

200207069

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

**CESAR AUGUSTO BUENO ZANELLA**

**EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA ISOFORMA  
NEURONAL DA SINTASE DO ÓXIDO NÍTRICO NO  
NEOCÓRTEX CEREBRAL HUMANO NORMAL E EM  
DISPLASIAS CORTICAIS**

*Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia do Fisioterapeuta Cesar Augusto Bueno Zanella.*

*Campinas, 24 de janeiro de 2002.*

  
*Prof. Dr. Antonio Roberto Martins*  
*- Orientador -*

**CAMPINAS  
2002**

**UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE**

**CESAR AUGUSTO BUENO ZANELLA**

**EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA ISOFORMA  
NEURONAL DA SINTASE DO ÓXIDO NÍTRICO NO  
NEOCÓRTEX CEREBRAL HUMANO NORMAL E EM  
DISPLASIAS CORTICAIS**

*Dissertação de mestrado apresentada  
à Pós-graduação da Faculdade de  
Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas para obtenção  
do título de mestre em Farmacologia*

**PROF. DR. ANTONIO ROBERTO MARTINS**  
**Orientador**

**CAMPINAS**  
**2002**

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	Z16e
V.º	
T.º	47717
P.º	837/02
	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
PREC.º	R\$ 11,00
DATA:	08-02-02
N.º CPD	

CM00163519-9

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP**

Z16e

Zanella, Cesar Augusto Bueno

Expressão imunohistoquímica da isoforma neuronal da sintase do óxido nítrico no neocórtex cerebral humano normal e em displasias corticais / Cesar Augusto Bueno Zanella. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : Antonio Roberto Martins

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Cérebro. 2. Óxido nítrico. I. Antonio Roberto Martins. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.  
III. Título.



UNICAMP

---

## Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

---

**Orientador:**

Prof. Dr. Antonio Roberto Martins

---

**Membros:**

Prof. Dr. Antonio Roberto Martins

*amaria*

Prof. Dr. José Luiz Donato

*José Luiz Donato*

Prof. Dr. Francesco Langone

*Francesco Langone*

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas.

---

**Data: 24/01/02**

---

**A meus pais, Deraldo e Iracema,  
e minha esposa Karina,  
que sempre me incentivaram e  
apoiaram em cada momento**

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Roberto Martins, pela enorme contribuição na minha formação científica e pelo exemplo de dedicação profissional. Sou-lhe imensamente grato pelos valiosos ensinamentos, pela convivência agradável e amizade.

Prof. Dr. Francesco Langone, Prof. Dr. José Luis Donato, Prof. Dr. Edson Antunes, Prof. Dr. João Pereira Leite pela atenção e disponibilidade em participar da avaliação do trabalho, sempre com valiosas sugestões.

Aos Patologistas Dra. Leila Cadão Chimelli e Dr. Luciano Neder Serafini pela contribuição importante na avaliação neuropatológica dos casos coletados e utilizados no trabalho.

Ao Dr. Arthur Cukiert, Cirurgião do Serviço de Neurologia do Hospital Brigadeiro/ São Paulo, por nos ceder casos de heterotopia neuronal, e que foram de valiosa importância no desenvolvimento do trabalho.

Meu reconhecimento à Wanderlei da Cunha Claro e José Waldik Ramon, respectivamente funcionários dos Departamentos de Farmacologia da FCM/UNICAMP e FMRP/USP, pela disponibilidade e prontidão.

À Maria da Penha e demais funcionários do Laboratório de Documentação Científica do HC/Ribeirão Preto, que contribuíram de forma exemplar para o processamento do material fotográfico utilizado.

À Vani M. Corrêa pelos pela disponibilidade e pelos serviços histotécnicos prestados.

Hildeberto Caldo, Fabíola Zucchi, Alina Ozório, Silvia Teixeira, Ludmyla Kandratavicius, Roberta Maia, Elizabete Rosa, Lisa Brinn, Mariano Viapiano, Ana Maria Anselmi, Diva Amábile pelos momentos agradáveis compartilhados no laboratório, pela amizade e colaboração na execução do trabalho.

Aos meus amigos sempre presentes, pela lealdade, companheirismo, e pelos momentos agradáveis de convivência.

Meus avós (*in memorian*), meu sobrinho Matheus, minha irmã Ana Cristina, minha madrinha tia Mara, toda a minha família, às famílias Santilli e Catureli pelos momentos de apoio, amizade e compreensão. Sou-lhes imensamente grato.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao CNPq e a Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA) do Hospital das Clínicas da FMRP pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

“Imaginar é mais importante que saber,  
pois o conhecimento é limitado  
enquanto a imaginação abarca o Universo”  
Albert Einstein

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	
<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>II. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>29</b>
1. Papéis Fisiológicos do NO.....	<b>29</b>
2. Desenvolvimento do Sistema Nervoso.....	<b>31</b>
3. Distúrbios do Desenvolvimento Cortical.....	<b>35</b>
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	<b>43</b>
<b>IV. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>47</b>
1. Casuística.....	<b>47</b>
2. Recuperação da Antigenicidade (AR).....	<b>49</b>
3. Imunohistoquímica.....	<b>50</b>
4. Preparação das Amostras de Homogeneizado de Neocórtex Humano para Western Blot.....	<b>51</b>
5. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida, Sistema Desnaturante/ Western Blot.....	<b>52</b>
<b>V. RESULTADOS</b> .....	<b>57</b>
1. Efeito da Recuperação Antigênica sobre a Imunorreatividade de nNOS em Secções de Córtex Cerebral.....	<b>57</b>
2. Western Blot para Detecção da Expressão de nNOS no Neocórtex Humano Normal.....	<b>57</b>
3. Caracterização Neuropatológica e Imunohistoquímica dos Casos de Displasia Cortical.....	<b>58</b>

3.1. Heterotopias Neuronaes.....	59
3.2. Displasia Cortical Focal.....	60
3.3. Heterotopia Glio-Neuronal.....	61
4. Imunohistoquímica para Detecção de nNOS no Neocórtex Cerebral Humano Normal.....	61
<b>VI. DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>VII. CONCLUSÕES.....</b>	<b>77</b>
<b>VIII. FIGURAS.....</b>	<b>83</b>
<b>IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>117</b>
<b>X. SUMMARY.....</b>	<b>129</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AR:** recuperação antigênica  
**DAB:** diaminobenzidina  
**DC:** Displasia cortical  
**DOI:** densidade óptica integrada  
**EDRF:** fator de relaxamento vascular derivado do endotélio  
**EDTA:** etilenodiaminatetracetato de sódio  
**FMRP:** Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
**GM:** substância cinzenta  
**HE:** hematoxilina e eosina  
**HRP:** peroxidase de rábano  
**IR:** imunorreatividade  
**NO:** óxido nítrico  
**NOS:** sintase do óxido nítrico  
**eNOS;** NOS endotelial  
**iNOS:** NOS induzível  
**nNOS:** NOS neuronal  
**PAGE:** eletroforese em gel de poliacrilamida  
**PMSF:** fluoreto de fenilmetilsulfonila  
**SDS:** dodecil sulfato de sódio  
**SN:** sistema nervoso  
**SNC:** sistema nervoso central  
**SNP:** sistema nervoso periférico  
**TEMED:** N,N,N',N' tetrametilenodiamina  
**Tris:** Tris(hidroximetil)aminometano  
**WM:** substância branca

## **RESUMO**

## RESUMO

A ontogênese do cérebro ocorre através de um programa coordenado de eventos celulares, entre eles, divisão celular, migração neuronal, morte celular seletiva e diferenciação. A interrupção desses processos, ou de um deles, pode provocar anormalidades da arquitetura do córtex cerebral em desenvolvimento e de suas propriedades eletrofisiológicas. Uma manifestação de malformação relacionada ao desenvolvimento cortical é a epilepsia. Entre as lesões estruturais do SNC que causam epilepsia destacam-se as displasias corticais.

No SNC, o NO é um importante neurotransmissor e participa da regulação de diversas funções cerebrais. O NO é sintetizado após ativação ou indução da enzima NOS, e no córtex cerebral ele é produzido sob demanda pela nNOS. No entanto, quando presente em altas concentrações, o NO, assim como o glutamato, podem iniciar uma cascata neurotóxica. Pode, também, ter papel importante na fisiopatologia da epilepsia.

No presente trabalho, realizamos um estudo imunohistoquímico para mostrar a expressão da nNOS em displasias corticais e no córtex cerebral humano normal. Padronizamos um método para recuperação da antigenicidade de secções de tecido de córtex cerebral humano fixados em formalina e embebidos em parafina com tratamento em forno de microondas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 9.5 , e que foi utilizado nos experimentos imunohistoquímicos.

Os córtices displásicos mostraram nNOS-IR em neurônios por toda a espessura do córtex , com predomínio em duas camadas que correspondem às camadas III e V. A intensidade de marcação foi variável e com predomínio de

marcação citoplasmática, embora alguns neurônios mostraram marcação nuclear. Fibras com varicosidade em toda espessura cortical apresentaram intensa nNOS IR.

