram forma histopatológica severa, com células grandes fracamente ou moderadamente marcadas presentes na camada I (Fig. 4A, C), enquanto nas formas menos severas estas células estavam presentes em todas as camadas, exceto na camada I (Fig. 4B, D). Neurônios pequenos com marcação *Golgi-like* foram observados em todas as camadas, em ambas formas de FCD IIb, bem como na substância branca (Fig. 4E). A imunorreatividade para nNOS foi positiva no corpo celular e em processos (Fig. 4F). Observe aglomerado de células alteradas morfológicamente com intensidade variada de marcação (Fig. 4G). Não observou imunorreatividade no controle com a omissão do anticorpo primário (Fig. 4H).

Neurônios hipertróficos (Fig. 5A, E) e neurônios dismórficos (Fig. 5B), os quais ocorrem em ambos tipos de FCD, IIa e IIb, expressaram nNOS com intensidade variada. *Balloon cells* (Fig. 5C, D), tipo celular característico de FCD IIb, ocorreram de forma isolada (Fig. 5C) ou aglomerada (Fig. 5D). Células putativas gemistocíticas também foram observadas (Fig. 5F).

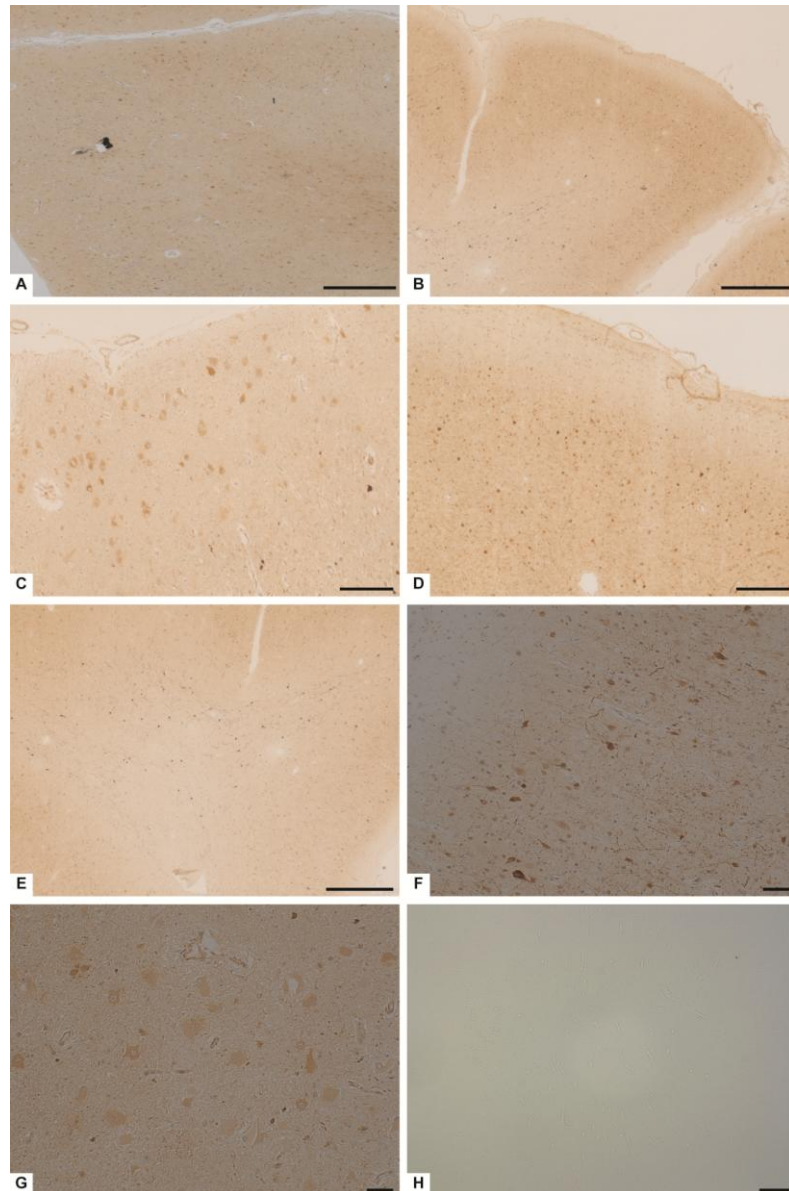


Fig. 4. Expressão de nNOS no córtex de pacientes diagnosticados com displasia cortical focal tipo Taylor. Secções de córtices temporo-parietal (A, C, F), e frontal (B, D, E, G), retirados de pacientes epiléticos demonstraram região fortemente displásica caracterizada por ambos tipo de desorganização citoarquitetural, laminar e colunar (A, B, C, F, G,). Note que células grandes invadem a camada da superfície cortical, incluindo a camada I (painel A) ou estão distribuídas em outras camadas corticais, com exceção da camada I (painel B). Em contraste com estas células grandes, pode-se observar pequenas células com aspecto Golgi-like de marcação positiva para nNOS, distribuídas através das camadas corticais (painéis C, D) e também na substância branca (painel E). Intensa marcação de nNOS no corpo celular e em processos (painel F). Variada intensidade de marcação em células alteradas morfológicamente (painel G). Note ausência de imunorreatividade no controle com a omissão do anticorpo primário (painel H). Casos: 9, A, C G; 5, B, D, E, F; 22, H Barras: A, C, D, 200 μ m; E, B, H 100 μ m; F, G, 50 μ m.