No córtex cerebral humano normal, neurônios nNOS imunorreativos foram encontrados, preferencialmente, nas camadas mais profundas da substância cinzenta e na substância branca. A camada I não mostrou neurônios nNOS imunorreativos. A nNOS-IR de corpos celulares neuronais teve predomínio de marcação citoplasmática. Um número expressivo de fibras apresentaram nNOS-IR por toda a espessura do córtex.

Os tecidos displásicos utilizados em nossos estudos estão associados com epilepsia farmacologicamente intratável. Assumindo que a nNOS-IR detectada nos neurônios corresponda à forma cataliticamente ativa da nNOS, nós sugerimos que a liberação do NO por estes neurônios poderia ativar neurônios alvo aditivamente provocando uma hipersincronização, e eventualmente disparando uma descarga epiléptica.

## **INTRODUÇÃO**

## I. Introdução

O óxido nítrico (NO) é um mensageiro difusível e reativo presente nos sistemas nervoso (CHRISTOPHERSON e BREDT, 1997), vascular (FURCHGOTT e ZAWADSKI, 1980) e imune, com afinidade por heme-proteínas (DE MONTELLANO *et al*, 1998). O NO é encontrado em abundância nos Sistemas Nervoso Central (SNC) e Periférico (SNP), bem como em outros órgãos e sistemas (CHRISTOPHERSON e BREDT, 1997).

No SNC, o NO age como um neurotransmissor/neuromodulador não convencional e participa de processos comportamentais, de memória e aprendizagem (CHRISTOPHERSON e BREDT, 1997), sinaptogênese (YAN e RIBAK, 1997), controle da circulação cerebral e plasticidade sináptica (SCHMIDT e WALTER, 1994). Como o NO não é estocado em vesículas nem recaptado ou inativado enzimaticamente como neurotransmissores clássicos, sua síntese e concentração são diretamente dependentes da atividade da enzima sintase do NO (NOS). Três isoformas de NOS tem sido identificadas, a saber: NOS I (NOS neuronal; nNOS) e NOS III (NOS endotelial; eNOS) são isoformas constitutivas expressas em subpopulações neuronais e células endoteliais, respectivamente (Bredt e Snyder, 1994); NOS II (NOS induzida; iNOS) é induzida por polissacarídeos, citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, e agentes infecciosos, independentemente dos níveis de cálcio-calmodulina (NATHAN e HIBBS, 1991). As NOS catalizam a síntese de NO a partir da L-arginina numa reação dependente de O<sub>2</sub> e NADPH (MARLETTA, 1994).

No neocórtex cerebral o NO é produzido sob demanda pela enzima constitutiva nNOS, e pode ser tóxico em situações onde ocorra excesso de produção. A indução inapropriada da NOS no cérebro e outros tecidos, claramente medeia danos em diversas doenças. Certos danos neuronais, incluindo aqueles associados a certas neurotoxinas, são devidos ao excesso de glutamato liberado, que age nos receptores NMDA sinápticos causando toxicidade (CHRISTOPHERSON e BREDT, 1997).

O desenvolvimento neocortical pode ser grosseiramente considerado como resultado de processos de proliferação, migração, neuritogênese, diferenciação e morte celular programada de precursores neuronais e neurônios, eliminação de sinapses, arborização dendrítica e remodelagem cortical. Anormalidades destes processos resultam em anormalidades da arquitetura cortical e de suas propriedades eletrofisiológicas. A displasia cortical (DC) é definida como um conjunto de alterações do desenvolvimento do neocórtex associada com uma mudança das características morfológicas corticais e com prováveis fatores múltiplos etiológicos, incluindo fatores genéticos e influência do meio. As DC são caracterizadas por áreas de córtex anormal que tem sido correlacionadas a epilepsias farmacologicamente intratáveis. A gênese das displasias corticais permanece pouco conhecida, as hipóteses patogênicas correntes estão centradas em distúrbios da produção de fatores de crescimento e de moléculas de adesão celular, em alterações do terreno migratório, do citoesqueleto e da matriz celular (YACHNIS *et al.*, 1994; MISCHEL *et al.*, 1995; DIAS *et al.*, 1997).

Tendo em vista o interesse de nosso laboratório em estudar o desenvolvimento neural e seus distúrbios associados a patologias neurológicas, propomos determinar a expressão de componentes moleculares do sistema NO-érgico e moléculas relacionadas em displasias corticais humanas, e no neocórtex cerebral humano normal pareados para região, idade e sexo.

## **REVISÃO DA LITERATURA**

## **II. Revisão da Literatura**

### **1. Papéis fisiológicos do NO**

FURCHGOTT e ZAWADZKI mostraram em 1980 que a estimulação do endotélio liberava uma substância capaz de relaxar a musculatura lisa dos vasos sanguíneos. Esta substância foi denominada fator de relaxamento vascular derivado do endotélio (EDRF). Mais tarde foi identificada pelos grupos liderados por Ignarro e Moncada como sendo o óxido nítrico (NO).

O NO surgiu como um importante mensageiro nos sistemas nervoso central e periférico podendo ser sintetizado em vertebrados e mamíferos. Quimicamente simples, esta molécula pode agir de uma maneira específica controlando funções vitais como o tonus vascular, a contração de órgãos gastrointestinais, ou neurotransmissão via ativação da guanilato ciclase solúvel (MURAD, 1994). Têm-se sugerido que o NO participa da regulação de diversas funções cerebrais, como aprendizado e memória, comportamento emocional e, regulação do processamento de estímulos dolorosos. Pode, também, ter papel importante na neurotoxicidade e na fisiopatologia da epilepsia. Ele é formado a partir da L-arginina após ativação ou indução da enzima sintase do óxido nítrico (NOS). Existem três isoformas distintas da NOS que diferem em suas estruturas e funções (ANDREW e MAYER, 1999) . A nomenclatura numérica usada é baseada na ordem histórica da purificação e isolamento do cDNA das isoformas. Outros autores usam termos descritivos baseados nas células ou tecidos dos quais as enzimas são originadas, ou pelas suas expressões constitutiva ou induzida (FORSTERMANN e KLEINERT, 1995). NOS endotelial (eNOS ou NOS III) e NOS neuronal (nNOS ou NOS I) são enzimas

expressas constitutivamente, dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , embora a eNOS possa ser ativada de uma forma independente de  $\text{Ca}^{2+}$  (AYAJIKI *et al*, 1996). NOS induzível (iNOS ou NOS II) é expressa em níveis altos somente após a indução por citocinas ou outros agentes inflamatórios, e sua atividade independe do aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  (ANDREW e MAYER, 1999). A NOS I depende da calmodulina, proteína citoplasmática com grande afinidade pelo cálcio, para sua ativação e está frequentemente associada a receptores de glutamato do tipo NMDA. A ativação desses receptores causa influxo de íons cálcio, os quais, ligando-se a calmodulina, ativam a NOS I. A biossíntese do NO envolve duas etapas de oxidação da L-arginina para L-citrulina, e concomitante produção de NO. A reação consome 1.5 mol de NADPH, e dois mol de  $\text{O}_2$  por mol de L-citrulina formada. O mecanismo envolve uma hidroxilação inicial da L-arginina, levando à formação do composto intermediário  $\text{N}^G$ -hidroxi-L-arginina, que também pode agir como um substrato para o NO. Na etapa final há formação de L-citrulina e NO (MARLETTA, 1993).

Modelos de difusão do NO sugerem que sua esfera fisiológica de influência pode estender-se por um raio de até  $100\mu\text{m}$  desde o seu local de origem e influenciar aproximadamente 2 milhões de sinapses. O NO é um neurotransmissor que não é estocado em vesículas sinápticas ou liberado por exocitose pela despolarização de membranas, mas é sintetizado sob demanda. A atividade de neurotransmissores convencionais termina em cada mecanismo de recaptção ou degradação enzimática. Em contraste, a atuação do NO termina quando ele reage quimicamente com um substrato (WOOD e GARTHWAITE, 1994). Dada a esfera potencial de

influência do NO não surpreende que ele esteja envolvido em uma variedade de funções incluindo neurotransmissão não-adrenérgica não-colinérgica (NANC) em sistemas periféricos, no controle local do fluxo sanguíneo cerebral e no controle da plasticidade sináptica e sinalização sensorial (GARTHWAITE e BOULTON, 1995). No entanto, quando presente em altas concentrações, o NO, assim como o glutamato, podem iniciar uma cascata neurotóxica. A ativação de receptores NMDA pelo glutamato e o subsequente aumento dos níveis de cálcio intracelular podem iniciar muitas formas de neurotoxicidade (DAWSON e DAWSON, 1996).

## **2.Desenvolvimento do sistema nervoso**

O córtex cerebral humano é talvez o mais notável produto da evolução do SNC, não somente porque ele contém dois terços da massa neuronal e cerca de três quartos de todas as nossas sinapses, mas também porque é a estrutura que em termos de organização está mais afastada das outras espécies. Ele deriva da vesícula telencefálica do prosencéfalo embrionário. As células neuroepiteliais primitivas do tubo neural embrionário são as precursoras de neurônio e glia do sistema nervoso central. Estas células sofrem muitos ciclos de proliferação na zona ventricular no primeiro trimestre e quando saem do ciclo celular abandonam a zona ventricular e migram centrifugamente através da zona intermediária para formar a estrutura laminada do córtex cerebral. Este processo ocupa da oitava à décima quarta semana pós-fertilização no desenvolvimento humano (COOP e HARDING, 1999).