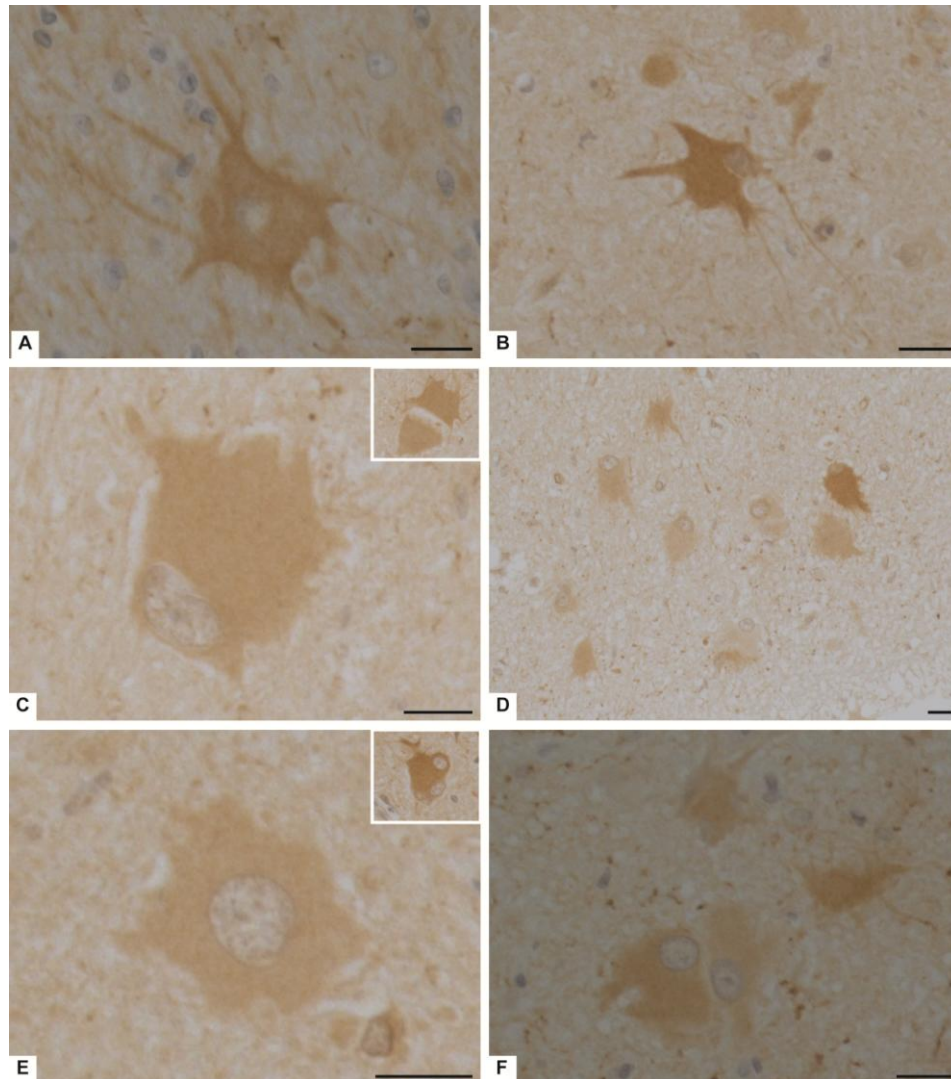


Fig. 5. Expressão de NOS neuronal em todos tipos celulares característicos de FCD IIb. Neurônios hipertróficos (painéis A, E), dismórficos (painel B) e *balloon cells* (painel C) expressaram nNOS com intensidade variável. Esta variada intensidade de marcação pode ser melhor observada em aglomerados de *balloon cells* (painel D). Um par de células putativamente identificadas como gemistocítica é observado no painel F. Casos: 10, A, F; 9, B, C, D, E. Barra: 20 µm em todos os painéis.

A expressão de óxido nítrico sintase neuronal em interneurônios GABA-érgicos no neocórtex adulto tem sido demonstrada. Interneurônios fortemente marcados, típico aspecto *Golgi-like*, foram observados em todas as camadas corticais, na transição branco-cinza e na substância branca (Fig. 6A). Eles eram menores nas camadas corticais quando comparados com aqueles presentes na transição branco-cinza ou na substância branca (Fig. 6A). Várias formas neuronais foram observadas, tais como bipolar (Fig. 6B, célula à esquerda; 6F), *bitufted* (Fig. 6C,E), multipolar poligonal (Fig. 6D), células sem nome específico (Fig. 6B, célula à direita; 6G) e neurogliaforme (Fig. 6H).

Processos varicosos (Fig 7A, B), cursando horizontalmente no neocórtex e na substância branca, obliquamente ou verticalmente a superfície pial foram observados na maioria dos casos (não demonstrado aqui). Estes neurônios foram identificados como axônios no neocórtex e na substância branca em adultos.

Marcação nuclear de vários tipos neuronais (Fig. 8A), incluindo BCs (Fig. 8B e inset) e neuroblastos (Fig. 8C), foi uma característica observada na maioria dos casos FCDIIB estudados aqui.

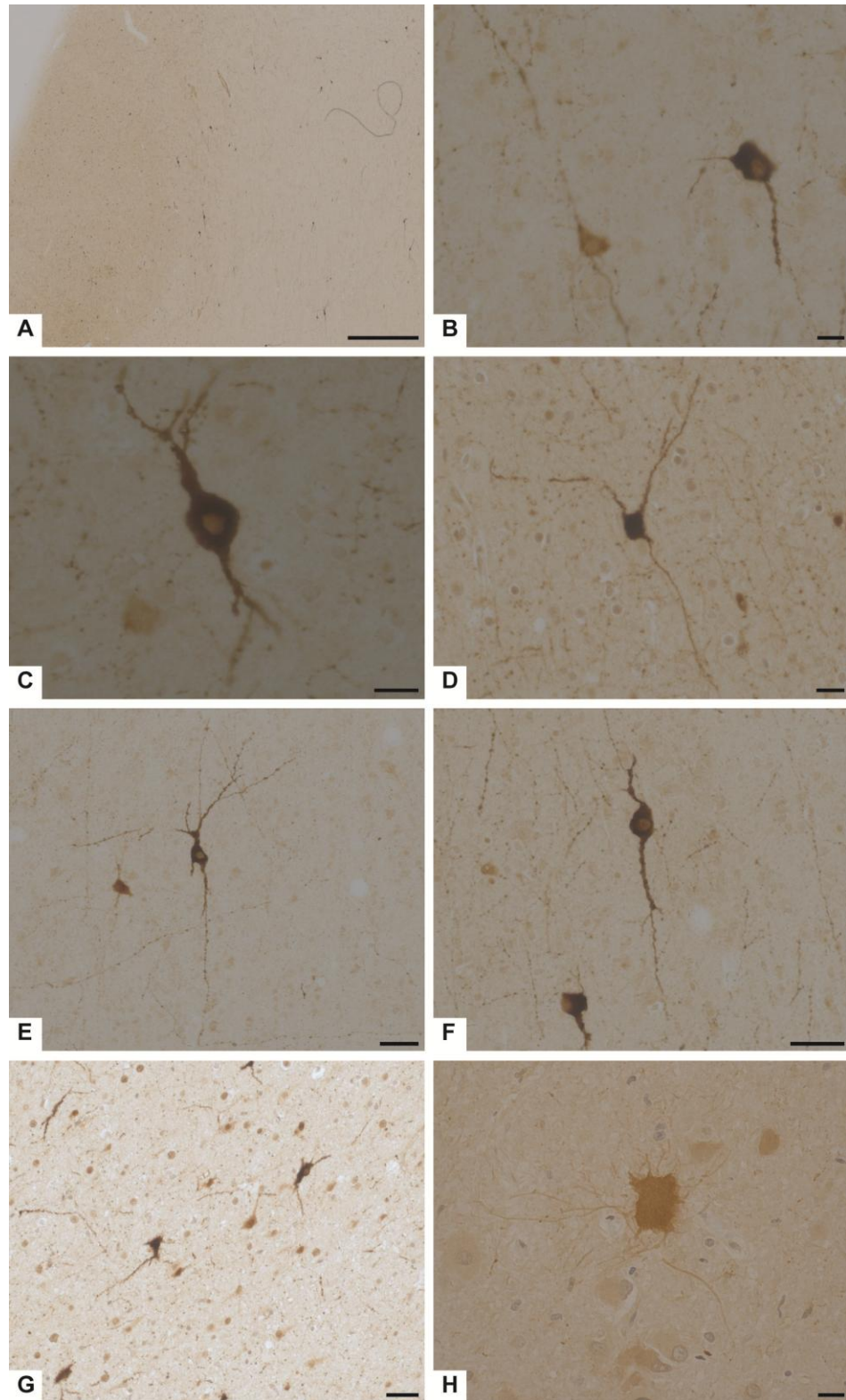


Fig. 6. Expressão de nNOS em diferentes tipos de interneurônios. Uma visão panorâmica (painel **A**), do neocórtex indica regiões onde tipos celulares foram imunomarcados: bipolar (painéis **B**, **F**), *bitufted* (painéis **C**, **E**), multipolar (painel **D**) e interneurônios sem nome específico (painéis **B**, **G**), foram observados com imunomarcagem positiva para nNOS. Célula neurogliaforme é demonstrada no painel **H**. Casos: 12, **A**, **B**, **C**, **E**, **F**; 8, **D**, **G**; 10, **H**. Barras: **A**, 1000 μm ; **B**, **C**, **D**, **H**, 20 μm ; **E**, **F**, **G**, 50 μm .

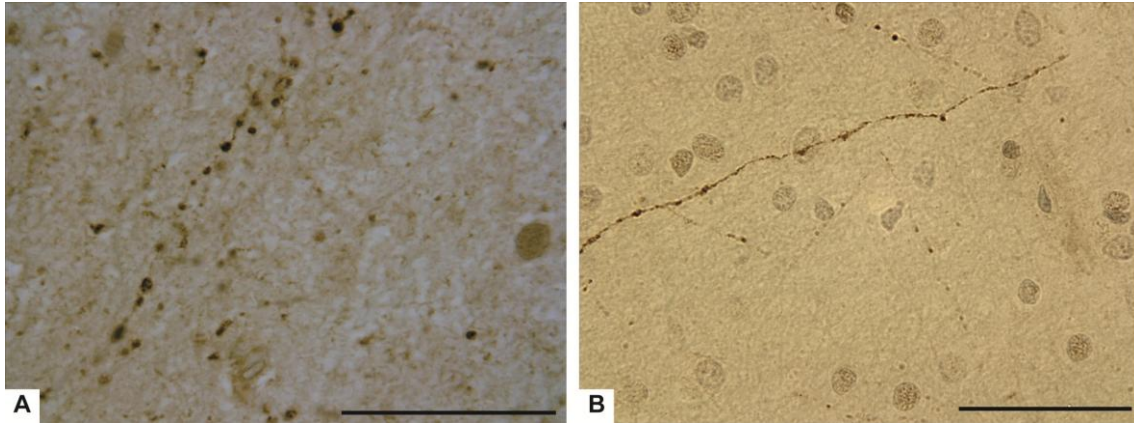


Fig. 7. Processos varicosos foram detectados através do neocórtex e da substância branca de pacientes com FCD IIb. Longos processos varicosos foram observados em todos os casos de FCD IIb, alguns processos com varicosidades largas (painel **A**) e outros com varicosidades menores (painel **B**). Casos: 11, A; 7, B. Barra: 50 μ m em todos os painéis.