Um dos mais notáveis aspectos do córtex cerebral é seu parcelamento em áreas citoarquitetônicas. Estas áreas são regiões definidas do córtex com características celulares, bioquímicas, fisiológicas e de conexões distintas. O modo como a imensa população de neurônios que constitui o neocórtex cerebral humano é gerada de progenitores no ventrículo cerebral e está distribuída por camadas definidas de áreas citoarquitetônicas distintas podem ser explicados pela hipótese da unidade radial, onde cada unidade proliferativa dentro da zona ventricular origina uma coluna ontogenética correspondente no córtex cerebral (RAKIC, 1988).

Uma propriedade básica de neurônios imaturos é sua capacidade migratória, desde o local de sua divisão mitótica final em centros proliferativos do encéfalo para posições específicas que irão ocupar em uma determinada estrutura do Sistema Nervoso (SN) adulto. A aquisição exata da posição de um neurônio, conseguida através de processos de migração ativa, afeta a morfologia, conectividade e função celulares. De fato, a grande maioria dos neurônios do SN de vertebrados em desenvolvimento são gerados em lugares que são significativamente diferentes daqueles em que residem no encéfalo adulto. O processo chamado migração, denota o deslocamento do corpo celular neuronal desde zonas proliferativas após sua última divisão para seu destino no encéfalo adulto. Em muitas estruturas laminares do encéfalo de mamíferos, como o cérebro, neurônios gerados mais tardiamente passam por outros gerados mais precocemente. Assim sendo, a migração celular neuronal pode ser considerada uma “necessidade biológica” que permite a comunicação entre os neurônios formados mais precocemente e aqueles

formados mais tardiamente durante os estágios críticos do desenvolvimento, antes de estabelecerem suas conexões sinápticas definitivas (RAKIC, 1990)

Os neuroblastos precoces migrando formam uma estrutura transitória, a pré-placa, entre a superfície pial e a zona intermediária, que subsequentemente torna-se dividida em camadas superficial e profunda pelos neuroblastos migrando tardiamente para formar a placa cortical. Muitos neurônios da pré-placa são perdidos por morte celular programada durante o desenvolvimento fetal. O componente profundo da pré-placa, chamado subplaca, desempenha um papel de guia axonal servindo como um alvo intermediário para os axônios dos neurônios talâmicos durante sua subida para sinapses com neurônios da placa cortical. A camada superficial da pré-placa forma a zona marginal de células esparsas. Os neurônios de Cajal-Retzius, que caracterizam a zona marginal, são os remanescentes dos neurônios da pré-placa. A migração de neuroblastos para formar a pré-placa, e subsequentemente a placa cortical, envolve guia pelos processos das células gliais radiais as quais no estágio do desenvolvimento, estendem-se da zona ventricular para a superfície pial, migrando tangencialmente e assumindo sua posição definitiva na placa cortical. A placa cortical desenvolve-se como uma estrutura invertida, onde os neurônios que são gerados mais precocemente são localizados mais profundamente e os neurônios gerados mais tardiamente ocupam posições mais superficiais, e estabelecem arborização dendrítica e contato sináptico (SIDMAN e RAKIC, 1973; COOP e HARDING, 1999).

A dissolução das estruturas transitórias, como a subplaca, zonas ventricular e subventricular, é paralelamente acompanhada pelo aumento da espessura das camadas corticais como um resultado progressivo da diferenciação de elementos

gliais e neuronais, arborização de dendritos e axônios, entrada de fibras e sinaptogênese (KOSTOVIC e RAKIC, 1990).

Crescimento e maturação do córtex cerebral são eventos complexos que são controlados por muitos genes, alguns dos quais morfogeneticamente específicos. As etapas importantes da corticogênese ocorrem no epitélio pseudoestratificado da zona ventricular, como o controle molecular da proliferação e número celular. Proliferação e morte celular são eventos morfogenéticos que determinam o número de neurônios na placa cortical. A complexidade dos eventos celulares ocorrendo durante o desenvolvimento pré-natal do SNC o faz particularmente vulnerável para um grande número de condições adversas à ontogênese. Os efeitos destes insultos podem provocar lesões destrutivas ou distúrbios citoarquitetônicos.

No SNC de vertebrados, a proliferação celular ocorre no epitélio pseudoestratificado, em estruturas transitórias a saber: zonas proliferativas ventricular e subventricular. O epitélio ventricular contém um mosaico de células proliferando, onde o destino de cada uma delas é determinado pelo seu programa genético. A proliferação celular também está presente na zona intermediária e na subplaca, duas estruturas transitórias da parede telencefálica. Nestas regiões células mitóticas são observadas até o fim da gestação, e são os prováveis precursores de células gliais, comprometidas para diferenciarem-se em astrócitos ou para a formação de oligodendrócitos (KENDLER e GOLDEN, 1996).

A apoptose ou morte celular programada é um processo determinado geneticamente e reconhecido como um evento do desenvolvimento da neurogênese de vertebrados (COWAN *et al.*, 1984). Ela pode representar um mecanismo para

selecionar o número de células que serão compromissadas para diferenciarem-se em linhagens gliais, ou para refinar o número de neurônios que irão compor definitivamente a placa cortical. Isto provavelmente ocorra na subplaca durante o longo estadio estacionário (20-35 GW) , quando ela atinge o maior tamanho e recebe axônios em crescimento antes de atingirem seu alvo definitivo. Mas também ocorre nas zonas proliferativas ventricular e subventricular (SIMONATI *et al*, 1999).

### **3. Distúrbios do desenvolvimento cortical**

O desenvolvimento normal do córtex cerebral ocorre através de um programa coordenado de eventos celulares, incluindo divisão celular, migração, morte celular seletiva e diferenciação (HANNAN *et al*, 1999). Malformações neocorticais têm sido relacionadas com desordens da migração neuronal que tem variavelmente sido classificadas com respeito à morfologia ou provável etiologia. Neurônio e glia proliferam nas zonas ventricular e subventricular, migram e sofrem diferenciação específica para formar a placa cortical laminada. A interrupção desses processos, especialmente da migração celular, pode levar a uma variedade de malformações sintomáticas (PALMINI *et al*, 1992). Duas formas de migração neuronal principais tem sido descritas durante o desenvolvimento neural: 1. Migração tangencial ou neurofílica, caracterizada por uma migração de células neuronais paralelamente à superfície pial e perpendicularmente às fibras da glia radial. Muitos neurônios em várias regiões do encéfalo migram em uma direção que não coincide com o das fibras gliais sem estabelecer nenhuma relação permanente e , parecem aderir preferencialmente à superfície dos axônios vizinhos (RAKIC, 1990); e 2. Migração

radial ou gliofílica, caracterizada pela migração de neurônios pós mitóticos em contato com fibras da glia radial, que proporcionam um substrato permissivo para o deslocamento, perpendicularmente à superfície pial. Esta forma de migração é particularmente notável durante a formação das estruturas laminares como os córtices cerebral, cerebelar e hipocampal (HATTEN e MASON, 1990; KOMURO e RAKIC, 1998). No processo de migração neuronal, algumas características ainda permanecem desconhecidas. KOMURO e RAKIC (1995) mostraram no cerebelo que o movimento das células neuronais a partir da camada granular externa (EGL) em direção à sua posição final na camada granular interna (IGL) depende do influxo de  $Ca^{++}$  para o interior da célula granular migratória. A velocidade do movimento de células granulares através das camadas do cerebelo depende de ambos, ativação dos receptores de membrana NMDA pelo glutamato e influxo de  $Ca^{++}$  através de canais do tipo N (KOMURO e RAKIC, 1993). Sabe-se que as células granulares exibem migração saltatória através da camada molecular guiadas pelas fibras de Bergmann e que há uma correlação entre a frequência e a amplitude de variação da concentração intracelular de  $Ca^{++}$  e a migração da célula granular cerebelar (KOMURO e RAKIC, 1995). Sendo os terminais de fibras musgosas fonte potencial de liberação de glutamato, esta pode alterar os níveis de  $Ca^{++}$  intracelularmente em células granulares pela modificação do influxo de  $Ca^{++}$  através da membrana. O bloqueio da atividade do receptor de glutamato NMDA diminui a velocidade do movimento das células granulares, e um excesso de ativação do receptor NMDA resulta na interrupção da migração neuronal *in vivo* (KOMURO e RAKIC, 1998). Outra possibilidade para a variação da velocidade de migração das células

granulares é a liberação de GABA pelos terminais da célula de Golgi tipo II. A aplicação de GABA modifica o comportamento migratório de neurônios corticais, dependente da dose, pela mudança dos níveis intracelulares de  $Ca^{++}$ . Assim sendo, os neurotransmissores liberados de fibras pré-sinápticas, como as fibras musgosas e axônios das células de Golgi, podem regular a velocidade bem como a duração da migração de células granulares pela modificação dos níveis intracelulares de  $Ca^{++}$ . Além destas possibilidades, sinais intrínsecos também podem induzir a mudança na forma e no modo de migração das células granulares em diferentes compartimentos do córtex cerebelar (KOMURO e RAKIC, 1998).