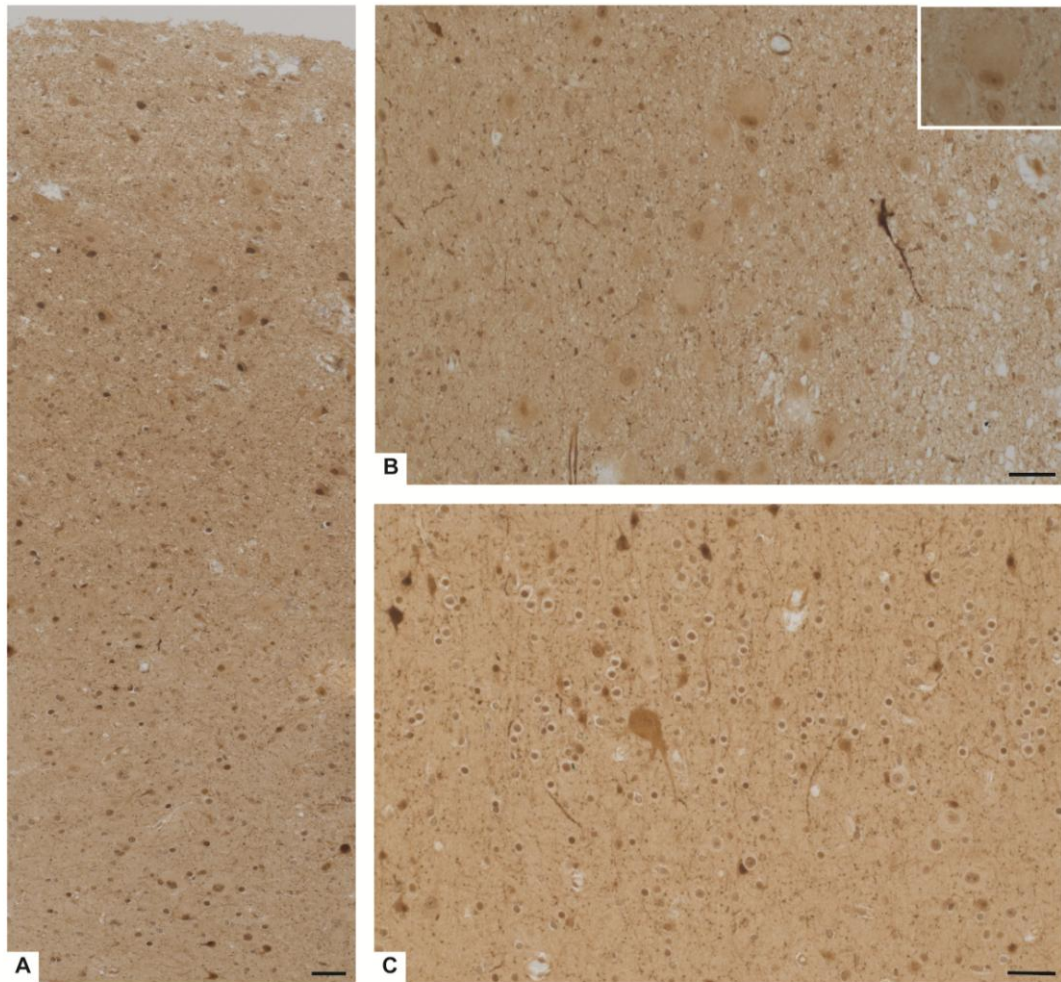


Fig. 8. Expressão de nNOS em núcleos celulares no neocortéx FCD IIb. Em alguns casos com intensidade variada, a expressão de nNOS em núcleos aparentemente ocorreu na maioria dos tipos neuronais (A). A marcação de ambos, citoplasma e núcleos, de *balloon cells* foi variável (B e inset). Pequenas células, semelhantes à neuroblastos, apresentaram intensa expressão nuclear com citoplasma evidentemente claro (C). Note um neurônio citomegálico no painel C. Caso: 8, A, B, C. Barra: 50 μ m em todos os painéis.

5. DISCUSSÃO

5.1 Características diagnósticas de neurônios dismórficos, hipertróficos e balloon cells

O presente trabalho sistematicamente documentou a expressão de nNOS em FCD do tipo IIb, com dois focos especiais: primeiro as células patológicas características desta patologia, DNs e BCs, células anormais que permitem o diagnóstico diferencial da FCD tipo IIb de outros tipos de displasias corticais focais e outras patologias neurológicas que apresentam neurônios citomegálicos e BCs, em segundo, os tipos celulares e as estruturas que expressam nNOS. FCD IIa e FCD IIb podem ser diferenciadas pela presença de BCs na FCD IIb e não na FCD IIa, enquanto que DNs ocorrem em ambos tipos de FCD, IIa e IIb (Taylor et al., 1971; Palmini et al., 2004; Blüncke et al., 2011). *Balloon cells* e DNs não ocorrem em nenhum subtipo de FCD tipos I ou III. Já os neurônios hipertróficos podem ser encontrados em todos os outros subtipos de FCD, então é crucial distinguir neurônios hipertróficos e DNs. Neurônios dismórficos são caracterizados por um conjunto de anormalidades citológicas severas que incluem: 1 - alargamento do diâmetro celular (16-43 μm) comparado com aqueles neurônios piramidais da camada III (12-25 μm); 2 - alargamento do diâmetro nuclear (15-28 μm), também comparado com neurônios piramidais da camada III (10-18 μm); 3 - substância de Nissl pode estar aglomerada ou deslocada para a membrana celular; 4 - acúmulo de isoformas de neurofilamento no citoplasma; 5 - orientação anormal e 6 - perda de orientação dendrítica. A forma celular não é uma característica de DNs, embora eles possam ser *misshapen* (Blüncke et al., 2011). Em contraste, neurônios hipertróficos são aqueles maiores que os neurônios piramidais da camada V, porém localizados fora desta camada e com núcleo central (Tassi et al., 2002). Eles usualmente preservam relativa morfologia piramidal normal e apresentam dendritos apicais (como mostrado aqui); (Palmini et al., 2004; Blüncke et al., 2009; Blüncke et al., 2011), mas também podem apresentar forma de interneurônios (André et al., 2007). Acúmulo de neurofilamento agora tem sido aceito ocorrendo em ambos tipos neuronais, hipertróficos e DNs, como demonstrado pela coloração de Bielschowsky e imunomarcações com MAP2, tubulina, SMI311 e neurofilamento (Blüncke et al., 2011). Células com características de neurônios hipertróficos nunca são encontradas fora da camada V em córtex normal (Tassi et al., 2002). *Balloon cells* são diagnosticadas como células grandes, com formato arredondado ou oval, com citoplasma pálido e eosinofílico que

possui carência de substância de Nissl e apresentando um ou mais núcleos excêntricos (Palmini et al., 2004; Blüncke et al., 2009; 2011). Elas apresentam citoplasma marrom dourado quando coradas pela técnica de Bielschowsky's.

O termo displasia cortical designa um espectro de anormalidades citoarquitetural do córtex, variavelmente associadas com características citopatológicas incluindo, BCs, DNs, neurônios hipertróficos e neurônios imaturos com pequeno diâmetro (Palmini et al., 2004, Tassi et al., 2002). Displasias corticais focais parecem se originar de anormalidades que ocorrem durante a migração, proliferação, diferenciação e/ou apoptose celular durante o desenvolvimento cortical, e/ou lesões cerebrais peri ou pós natais (Guerrini e Parrini, 2010), como sugerido pela expressão de diversos marcadores (Chamberlain & Prayson, 2008; Andre et al., 2007; Ying et al., 2005).

5.2 Expressão de nNOS no neocortex de pacientes com FCD IIB que sofreram ressecção cirúrgica para tratamento da epilepsia

O desenvolvimento de circuitos neurais é um processo regulado precisamente, susceptíveis a alterações genéticas e ambientais que podem conduzir a distúrbios que afetam a função cerebral humana. O Desenvolvimento neural ocorre através de uma sequência organizada e controlada de eventos que incluem a proliferação, migração, diferenciação, apoptose e sinaptogênese. A organização normal ou anormal das minicolunas cerebrais (Hannan et al; 1999; Rakic, 1988) que são compostas de neurônios dispostos verticalmente ligados numa rede local é programada para se originarem a partir de unidades de desenvolvimento radial (Rakic, 1988). NOS neuronal é expressa de forma transiente em uma sub-população de neurônios piramidais no neocórtex humano em desenvolvimento (Kwan e Sestan, 2012) além de sua localização na placa cortical e interneurônios (Fertuzinhos et al., 2009). Localização neuronal de NOS em células piramidais foi encontrada em regiões e camada específica, predominantemente em dendritos apicais e soma, e é dependente da idade. Expressão NOS neuronal em neurônios piramidais é progressivamente regulada após o nascimento. A expressão em função do tempo e a localização anatômica da nNOS sugerem um potencial papel para nNOS no desenvolvimento dos circuitos corticais, especialmente durante a sinaptogênese (Kwan e Sestan, 2012). O NO é um gás com capacidade de difusão e meia vida curta, cuja síntese pode ser precisamente rápida e localizada. De fato isto ocorre pelo controle local de sua síntese e fatores de transcrição e tradução (Garthwaite, 2008).

As propriedades do óxido nítrico (NO) tornam-no um candidato em potencial para participar do balanço excitação-inibição. O NO é um gás difusível, radical livre hidrofóbico que pode permear membranas celulares. O NO pode ser sintetizado por NO sintase (NOS), entre as quais a isoforma neuronal (nNOS, NOS tipo I) é localizada no cérebro (Bredt et al., 1991; Schmidt e Murad et al., 1992), no citoplasma, dendritos, estruturas pré e pós-sinápticas e espinhas dendríticas (Aoki et al., 1997). Axônios e suas varicosidades também foram mostrados por conter nicotinamida adenina fosfato-diaforase (NADPHd), por histoquímica (DeFelipe, 1993). nNOS foi observada em displasias cortical focal (Gonzalez-Martinez et al., 2009). NADPHd /nNOS co-localiza com 100% de neurônios GAD positivos em neocortex de macaco (Yan et al., 1996) e neocortex de rato (Valtschanoff et al., 1993) O NO está envolvido na ação de vários mediadores e canais iônicos que participam da excitabilidade neuronal, atuando tanto pré e pós – sinapticamente (Garthwaite, 2008). Neurônios gabaérgicos constituem o substrato anatômico inibitório do balanço excitação-inibição.

HNs, DNs e BCs são resultados de distúrbios na proliferação celular nas etapas iniciais de desenvolvimento (Palmini et al., 2000; Blüncke et al., 2009). A expressão da nNOS no DNS e BCs mostrada aqui sugere que nNOS foi expressa durante a neurogênese. Estes resultados estão em conformidade com a demonstração de que a zona subventricular (SVZ), está cercada por neurônios positivos para nNOS e que os precursores neuronais no giro dentado expressam nNOS, que a inibição de nNOS aumenta o número de células mitóticas na SVZ, no fluxo migratório rostral e no bulbo olfativo, mas não no giro dentado (Zhou and Zhu, 2009). Dessa forma, tem sido sugerido que nNOS pode participar da neurogênese. A expressão de nNOS foi demonstrada tanto no citoplasma como em dendritos no neocortex dos pacientes, como descrito anteriormente (Schmidt et al., 1992; Bredt et al., 1991). Verificou-se também no núcleo de vários tipos de células (na presente dissertação). Imunomarcção em astrócitos do córtex cerebral em cultura de ratos mostrou que, durante os primeiros seis dias em cultura nNOS foi encontrada predominantemente no citoplasma, mas no sétimo dia a imunorreatividade foi encontrada predominantemente no núcleo, durante um período de 10 horas, e depois disso novamente no citoplasma (Korzhevskii et al., 2008).

Análise através de imunohistoquímica para detecção de isoformas de óxido nítrico sintase em células de linfoma de não Hodgkin's e mieloma múltiplo mostrou imunorreatividade variável para as três isoformas que sintetizam NO. Foi observada expressão de nNOS em células neoplásicas do plasma com marcação nuclear de pacientes com mieloma múltiplo, nos casos de linfoma de não Hodgkin's foi mostrado imunorreatividade para nNOS no

citoplasma e no núcleo de células neoplásicas com intensidade de marcação variável entre os casos estudados (Mendes et al; 2001).