Pesquisadores tem argumentado por um sistema de classificação das malformações do neocórtex cerebral baseados no momento da ocorrência do provável insulto intrauterino. RAKIC (1988) propôs uma classificação das malformações do cérebro de acordo com a hipótese da unidade radial; as malformações que ocorrem durante as primeiras 6 semanas do desenvolvimento e tem uma diminuição do número de unidades radiais; por exemplo, lisencefalia e paquigiria. Malformações ocorrendo após 6 semanas podem ser consideradas como anormalidades com um número normal de unidades radiais mas com um número anormal de neurônios dentro das colunas ontogenéticas ou com anormalidades de sua migração. SARNAT (1992) também classificou desordens da migração neuronal com respeito ao momento do dano. Ele propõe que existem defeitos de migração precoce, ocorrendo usualmente dentro das primeiras 8-20 semanas *in utero* e resultando largamente de anormalidades genéticas. Defeitos da migração ocorrendo após 20 semanas de gestação e durante a vida pós-natal são classificadas como

defeitos migracionais tardios, que ele propõe serem usualmente adquiridos. Uma manifestação principal de malformação relacionada ao desenvolvimento cortical é a epilepsia (PALMINI *et al.*, 1991). Estudos histológicos de vários casos indicaram muitas anormalidades em vários níveis, incluindo mudança na estrutura e composição das células, na distribuição neuronal e na composição e organização cortical (HANNAN *et al.*, 1999).

A displasia cortical (DC) é definida como um conjunto de alterações do desenvolvimento do neocórtex associado com uma mudança das características morfológicas corticais e com prováveis fatores múltiplos etiológicos, incluindo fatores genéticos e influências do meio. O desenvolvimento neocortical pode ser grosseiramente considerado como resultado de uma sobreposição de processos de proliferação, migração, diferenciação e morte celular programada de precursores neuronais e neurônios, eliminação de sinapses, arborização dendrítica e remodelagem cortical. Anormalidades em qualquer um destes processos resultam em anormalidades da arquitetura cortical e de suas propriedades eletrofisiológicas. O balanço dinâmico refinado entre conexões excitatórias e inibitórias provavelmente garante a variação na ativação de configurações diferentes de neurônios corticais, a sinapse, que foi identificada como a provável base para a função cortical (VON DER MALSBERG e SCHNEIDER, 1986; SINGER e GRAY, 1995). O balanço é destruído nas epilepsias e provavelmente, em caminhos diferentes, em outras patologias frequentes como a demência e a esquizofrenia. Comparada a outras lesões estruturais do SNC que causam epilepsia, a DC tende a afetar pacientes mais

jovens, tem um prognóstico menos favorável e mostra um envolvimento mais frequente do lobo extra-temporal.

DC pode ser caracterizada com base em nove anormalidades microscópicas específicas e facilmente identificáveis: 1-desorganização laminar cortical; 2-presença de neurônios isolados na substância branca; 3-neurônios na camada laminar cortical; 4-restos persistentes da camada de células granulares subpial; 5-heterotopia glioneuronal marginal; 6-polimicrogiria; 7-heterotopia neuronal da substância branca; 8-citomegalia neuronal com anormalidades citoesqueléticas associadas; e 9-“balloon cell” (MISCHEL *et al.*, 1995).

A literatura sobre a associação entre epilepsia e displasia cortical, embora seja vasta e complexa, é muito pouco clara e necessita de modelos de descrição mais precisos e padronizados. A epilepsia tem sido determinada em muitas condições diferentes, incluindo encefalopatias congênitas, desordens metabólicas, anomalias da migração neuronal, sequelas de danos cerebrais perinatais, tumores, infecções, síndromes paquigiria-agiria, síndromes megalencefálicas e trauma. É impossível estabelecer um denominador comum para epilepsia a partir de um grupo tão heterogêneo de desordens. No entanto, muitas destas desordens podem causar, direta e/ou indiretamente, alterações no desenvolvimento do neocórtex que podem, no curso da maturação subsequente, resultar em displasia cortical adquirida e disfunções eventuais (MARIN-PADILLA, 1999). Os dados apresentados evidenciam a oportunidade de estudar a possível atuação do NO no neocórtex cerebral displásico e normal.

## **OBJETIVOS**

### **III. Objetivos**

1. Padronizar um método para recuperação da antigenicidade da nNOS em secções de tecido fixadas em formalina e embebidas em parafina;
2. Estudar a expressão imunohistoquímica da isoforma neuronal da sintase do óxido nítrico e de moléculas relacionadas em displasias corticais visando correlacionar distúrbios de desenvolvimento e expressão de componentes do sistema NO-érgico;
3. Estudar a expressão imunohistoquímica e molecular da isoforma neuronal da sintase do óxido nítrico no neocórtex cerebral humano normal no período pós-natal pareados para região cortical, idade e sexo com os casos de displasia cortical, de modo a serem usados como controle.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

## IV. Materiais e Métodos

### 1. Casuística

No presente trabalho foram utilizados blocos de tecido cortical humano provenientes de autópsias e biópsias de rotina realizadas nos Departamentos de Patologia e de Cirurgia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, e no Serviço de Neurocirurgia do Hospital Brigadeiro de acordo com protocolos aprovados pela Comissão de Ética da FMRP-USP. No estudo das displasias corticais foram utilizados casos de biópsias caracterizados na Tabela 1 e previamente analisados pelos patologistas Dra. Leila Maria C. Chimelli e Dr. Luciano Neder Serafini.

**Tabela 1 . Caracterização dos casos de Displasia Cortical utilizados neste estudo.**

Caso	Idade	Córtex	Tipo de Displasia Cortical
01	1 ano	Frontal/ Temporal	DC Focal, tipo Taylor
02	2 anos	Temporal	DC Focal, tipo Taylor
03	3 anos	Frontal / Temporal	DC e Heterotopia
04	4 anos	Parietal / Occipital	DC Focal, tipo Taylor
05	4 anos	Frontal	DC Focal, tipo non- Taylor
06	11 anos	nd	DC Focal, tipo non-Taylor
07	12 anos	Parietooccipital	DC extensa associada a DNT
08	18 anos	Parietooccipital	DC extensa com Gliose
09	19 anos	Temporal	DNT
10	19 anos	Temporal	Focos de Heterotopia e Microdisgenesia com Gliose
11	19 anos	Temporal	Displasia Cortical com Gliose
12	21 anos	Temporal / Occipital	Heterotopia
13	23 anos	Frontal	Heterotopia pré-motora
14	26 anos	Temporal	Heterotopia Glio-neuronal
15	29 anos	Temporal	Heterotopia Glio-neuronal
16	30 anos	Frontal	DNT com áreas de DC
17	45 anos	Temporal	Heterotopia neuronal
18	nd	nd	Heterotopia nodular
19	nd	Frontal	DC extensa
20	nd	nd	DC

**Abreviaturas:** nd = dados não disponíveis; DC, displasia cortical; DNT, tumor neuroepitelial desembrioplásico

Como controles para as displasias corticais usamos tecidos (córtices frontal, parietal, temporal e occipital) de pacientes pareados para região cortical, idade e sexo (Tabela 2), sem história de patologia neurológica e que não apresentaram evidências de alterações neuropatológicas

**Tabela 2. Caracterização dos casos de autópsia utilizados no ensaio imunohistoquímico**

Caso	Idade	Córtices	IPM	Diagnóstico
21	1 ano	Frontal, Parietal, Temporal, Occipital	3h 30m	Anemia aguda
22	1 ano	Frontal, Parietal, Temporal, Occipital	3h	Hemorragia pulmonar
23	1 ano	Frontal, Parietal, Temporal, Occipital	4h	Choque; estado pós-operatório
24	1 ano	Frontal, Parietal, Temporal, Occipital	6h	Broncopneumonia bilateral
25	1 ano	Frontal, Parietal, Temporal, Occipital	6h 26m	Cardiopatía congênita
26	2 anos	Frontal, Parietal, Temporal, Occipital	4h	Pós-operatório (Tetralogia de Fallot)
27	4 anos	Temporal, Occipital	9h	Cardiomiopatia restritiva
28	7 anos	Frontal, Parietal, Temporal, Occipital	6h 45m	Broncopneumonia
29	9 anos	Frontal, Parietal, Occipital	3h 20m	Insuficiência cardíaca congestiva
30	15 anos	Frontal, Parietal, Temporal, Occipital	Nd	Lesão alveolar difusa pulmonar
31	18 anos	Temporal, Occipital	7h 45m	Edema pulmonar agudo
32	18 anos	Frontal, Parietal, Temporal, Occipital	2h 30m	<i>Flutter</i> atrial
33	19 anos	Frontal, Parietal, Temporal, Occipital	4 h	Choque hepático
34	21 anos	Frontal, Parietal, Temporal, Occipital	8h	Insuficiência cardíaca
35	24 anos	Temporal	2h 40m	Hérnia amigdaló cerebral
36	33 anos	Frontal, Parietal, Temporal, Occipital	4h 05m	Broncopneumonia
37	35 anos	Temporal	6h	Septicemia
38	37 anos	Frontal, Parietal, Temporal, Occipital	3h	Pneumonia lobar à esquerda
39	37 anos	Frontal, Parietal, Temporal, Occipital	4h 40m	Pneumonia aspirativa bilateral
40	38 anos	Frontal, Parietal, Temporal, Occipital	3h 30m	Broncopneumonia bilateral
41	39 anos	Frontal, Parietal, Temporal, Occipital	5h	Choque séptico
42	43 anos	Temporal	4h 40m	Edema pulmonar agudo
43	43 anos	Frontal, Parietal, Temporal, Occipital	4h	Insuficiência renal crônica
44	44 anos	Frontal, Parietal, Temporal, Occipital	3h	Síndrome consumptiva a esclarecer

**Abreviaturas:** nd = dados não disponíveis; h, horas; m, minutos

Os blocos de tecido foram fixados em formalina 10% (v/v) por 2-4 semanas. A seguir, as regiões de interesse foram dissecadas e procedeu-se a desidratação em etanol (Merck, grau P.A), diafanização em xileno (Merck, grau P.A) e inclusão em

parafina (Merck, Histosec). Secções de 5 e 8  $\mu\text{m}$  de espessura foram obtidas por microtomia (Micrótomo Leica, modelo RM 2065), montadas em lâminas gelatinizadas ou silanizadas, incubadas em estufa a 58° C por 4 horas e armazenadas a 4° C até o momento de uso. Para avaliação microscópica do tecido e posterior seleção as secções de 8  $\mu\text{m}$  (em lâminas silanizadas) foram coradas pelo método de hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram analisadas utilizando lupa Olympus (SZH10) e microscópio óptico Olympus (modelo BX 60).

Para Western blot foram retirados fragmentos de neocórtex humano (córtices frontal, parietal, temporal e occipital) de casos provenientes de autópsia e caracterizados na Tabela 3.

**Tabela 3. Caracterização dos casos utilizados para SDS-PAGE, western blot e ensaio imunohistoquímico**

Caso	Idade	Córtices	IPM	Diagnóstico
45	6 anos	Frontal, Parietal, Temporal e Occipital	7h 25m	Cardiopatia congênita complexa
46	16 anos	Frontal, Parietal, Temporal e Occipital	3h	Broncopneumonia confluyente
47	23 anos	Frontal, Parietal, Temporal e Occipital	5h	Leucemia linfóide aguda
48	47 anos	Frontal, Parietal, Temporal e Occipital	4h	Choque hipovolémico

Abreviaturas: h, horas; m, minutos

## 2. Recuperação da antigenicidade (AR)

Foram utilizados, para padronização da recuperação antigênica (AR) em ensaio imunohistoquímico, blocos de tecido fixados em formalina 10% (v/v) e embebidos em parafina de casos provenientes de autópsia (Tabelas 2 e 3).

Utilizamos uma modificação do procedimento de recuperação de antigenicidade (AR) descrito por MARTINS *et al.* (1999) e ZANARDO *et al.* (1997). Um aparelho de microondas (Sharp RB-4A33) foi utilizado em potência nominal máxima. As lâminas com as secções de tecido desparafinizadas foram tratadas por

20 minutos em jarros de Coplin contendo duas diferentes soluções: uma alcalina, tampão Tris-HCl 50 mM, pH 9.5 e outra ácida, tampão citrato de sódio 10 mM, pH 6.0 . Uma vez que o número e a posição dos jarros podem influenciar a temperatura, padronizamos três jarros contendo o mesmo volume de solução, posicionados simetricamente.

### **3.Imunohistoquímica**

As secções tissulares foram desparafinizadas, hidratadas, e tratadas com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% em volume em tampão PBS para bloquear a atividade da peroxidase endógena.

A recuperação antigênica foi realizada conforme procedimento descrito acima. Após resfriadas até a temperatura ambiente, as secções foram incubadas em tampão Tris-Glicina 0,1 M pH 7.4, por 30 minutos. Em seguida, foram bloqueadas com tampão de bloqueio [ tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7.4 contendo: soro de jumento 15% (v/v), leite desnatado em pó 5% (w/v), NaCl 0,45 M e Triton X-100 0,3% (v/v)] por 4-5 horas, para bloquear sítios de ligação inespecífica dos anticorpos.

A reação imunohistoquímica foi realizada utilizando-se os anticorpos primários: coelho anti-nNOS (Transduction Laboratories), camundongo anti-neurofilamento (DAKO), coelho anti-GFAP (DAKO) diluídos em tampão de bloqueio a 1:25, 1:250, 1:500 respectivamente. Os controles foram feitos substituindo o anticorpo primário por tampão de bloqueio. A incubação ocorreu por cerca de 14 horas e as secções foram lavadas posteriormente com tampão de lavagem [ tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7.4 contendo NaCl 0,45 M e Triton X-100 0,3% (v/v)]. A

detecção dos anticorpos primários foi realizada utilizando-se os anticorpos secundários diluídos com tampão de bloqueio a 1:100. Na sequência, as seções foram incubadas com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Kit Elite Vector). A presença do complexo foi visualizada por reação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 0,4 mg/ml de 3,3'-diaminobenzidina (DAB), por 12 minutos.

As seções foram desidratadas com etanol, clareadas com xileno e montada entre lâmina e lamínula com Permount (Fischer). Todas as operações foram realizadas a temperatura ambiente.

#### **4.Preparação das amostras de homogeneizado de neocórtex humano para Western blot**

Foram retirados fragmentos de tecido, provenientes de autópsia de rotina realizada no Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, e congelados imediatamente em nitrogênio líquido sendo, em seguida, armazenados a -70° C. Um dia antes de serem homogeneizados, os fragmentos foram transferidos à temperatura de -25° C. Após serem pesados, os fragmentos foram homogeneizados em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7.5, contendo inibidores de protease: etilenodiaminatetracetato de sódio (EDTA) 10 mM, Benzamidina 1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 0,3 mM e Aprotinina 0,3 μM; e β-mercaptoetanol 2mM. A homogeneização foi realizada em copo Potter-Elvehjem, com pistilo de teflon com 10 excursões do pistilo, em banho de gelo. Uma alíquota do homogeneizado foi separada para dosagem de proteínas. Outra amostra, para SDS-

PAGE, foi diluída 3:1 (v/v) em tampão desnaturante de Laemmli [Tris-HCl 2 M, pH 6.8, contendo sacarose 10 % (p/v), dodecil sulfato de sódio (SDS) 10 % (p/v) e  $\beta$ -mercaptoetanol 3,6 M], agitada vigorosamente e fervida por três minutos.

A determinação da quantidade de proteínas nas amostras foi feita pelo método de LOWRY *et al.* (1954), utilizando a soro albumina bovina como padrão. A concentração de proteínas nas amostras foi determinada por interpolação na curva-padrão obtida por regressão linear usando Programa GraphPad Prisma v.2a.

## **5. Eletroforese em gel de poliacrilamida, sistema desnaturante /**

### **Western blot**

As eletroforeses foram realizadas de acordo com o procedimento descrito por LAEMMLI e FAVRE (1973). As amostras foram aplicadas em géis com camadas de empilhamento a 5 % [Tampão Tris-HCl 0,125 M, pH 6.8, contendo N,N,N',N' tetrametilenodiamina (TEMED) 0,125 % (v/v), persulfato de amônio 0,065 % (p/v) e acrilamida-bisacrilamida 5 % (p/v)] e de separação a 7 % [Tampão Tris-HCl 0,375 M, pH 8.8, contendo TEMED 0,125 % (v/v), persulfato de amônio 0,065 % (p/v) e acrilamida-bisacrilamida 7 % (p/v)]

Foram aplicadas 30  $\mu$ g de proteína do homogeneizado total e das frações sobrenadante e particulada de encéfalo humano em cada raia do gel de empilhamento, controle positivo da nNOS (lisado de pituitária de rato/Transduction Laboratories), e os padrões de peso molecular foram aplicados nas raias laterais e central dos géis. Como padrões de peso molecular foram utilizados: cadeia pesada

da miosina II de músculo esquelético de coelho (205 kDa);  $\beta$ -galactosidade de *Escherichia coli* (116 kDa); fosforilase b de músculo de coelho (97,4 kDa); albumina de soro bovino (66,7 kDa); ovoalbumina (45 kDa); anidrase carbônica de eritrócito bovino (29 kDa) (kit SDS-6H, Sigma).

A corrida das amostras foi realizada em cuba de eletroforese com uma corrente de 10 mA por gel. Quando as amostras entraram no gel de separação a corrente foi aumentada para 15 mA por gel e mantida até o final da corrida.