Imunohistoquímica revelou que carboxi-terminal PDZ ligante de nNOS (CAPON) um regulador de nNOS, que ajuda a regular a estabilidade, localização e possivelmente expressão durante a formação de sinapses, está localizada nos núcleos dos neurônios no cérebro após a injeção peritoneal com lipopolissacarídeo (LPS) in vivo. Foi demonstrado um aumento na expressão de CAPON em neurônios do hipocampo e cortex cerebral após tratamento. Os resultados demonstraram uma translocação de CAPON do citoplasma para o núcleo após injeção com LPS, sugerindo um efeito protetor sobre os neurônios através da produção interrompida de NO derivado de nNOS (Shoo Bai et al; 2009).

Recentemente foi demonstrado que o domínio PDZ permite o recrutamento de nNOS a núcleos, favorecendo a produção de NO local e indução da biogênese mitocondrial que é um processo complexo consistindo no crescimento e divisão das mitocôndrias pré-existentes que requer a replicação do mtDNA, síntese e importação de proteínas e lipídeos para as mitocôndrias existentes; esse evento é mediado por α -sintrofina, que reside em núcleos de miócitos, funciona como um mediador da translocação de nNOS nuclear. Esta evidência sugere fortemente que a produção nuclear direta de NO poderia estar implicada na regulação da transcrição. Neste trabalho foi mostrado o envolvimento do NO na transcrição mitocondrial em miócitos (Aquilano et al; 2014). Esses achados corroboram com nossa localização nuclear observada de nNOS com e sem localização citoplasmática. As diferenças na localização de nNOS contribui com as muitas funções atribuídas a esta enzima.

Células tipo interneurônio que expressam nNOS foram identificadas em tecidos de todos os casos, tanto na substância cinzenta como na branca. Estruturas que se assemelham a espinhas dendríticas, ambos com e sem varicosidades, e axônios varicosos também foram encontrados. Para determinar a identificação dessas estruturas exige-se o uso de múltiplas marcações de imunohistoquímica e microscopia confocal, que estão atualmente em curso.

Em conclusão, a expressão de nNOS em diferentes tipos de células e estruturas celulares do neocórtex com displasia cortical focal IIB de pacientes que foram submetidos a tratamento cirúrgico para epilepsia mostrado aqui, representa uma primeira abordagem para a identificação de uma base celular para compreender o envolvimento de nNOS na patogênese das crises epiléticas nesta doença.

6. REFERÊNCIAS

- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, 357: 593–615.
- Andre VM, Wu N, Yamazaki I et al (2007) Cytomegalic interneurons: a new abnormal cell type in severe pediatric cortical dysplasia. *J Neuropathol Exp Neurol* 66: 491-504.
- Aoki C, Rhee J, Lubin M, Dawson TM (1997) NMDA – R1 subunit of the cerebral cortex co-localizes with neuronal oxide synthase at pre – and post synaptic sites and spines. *Brain Research*, 750: 25-40.
- Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR (2014) Nuclear Recruitment of Neuronal Nitric-oxide Synthase by α -Syntrophin Is Crucial for the Induction of Mitochondrial Biogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 289: 365-378.
- Babbedge RC, Bland-Ward SL, Hart SL, Moore PK (1993) Inhibition of rat cerebellar nitric oxide synthase by 7 nitroindazole and related substituted indazoles. *Br J Pharmacol*, 110: 225–228.
- Barkovich J, Kuzniecky R, Dobyns W, Jackson G, Becker L, Evrard P (1996) A classification scheme for malformations of cortical development. *Neuropediatrics*, 27:59-63.
- Barkovich AJ, Gerrini R, Kuzniecky RI, Jackson GD, Dobyns WB (2009) A development and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012. *Brain* 135: 1348-1369.
- Bear MF, Kirkwood A. (1993) Neocortical long-term potentiation. *Curr Opin Neurobio*, 3(2):197-202.
- Bentivoglio M, Tassi L, Pech E, Costa C, Fabene PF, Spreafico R (2003) Cortical development and focal cortical dysplasia. *Epileptic Disord*, 5:27–34.
- Blumcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Vinters HV, Palmini A, Jacques TS, Avanzini G, Barkovich AJ, Battaglia G, Becker A, Cepeda C, Cendes F, Colombo N, Crino P, Cross JH, Delalande O, Dubeau F, Duncan J, Gerrini R, Kahane P, Mathern G, Najm I, Ozkara Ç, Raybaud C, Represa A, Roper SN, Salomon N, Schulze-Bonhage A, Tassi L, Vezzani A, Spreafico R (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*, 52: 158-174.
- Bredt DS, Glatt CE, Hwang PM, Fotuhi M, Dawson TM, e Snyder SH (1991) Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron*, 7: 615–624.
- Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven, SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner, SC, Bredt DS (1996) Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell*, 84: 757–767.

Brenman JE, Bredt DS (1997) Synaptic signaling by nitric oxide. *Curr Opin Neurobiol*, 7: 374–378.

Borowicz KK, Luszczycki J, Kleinrok Z, Cuczwara SJ (2000) 7-nitroindazole, a nitric oxide synthase inhibitor, enhances the anticonvulsive action of ethosuximide and clonazepam against pentylenetetrazol-induced convulsions. *J Neural Transm*, 107: 1117–1126.

Chamberlain WA, Prayson RA (2008) Focal cortical dysplasia type II (malformations of cortical development) aberrantly expresses apoptotic proteins. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 16: 471-476.

Chang YE, Jakobi R, McGinty A, Foschi J, Dunn MJ, Sorokin A (2000) Cyclooxygenase 2 promotes cell survival by stimulation of dynein light chain expression and inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity. *Molecular and Cellular Biology*, 22: 8571–8579.

Crane BR, Arvai AS, Ghosh DK, Wu C, Getzoff ED, Stuehr DJ, Tainer JA (1998) Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. *Science*, 279: 2121–2126.