Em seguida os géis foram retirados das placas e as amostras de proteína foram eletrotransferidas do gel para membrana de nitrocelulose pelo método de TOWBIN *et al.* (1979). O gel foi lavado com tampão Tris 25 mM e Glicina 190 mM, pH 8.3, contendo SDS 0,1 % (p/v) e etanol 18% (v/v), e montado em contato com a membrana de nitrocelulose. O conjunto foi colocado em uma cuba de transferência com o mesmo tampão usado para lavagem do gel. As amostras foram eletrotransferidas do gel para a membrana de nitrocelulose sob voltagem constante de 30 volt/gel por 3 horas e 30 minutos e, em seguida, corada com solução de Ponceau 5% (p/v) diluído em ácido tricloroacético 3% (p/v) por 10 minutos e lavada com solução descorante para determinação das bandas de proteínas utilizadas como padrões de peso molecular. Após a secagem a membrana de nitrocelulose foi lavada com tampão de lavagem e incubada com tampão de bloqueio [ tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7.4, contendo NaCl 0,45 M, Triton X-100 0,3 % (v/v) e soro de cabra 20% (v/v)] por 2,5 horas para bloquear os sítios de ligação inespecíficos, seguida por incubação com anticorpo anti-nNOS (Transduction Laboratories) diluído

1:400 em tampão de bloqueio por 3 horas, sob agitação contínua. Após lavagens em tampão de lavagem a membrana foi incubada em tampão de bloqueio por 30 minutos e, posteriormente, com o anticorpo secundário conjugado HRP anti-coelho (Promega) diluído 1:5000 (v/v) em tampão de bloqueio por 1 hora. Em seguida revelada com um kit de quimioluminescência (ECL, Amershan Pharmacia). O controle negativo foi obtido pela omissão do anticorpo primário.

## **RESULTADOS**

## V. Resultados

### **1.Efeito da AR sobre a imunorreatividade de nNOS em secções de córtex cerebral humano**

A imunorreatividade da nNOS foi recuperada de córtex cerebral humano fixado por 2-4 semanas em formalina a 10 % (v/v) tratando-se as secções tissulares com soluções tampões Tris-HCl 50 mM, pH 9.5 e citrato de sódio 10 mM, pH 6.0, por 20 min. A imunomarcção mais forte de neurônios e processos neuronais foi obtida com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 9.5 (Fig. 1 A), enquanto que a recuperação com tampão citrato de sódio 10 mM, pH 6.0 foi menos acentuada (Fig. 1 C). O tratamento das secções tissulares com tampões Tris-HCl ou citrato sem forno de microondas não levou a recuperação detectável da nNOS IR (Fig. 1 B).A secção de tecido utilizada como controle, pela omissão do anticorpo primário, não mostrou imunorreatividade (Fig. 1 D). Com base nos resultados acima padronizamos processos de AR para a nNOS IR em secções tissulares de córtex cerebral usando tratamento Tris-HCl/forno de microondas por 20 minutos. Esta metodologia foi usada para padronizar com sucesso as condições de AR para os outros anticorpos aqui usados e será objeto de publicação de nosso Laboratório.

### **2.Western blot para detecção da expressão de nNOS no neocórtex humano normal**

Em Western blot, o controle positivo da nNOS mostrou banda com peso molecular aparente de cerca de 165 kDa (Fig. 2, cabeça de seta). As bandas na

Figura 2 correspondentes às amostras de homogeneizado total de neocórtex cerebral humano mostraram características de corrida eletroforética semelhantes à do controle positivo, estando posicionadas no gel em altura que corresponde à peso molecular aparente de 165 kDa. O anticorpo anti-nNOS também mostrou a marcação de algumas bandas de peso molecular aparente menor que 160 kDa, provavelmente provenientes de degradação proteica.

Segundo os valores de densidade óptica integrada (DOI) obtidos, a intensidade de marcação da banda de peso molecular aparente correspondente a banda de nNOS no neocórtex cerebral foi variável entre os córtices, sendo expressa de forma mais intensa no córtex occipital e menos intensa no córtex parietal.

### **3.Caracterização neuropatológica e imunohistoquímica dos casos de displasia cortical**

Em nosso estudo, pacientes com diagnóstico de epilepsia farmacologicamente intratável com idade entre 2 e 45 anos (Tabela 1) foram avaliados clinicamente e por vídeo-EEG, EEG intraoperatório e por técnicas de imagem de alta resolução (NMR, PET-SCAN), e foi estabelecido o diagnóstico de displasia cortical com localização da área epileptogênica na região displásica, com confirmação intraoperatória seguida por “lesionectomia”. Neste trabalho documentamos a displasia cortical focal tipo Taylor, e as heterotopias neuronal e glio-neuronal marginal, por serem caracteristicamente provocadas por desordens da migração neuronal. Os casos utilizados como controle (Tabelas 2 e 3) foram pareados para idade, sexo e região cortical. As secções de tecido de córtex displásico mostraram, de uma maneira geral,

uma desorganização da laminação cortical e uma indefinição do limite entre a substância branca e cinzenta.

### **3.1.Heterotopias Neuronais**

Casos de heterotopia neuronal com características distintas foram analisados. A Figura 3 A mostra uma heterotopia com um “córtex duplo” característico. Nota-se que esta heterotopia tem aspecto de córtex no meio da substância branca subcortical, inclusive com aspecto de giros. A área delimitada na Figura 3 A foi utilizada para análise imunohistoquímica. A secção de tecido corada por HE (Fig. 3 B) mostra numerosos neurônios heterotópicos na região indicada sem organização cortical aparente. Os neurônios nNOS positivos (Fig. 4 A e B) mostram marcação citoplasmática e do núcleo, e estão distribuídos por todo o córtex heterotópico com aparente desorganização da laminação cortical. Notar a presença de um grande número de fibras com varicosidade nNOS-IR (Fig. 4 A e B). O controle foi obtido omitindo-se o anticorpo primário não exibiu imunomarcação (Fig. 4 C) As formas HM e L de neurofilamento foram detectadas apenas em fibras (Fig. 5 C). Nota-se na região da heterotopia numerosas fibras neurofilamento-positivas direcionadas para o córtex normal adjacente (Fig. 5 D). A imunohistoquímica com anticorpo anti-GFAP na região assinalada do córtex heterotópico não mostrou marcação de astrócitos (Fig. 5 A). Entretanto, astrócitos bem marcados foram detectados em outras regiões desta heterotopia, reforçando o aspecto de “córtex duplo” (Fig. 5 B). Outro caso documentado neste trabalho mostra as características de uma heterotopia extensa (Fig. 6 A). A secção de tecido corada pelo método de HE mostra a septação da

região heterotópica deste caso (Fig. 6 B) e a presença de grupos de neurônios heterotópicos na substância branca (Fig. 6 C). A figura 7 A caracteriza uma heterotopia neuronal, com presença de nódulos heterotópicos subependimários e calcificação no nódulo heterotópico e na substância branca. Observa-se o alinhamento de neurônios na substância branca (Fig.7.B).

### **3.2.Displasia Cortical Focal**

A displasia cortical focal tipo Taylor descrita por TAYLOR *et al* (1971) é caracterizada por uma desorganização focal da laminação cortical (Fig 8 A ) e pela presença de neurônios grandes citomegálicos, inclusive “dark neurons” (Fig. 8 C ) e “baloon cell” (Fig. 8 B ). A nNOS IR foi detectada predominantemente em neurônios de pequeno e médio tamanhos (Fig. 9 B), essencialmente em toda a espessura cortical, predominando entretanto em duas camadas que correspondem à camadas III e V (Fig. 9 C e D). Neurônios no limite entre as substâncias branca e cinzenta também apresentaram nNOS IR (Fig. 9 D). A intensidade de marcação foi muito variável, desde “Golgi-like” a pouco intensa e com predomínio de marcação citoplasmática. Poucos neurônios com intensidade baixa de marcação apresentaram marcação nuclear. Documentamos uma intensa expressão de nNOS IR em fibras varicosas em toda espessura cortical, especialmente na camada molecular (Fig. 9 A). Nota-se que há dendritos com comprimento maior que 400  $\mu\text{m}$  (Fig. 9 C, setas) orientados em direção à lâmina I. Um número apreciável de neurônios grandes, marcados de modo “Golgi-like” foi identificado na substância branca cortical, em

número 2 a 3 vezes maior que o detectado nos córtices controle (não documentado neste relatório). Neurônios grandes localizados na região dos “dark neurons” foram fortemente marcados pelo anticorpo anti neurofilamento (Fig.10A), mas não para GFAP (Fig. 10B). A marcação para GFAP confirmou o diagnóstico de gliose.