Crino PB, Duhaime C, Baltuch G, White R (2001) Differential expression of glutamate and GABA-A receptor subunit mRNA in cortical dysplasia. *Neurology*, 56: 906–913.

Dawson VL, Dawson TM, Bartley DA, Uhl GR, Snyder, SH (1993) Mechanisms of nitric oxide mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J Neurosci*, 13: 2651–2661.

DeFelipe J (1993) A study of NADPH diaphorase-positive axonal plexuses in the human temporal cortex. *Brain Res* 615: 342-346.

Dimmeler S, Zeiher AM (1997) Nitric oxide and apoptosis: another paradigm for the double-edged role of nitric oxide. *Nitric Oxide*, 1: 275-81.

Egberongbe YI, Gentleman SM, Falkai P, Bogerts B, Polak JM, Roberts GW (1994) The distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the human brain. *Neuroscience*, 59: 561–578.

Farrell MA, De Rosa MJ, Curran JG, Secor DL, Cornford ME, Comair YG, Peacock WJ, Shields WD, Vinters HV (1992) Neuropathologic findings in cortical resections (including hemispherectomies) performed for the treatment of intractable childhood epilepsy. *Acta Neuropathol*, 83: 246–259.

Fauser S, Becker A, Schulze-Bonhage A, et al (2004) CD34 immunoreactive balloon cells in cortical malformations. *Acta Neuropathol*, 108:272-278.

Fauser S, Huppertz HJ, Bast T, et al (2006) Clinical characteristics in focal cortical dysplasia: a retrospective evaluation in series of 120 patients. *Brain*, 129: 1907–1916.

Fertuzinhos S, Krsnik Z, Kawasawa YI, Rasin MR.; Kwan KY, Chen JG, Judas M, Hayashi M, Sestan N (2009) Selective depletion of molecularly defined cortical interneurons in human holoprosencephaly with severe striatal hypoplasia. *Cereb Cortex*, 19; 2196-2207.

Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schawarz P, Gath I, Kleinert H (1994) Nitric oxide synthase isozymes: characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*, 23: 1121-31.

Forstermann U, Mulsch A, Bohme E, Busse R (1986) Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. *Circ Res*, 58: 531–538.

Forstermann U, Sessa WC (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*, 33: 829–837.

Furchgott RF, Cherry PD, Zawadzki JV, Jothianandan D (1984) Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*, 53: 557–573.

Garthwaite J (2008) Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *European Journal of Neuroscience*, 27: 2783–2802.

Garthwaite G, Bartus K, Malcolm D, Goodwin DA, Kollb-Sielecka M, Dooldeniya C, Garthwaite J. (2006) Signaling from blood vessels to CNS axons through nitric oxide. *J. Neurosci*, 26: 7730–7740.

Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R (1988) Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*, 336: 385–388.

Gibb BJ, Garthwaite J (2001) Subunits of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, expressed in rat brain. *European Journal of Neuroscience*, 13: 539–544.

Guerrini R, Dobyns WB (2014) Malformations of cortical development: clinical features and genetic causes. *Lancet Neurol*, 13: 710-726.

Guerrini R, Dobyns W, Barkovich A (2008) Abnormal development of the human cerebral cortex: genetics, functional consequences and treatment options. *Trends Neurosci*, 31: 154–162.

Guerrini R, Parrini E (2010) Neuronal migration disorders. *Neurobiol Dis* 38: 154-166.

Griffith OW, Stuehr DJ (1995) Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol*, 57: 707–36.

Gillardon F., H. Krep, G. Brinker, C. Lenz, B. Bottiger, and K.-A. Hossmann. (1998) Induction of protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase/ cytoplasmic dynein light chain following cerebral ischemia. *Neuroscience*, 84: 81–88.

González-Martínez JÁ, Moddel G, Ying Z et al; (2009) Neuronal nitric oxide synthase expression in resected epileptic dysplastic neocortex. *J Neurosurg*, 110: 343–349.

Hannan AJ, Servottes S, Katsnelson A, Sisodiya S, Blakemore C, Squier M, and Molnár Z (1999) Characterization of nodular neuronal heterotopia in children. *Brain*, 122: 219-238.

Hardiman O, Burke T, Phillips J, Murphy S, O'Moore B, Staunton H, Farrell MA (1988) Microdysgenesis in resected temporal neocortex: incidence and clinical significance in focal epilepsy. *Neurology*, 38: 1041–1047.

Hardingham N, Dachtler J, Fox k (2013) The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7: 1–19.

Jaffrey SR, Snyder SH (1996). PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. *Science*, 274: 774–777.

Katz LC, Shatz CJ (1996) Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science*, 274: 1133- 1138.

Kwan KY, Lan MMS, Johnson MB et al. (2012) Species- dependent posttranscriptional regulation of NOS1 by FMRP in the developing cerebral cortex. *Cell*, 149: 899-911.

Kiss JP, Vizi ES (2001) Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission. *Trends Neurosci*, 24: 211–215.

Kuzniecky R, Garcia J, Faught E, Morawetz R (1991) Cortical dysplasia in temporal lobe epilepsy: magnetic resonance imaging correlations. *Ann Neurol*, 29: 293–298.

Kuzniecky RL and Jackson GD (2008) Malformations of cortical development. *In: Epilepsy*, Jerome Engel Jr. and Timothy A Pedley, Eds. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.

Korzhevskii DE, Otellin VA, Grigorev IP, Petrova ES, Gilerovich EG, Zin'kova NN (2008) Immunocytochemical detection of neuronal NO synthase in rat brain cells. *Neurosci.Behav.Physiol* 38: 835-838.

Lamparello P, Baybis M, Polland J, et al (2007) Developmental lineage of cells types in cortical dysplasia with balloon cells. *Brain*, 130: 2267–2276.