### **3.3.Heterotopia glio-neuronal marginal**

A heterotopia glio-neuronal marginal apresenta-se como uma massa de tecido neuroglial saliente através da pia e dentro do espaço subaracnóide (botão glial, Fig. 11 A). Na região do botão glial poucos neurônios são positivos para o anticorpo anti-nNOS (Fig. 11 B e C). A marcação imunohistoquímica para neurofilamento foi restrita a fibras na região do botão glial (Fig. 11 D), assim como nas regiões próxima e adjacentes ao botão glial (notar aglomerado de fibras neurofilamento positivas; Fig. 12 C). A região do botão glial apresentou fibras GFAP positivas (Fig. 11 E), embora nas regiões próxima e adjacente ao botão glial células com aspecto semelhante a neurônios exibiram GFAP IR (Fig. 12 D)

### **4.Imunohistoquímica para detecção de nNOS no neocórtex**

#### **humano normal**

A análise da região do neocórtex corada com HE e documentadas neste trabalho mostra a organização da laminação cortical (Fig. 13). A expressão de neurônios nNOS-IR no córtex cerebral humano foi semelhante nos córtices frontal, parietal, temporal e occipital. Nos córtices analisados, o padrão de marcação apresentou algumas diferenças com relação à distribuição dos neurônios nNOS-IR

nas distintas camadas e das demais estruturas marcadas positivamente para nNOS. Neurônios exibindo nNOS-IR foram encontrados, preferencialmente, nas camadas mais profundas da substância cinzenta (camada III a camada VI) e na transição entre as substâncias branca e cinzenta (Fig. 14). A camada I não mostrou neurônios nNOS imunopositivos (Fig. 14 A). O neocórtex cerebral mostrou uma grande variabilidade de tipos celulares nNOS-IR. Neurônios piramidais pequeno nNOS imunopositivos predominaram na camada III (Fig. 15 A). Neurônios piramidais grandes (Fig 15 B) foram detectados caracteristicamente nas camadas mais profundas, especialmente na camada V, embora a camada VI tenha mostrado neurônios com aspecto de neurônio piramidal nNOS-IR. Neurônios bipolares (Fig. 15 C) e granulares (não documentado) puderam ser notados nas camadas mais profundas do córtex, e ocasionalmente na camada II. Na camada VI foram detectados neurônios neurogliaformes nNOS imunopositivos (Fig. 15 E). Neurônios com marcação “Golgi-like” foram encontrados na camada VI e substância branca adjacente (Fig 15 F).

A nNOS-IR de corpos celulares neuronais foi predominantemente citoplasmática, mas há marcação nuclear em alguns neurônios na camada III do córtex cerebral. Notou-se neurônios com marcação nuclear e citoplasmática ao mesmo tempo e neurônios com marcação exclusivamente nuclear (Fig. 16). Encontramos um número expressivo de fibras com varicosidade, a maioria das quais orientada paralelamente à superfície pial (Fig. 17 A). Fibras orientadas em outros sentidos também foram encontradas (Fig. 17). A transição substância branca/cinzenta mostrou fibras com varicosidades orientadas paralelamente à

superfície pial e em outros sentidos, e na substância branca também foram encontradas fibras com varicosidade positivas (Fig. 17 B).

Foi notada uma aparente diferença no número de neurônios que expressam nNOS nas distintas camadas corticais. Aparentemente há um número maior de neurônios nNOS imunopositivos nos primeiros anos de vida, e nos córtices occipital e frontal.

Nos procedimentos imunohistoquímicos, as secções tissulares usadas para detecção da nNOS-IR foram acompanhadas por secções adjacentes usadas como controle, onde foi omitido o anticorpo primário. As secções controle não mostraram imunorreatividade (resultado não documentado).

## **DISCUSSÃO**

## **VI. Discussão**

A formalina tem sido muito utilizada em histopatologia, sendo que muitos dos critérios para diagnóstico patológico tem sido estabelecido pela observação de secções de tecido fixados em formalina e embebidos em parafina, corados com hematoxilina e eosina e imunomarcados para detecção de epitopos específicos. Por esta razão, embora existem muitos outros fixadores, alguns superiores para determinados ensaios imunohistoquímicos, nenhum tem superado a formalina no uso geral.

Estudos bioquímicos da reação química entre proteína e formalina por FRAENKEL-CONRAT e colaboradores (1947) mostraram que a hidrólise das ligações cruzadas é limitada para certas cadeias de aminoácidos, como imidazol e indol, mas que estas ligações cruzadas podem ser revertidas por aquecimento a temperatura alta ou tratamento com soluções fortemente alcalinas. As ligações cruzadas são uma forma de modificação química da proteína (WONG, 1991), que pode ser definida como um processo envolvendo a união de dois componentes moleculares por ligação covalente provocada pelos fixadores de tecido. O processo de fixação do tecido tem sido dividido em duas etapas: uma reação primária de adição entre amino e um aldeído (formalina por exemplo) ou cetona (acetona por exemplo), acompanhada por uma reação secundária de condensação. Ambos, aldeído e cetona, são compostos carbonilados e podem reagir com grupos amino de proteínas para formar bases de Schiff (WONG, 1991). Este conceito formou a base para o desenvolvimento de técnicas de recuperação antigênica (AR) a partir de 1991 (SHI, 1991).

SUURMEIJER e BOON (1993) propuseram que a AR levaria a quebra das ligações cruzadas provocadas pela formalina entre epitopos e proteínas, propiciando melhor penetração do anticorpo e acesso facilitado aos epitopos. Em contrapartida, CATTORETTI *et al.* (1993) sugerem que alguns antígenos ou atividade enzimática endógena do tecido pode ser perdida após o tratamento da AR. Para entender os mecanismos da AR, a primeira etapa pode ser o estudo das alterações na estrutura tri-dimensional das proteínas causadas pela fixação do tecido em formalina, uma vez que o reconhecimento antígeno-anticorpo é geralmente dependente da estrutura tri-dimensional da proteína.

As estruturas secundária, terciária e quaternária das proteínas são dependentes da estrutura primária ou da sequência de aminoácidos. Em geral, se a estrutura primária da proteína permanece intacta é possível recuperar sua conformação tri-dimensional original através de um sistema de recuperação ótimo. Na imunohistoquímica, os anticorpos reconhecem epitopos específicos localizados em uma configuração espacial particular nas moléculas de proteína (BARLOW *et al.*, 1986). Sendo assim, uma mudança na conformação da proteína causada pela fixação em formalina pode mascarar a antigenicidade do tecido. O método de AR pode provocar uma modificação da estrutura da proteína induzida pelo aquecimento a temperatura alta e restabelecer a estrutura tri-dimensional da proteína na sua condição nativa, ou muito próximo daquele estado (SHI *et al.*, 1997).

Em contrapartida, alguns estudos tem demonstrado que se uma secção de tecido fixada em formalina mostrou imunomarcacão satisfatória sem AR, ela pode tornar-se pior após o tratamento da AR, embora o contrário também possa ser

verdadeiro (MACDONALD *et al.*, 1995; TESCH *et al.*, 1995). Isto pode significar que se uma estrutura antigênica é resistente à fixação com formalina, sem modificação após a fixação, ela pode ser modificada pelo aquecimento. Sendo assim, a imunorreatividade pode ser pior após a AR pelo aquecimento a menos que a estrutura antigênica seja resistente também ao aquecimento.

É necessário estudar a estrutura da proteína, particularmente a estrutura antigênica sobre várias condições, congelado, após fixação em formalina, e após tratamento da AR, para entender o exato mecanismo da AR. Com base neste estudos técnicas efetivas de AR podem ser desenvolvidas.

A imunorreatividade pobre para nNOS nas secções de tecido humano fixados em formalina e embebidos em parafina levou-nos a desenvolver um método de tratamento em microondas que nos permitiu uma qualidade apurada na imunolocalização da nNOS no córtex humano normal e em displasias corticais. Enquanto as secções de tecido que não foram tratadas com microondas não mostraram imunorreatividade para nNOS, as secções tratadas com microondas apresentaram recuperação da antigenicidade do tecido, especialmente as secções tratadas com tampão Tris-HCl 50 mM pH 9.5.

As displasias corticais, de uma forma geral, são constituídas de anormalidades microscópicas distintas e específicas, resultantes de alterações nos processos de desenvolvimento cortical em diferentes janelas espaço-temporais. Displasia cortical focal é um distúrbio precoce do desenvolvimento ocorrendo conjuntamente ao tempo da última divisão mitótica quando os fenótipos neuronais estão sendo especificados. Heterotopia neuronal e polimicrogiria resultam de eventos

em um período intermediário do desenvolvimento neural humano, entre 10 e 24 semanas de gestação, quando ocorre a migração ativa de neuroblastos. As lesões de microdisgenesia cortical, distúrbio da laminação cortical, heterotopia glioneuronal marginal, persistência de uma camada de células granulares subpiais, neurônios na camada molecular e neurônios heterotópicos isolados na substância branca são vistos como anormalidades do desenvolvimento cortical mais tardio. Existe correlação entre a frequência dos danos e os três grupos de lesões (HONAVAR e MELDRUM, 1997; SPREAFICO *et al.*, 1999). Tem-se tentado graduar a severidade das lesões displásicas. MISCHEL *et al.* (1995) propuseram um sistema de graduação das lesões baseado na hipótese que os aspectos microscópicos refletem os eventos que estão ocorrendo dentro de uma janela temporal discreta durante o desenvolvimento do córtex cerebral. Sua sistematização é usada para classificar displasias corticais em lesões resultantes de distúrbios do desenvolvimento precoce, intermediário e tardio (que correlacionam, respectivamente, com displasia cortical severa, moderada e branda). “Baloon cells” e citomegalia neuronal representam distúrbios do desenvolvimento precoce, enquanto heterotopia neuronal e presença de camada de células granulares subpial representa eventos intermediários. Heterotopia glioneuronal marginal, neurônios na camada molecular cortical e neurônios heterotópicos na substância branca refletem eventos gestacionais tardios. Desorganização laminar cortical, característica específica de displasia cortical, sugere uma falha do processo de desenvolvimento-evento tardio.