Leite JP, Chimelli L, Terra-Bustamante VC, Costa ET, Assirati JA, Nucci deG, Martins AR (2002) Loss and Sprouting of Nitric Oxide Synthase Neurons in the Human Epileptic Hippocampus. *Epilepsia*, 43: 235–242.

Lent R (2010) Cem bilhões de neurônios. Conceitos fundamentais de neurociência. SP, Atheneu.

Luo CX, Zhu DY (2011) Research progress on neurobiology of neuronal nitric oxide synthase. *Neurosci Bul*, 27: 23-35.

Lois C, Verdugo JMG, Buylly AA (1996) Chain migration of neuronal Precursors. *Science*, 271: 978-981.

MacMicking J, Xie QW, Nathan C (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*, 15: 323–350.

- Madhusoodanan KS, Murad F (2007) NO- cGMP signaling and regenerative medicine involving stem cells. *Neurochem Res*, 32: 681-94.
- Martinian L, Boer K, Middeldorp J, et al (2009) Expression patterns of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-delta in epilepsy-associated lesional pathologies. *Neuropathol appl Neurobiol*, 35: 394–405.
- Martins AR, Zanella CAB, Zucchi FCR, Dombroski TCD, Costa ET, Guethe LM, Oliveira AO, Donatti ALF, Neder L, Chimelli L, De Nucci G, Lee-Ho P, Murad F (2011) Immunolocalization of nitric oxide synthase isoforms in human archival and rat tissues, and cultured cells. *J. Neurosci Methods*, 198: 16-22.
- Martins AR, Dias MM, Vasconcelos TM et al.(1999) Microwave-stimulated recovery of myosin-V immunoreactivity from formalin-fixed, paraffin-embedded human CNS. *J Neurosci Methods*, 92: 25-29.
- Mendes RV, Martins AR, De,Nucci G, Murad F, Soare FA (2001) Expression of nitric oxide synthase isoforms and nitrotyrosine immunoreactivity by B-cell non-Hodgkin's lymphomas and multiple myeloma. *Histopathology*, 39: 172-178.
- Najm IM, Ying Z, Babb T, Mohamed A, Hadam J, LaPresto E, et al (2000) Epileptogenicity correlated with increased N-methyl- D-aspartate receptor subunit NR2A/B in human focal cortical dysplasia. *Epilepsia*, 41: 971–976.
- Noble MA, Munro AW, Rivers SL, Robledo L, Daff SN, Yellowlees LJ, Shimizu T, Sagami I, Guillemette JG, Chapman SK (1999) Potentiometric analysis of the flavin cofactors of neuronal nitric oxide synthase. *Biochemistry*, 38: 16413–16418.
- Ohyu J, Takashima S (1998) Developmental characteristics of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) immunoreactive neurons in fetal to adolescent human brains. *Brain Res*, 110:193–202.
- Palmini A (2000) Disorders of cortical development. *Curr Opin Neurol*, 13: 183-192.
- Palmini A, Andermann E, Andermann F (1994) Prenatal events and genetic factors in epileptic patients with neuronal migration disorders. *Epilepsia*, 35: 965-973.
- Palmini A, Najm I, Avanzini G, Babb T, Guerrini R, Foldvary-Schaefer N, Jackson G, Luders HO, Prayson R, Spreafico R, Vinters HV (2004) Terminology and classification of the cortical dysplasias. *Neurology*, 62: 52-58.
- Rakic P (1988) Specification of cerebral cortical areas. *Science*, 241: 170-176.
- Rakic P (1990) Principles of neural cell migration. *Experientia*, 46: 882-891.
- Rakic P (1995) A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. *Trends Neurosci*, 18: 383-388.
- Rakic P (2007) The radial edifice of cortical architecture: from neuronal silhouettes to genetic engineering. *Brain Research Reviews* 55: 204-219.

- Rapoport RM, Draznin MB, Murad F (1983) Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature*, 306: 174–176.
- Schuman EM, Madison DV (1994) Nitric oxide and synaptic function. *Journal of Neuroscience*, 17: 153–183.
- Schmidt HH, Gagne GD, Nakane M, Pollock JS, Miller MF, Murad F (1992) Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. *J.Histochem.Cytochem.* 40: 1439-1456.
- Shoo B, Jiang J, Wu Q, et al; (2011) The Nuclear Localization of CAPON in Hippocampus and Cerebral Cortex Neurons after Lipopolysaccharide Stimulation. *Neuroimmunomodulation*, 18: 89–97.
- Sisodiya SM, Fause S, Cross JH, Thom M (2009) Focal cortical dysplasia type II: biological features and clinical perspectives. *Lancet Neurol* 8: 830-843.
- Spreafico R, Blumcke I (2010) Focal Cortical Dysplasias: clinical implication of neuropathological classification systems. *Acta Neuropathol.* 120 (3): 359-367.
- Tassi L, Colombo N, Garbelli R, Francione S, La Russo G, Mai K, Cardinale F, Cossu M, Ferrario A, Galli C, Bramerio M, Criterio A, Spreafico R (2002) Focal cortical dysplasia: neuropathological subtypes, EEG, neuroimaging and surgical outcome. *Brain*, 125: 1719-32.
- Taylor DC, Falconer MA, Bruton CJ, Corsellis JA (1971) Focal dysplasia of the cerebral cortex in epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 34: 369-387.
- Valtschanoff JG, Weinberg RJ, Kharazia VN, Schmidt HHHW, Nakane M, Rustioni A (1993) Neurons in rat cerebral cortex that synthesize nitric oxide: NADPH diaphorase histochemistry, NOS immunocytochemistry, and colocalization with GABA. *Neurosci Lett* 157:157–161.
- Ying Z, Gonzales–Martinez J, Tilelli C, Bingaman W, Najn I (2005) Expression of neural stem cell surface marker CD133 in balloon cells of human focal cortical dysplasia. *Epilepsia*, 46:1716–1723.
- Zhou L, Zhu D (2009) Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation and clinical implications. *Nitric oxide* 20: 223-230.