Em nossos resultados mostramos que os neurônios nNOS positivos são distribuídos de um modo esparsos por todo o córtex displásico, embora tenha sido

detectada uma marcação mais intensa nas camadas mais profundas e na substância branca. Sendo assim, o córtex displásico, caracterizado pela ausência da organização laminar, mostra uma quantidade elevada de neurônios nNOS-IR em toda a espessura do córtex, que poderiam estar influenciando diretamente na produção e concentração elevada de NO e íon superóxido no meio. Alguns papéis fisiopatológicos no sistema nervoso central estão sendo atribuídos à atuação do NO no meio, incluindo distúrbios relacionados ao desenvolvimento. Anormalidades nos processos de desenvolvimento podem resultar em alterações da arquitetura cortical e de propriedades eletrofisiológicas (MISCHEL *et al.*, 1995). A síntese de NO conjuntamente com íon superóxido poderiam estar formando espécies reativas que estariam interferindo na atuação das proteínas envolvidas em processos de desenvolvimento. A presença de neurônios gigantes neurofilamento-positivos mostrada em nossos resultados sugere que estes elementos celulares não completaram seu processo de diferenciação. Sua associação com desorganização da laminação cortical sugere que estes neurônios tenham sofrido distúrbio migratório. Esta interpretação de nossos achados está em acordo com o de SPREAFICO *et al.* (1999). A natureza destas células é ambígua, uma vez que elas podem expressar marcadores neuronais e gliais (COTTER *et al.*, 1999; VINTERS *et al.*, 1992) indicando que eles são parcialmente indiferenciados. Em nosso estudo estas células foram GFAP-negativas. Entretanto, elas poderiam ser vimentina-positivas e GFAP-negativas. Esta interpretação indica a pesquisa de reatividade para vimentina, um marcador de células da linhagem glial que é expresso mais precocemente que GFAP.

A escassez de trabalhos que mostrem a distribuição de neurônios e estruturas do córtex cerebral que expressam nNOS-IR nos incentivou à pesquisar e mostrar, por meio de resultados imunohistoquímicos, um padrão de distribuição que nos permita comparar com o padrão de distribuição que foi encontrado nos casos com displasia cortical. Embora MATSUMOTO *et al.* (1993) tenham sugerido o uso de NADPH-diaphorase (NADPH-d) como um marcador para neurônios NOS, GONZALES-HERNANDEZ *et al.* (1996) mostraram não ser confiável a utilização de NADPH-d, visto que esta reação é dependente do processo de fixação. Geralmente é aceito que NADPH-d detecta enzima associada com moléculas NOS, mas a marcação de estruturas neuronais por esta técnica não representa necessariamente neurônios positivos para nNOS. Muitas células positivas para a atividade NADPH-d de fato carecem de nNOS. Esta reação pode não ser específica o bastante como um marcador positivo para neurônios nNOS-imunopositivos.

A distribuição de neurônios nNOS-imunopositivos no córtex cerebral humano não apresenta diferenças entre os hemisférios esquerdo e direito como mostrou nossos resultados e como foi mostrado por EGBERONGBE *et al.* (1994), além de ser parecida com a distribuição da atividade da nNOS mostrada em ratos por BREDT *et al.* (1990). Em nossos resultados ficou evidente a grande variabilidade de tipos neuronais que expressam anticorpo anti-nNOS no neocórtex, contrastando com os resultados obtidos por YEW *et al.* (1999), que mostraram que a grande maioria dos neurônios nNOS imunopositivos era piramidais de tamanho grande. RAKIC (1988) demonstrou que nos estágios mais tardios da corticogênese há predominância de divisão assimétrica, o que foi confirmado por NOCTOR *et al.* (2001) que mostraram,

em estágios tardios da corticogênese, que células gliais podem ser precursores de neurônios que irão ocupar a placa cortical. Esta é uma hipótese que poderia explicar a grande variabilidade de neurônios no neocórtex. Há também uma variação no tamanho dos neurônios relacionado com a camada que cada um ocupa no córtex cerebral. Os neurônios piramidais pequenos que expressam nNOS estão localizados, preferencialmente, na camada III mas podem aparecer em outras camadas mais profundas do córtex. Os neurônios piramidais maiores nNOS imunopositivos foram detectados nas camadas V e VI, e na transição entre as substâncias branca e cinzenta. Neurônios com marcação Golgi-like multipolares e bipolares de tamanho grande foram encontrados na substância branca, e raramente em camadas da substância cinzenta. O número de neurônios que expressam nNOS nos primeiros anos de vida parece ser grande e pode estar relacionada com a importância do NO para os estágios finais de diferenciação celular (KALB e AGOSTINI, 1993; OHYU e TAKASHIMA, 1998).

Além do NO que é produzido no cérebro através de uma reação de oxidação que envolve a conversão da L-arginina para L-citrulina catalisada pela enzima nNOS, também pode ser formado o íon superóxido, dependendo da concentração de tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>) no meio, e posteriormente peroxinitrito. O peroxinitrito é o produto da reação entre o NO e o íon superóxido e induz uma série de modificações oxidativas das proteínas (ISCHIROPOULOS *et al.*, 1998). Esta propriedade da enzima é consequência da sua natureza dimérica, onde as duas subunidades são capazes de atuar independentemente (GORREN *et al.*, 1997). Normalmente, o dímero da nNOS contém uma subunidade com BH<sub>4</sub> acoplado ao sítio específico de

ligação e outra subunidade livre de BH<sub>4</sub>, provocado por uma diferença na afinidade entre os sítios de ligação para BH<sub>4</sub>. Somente em concentrações altas de BH<sub>4</sub> (superiores a 1 μM) as duas subunidades poderão ter BH<sub>4</sub> acoplado ao seu sítio de ligação específico e a nNOS promoverá a biossíntese do NO, com síntese mínima do íon superóxido (ANDREW e MAYER, 1999; KOTSONIS *et al.*, 2000). Sendo assim, nossos resultados imunohistoquímicos de neurônios que expressam nNOS no neocórtex cerebral humano não indicam que estes estarão sintetizando apenas NO, mas que dependendo da concentração de BH<sub>4</sub> no meio poderiam estar sendo sintetizadas quantidades variáveis de íon superóxido conjuntamente.

Os tecidos displásicos utilizados em nossos estudos estão associados com epilepsia severa em crianças e adultos, e relacionados com desordem da migração neuronal. Podem ser pensados como resultantes de malformações caracterizadas por mal posicionamento e falha da diferenciação de neurônios da substância cinzenta cortical. Assumindo que a nNOS imunorreatividade detectada nos neurônios das camadas mais profundas corresponda à forma cataliticamente ativa da enzima nNOS, nós sugerimos que a liberação do NO por estes neurônios poderia ativar neurônios alvo aditivamente, possivelmente via guanilato ciclase solúvel, provocando uma hipersincronização, e eventualmente disparando uma descarga epiléptica.

## **CONCLUSÕES**

## **VII. Coclusões**

Demonstramos que a imunorreatividade da nNOS de córtex cerebral humano fixado em formalina foi recuperada tratando-se as secções tissulares com soluções tampão Tris-HCl 50 mM, pH 9.5 e citrato de sódio 10 mM, pH 6.0 em forno de microondas por 20 minutos. A maior intensidade de recuperação da antigenicidade foi obtida com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 9.5 que foi utilizado em todos os experimentos imunohistoquímicos.

Nas heterotopias neuronais, neurônios nNOS imunopositivos estão distribuídos por todo o córtex heterotópico com aparente desorganização cortical.

Nas displasias corticais tipo Taylor, a nNOS imunorreatividade foi detectada em toda a espessura do córtex cerebral, predominando nas camadas III e V.

Nas heteropias glio-neuronal marginal, poucos neurônios apresentaram nNOS imunorreatividade na região do botão glial.

O córtex cerebral humano normal, utilizado como controle, mostrou neurônios nNOS imunopositivos nas camadas mais profundas da substância cinzenta e na substância branca. Foi detectada uma grande variabilidade de tipos celulares nNOS-IR. A camada I não apresentou neurônios nNOS-IR.

Em ambos os córtices, displásico e normal, a nNOS-IR de corpos celulares neuronais foi predominantemente citoplasmática, embora alguns neurônios apresentassem marcação nuclear.

Um grande número de fibras com varicosidades nNOS-IR foi detectada por toda a espessura dos córtices displásico e normal, orientadas em vários sentidos.

## **FIGURAS**

**Figura 1. Recuperação da imunorreatividade de nNOS em secções de neocórtex humano.** Secções de córtex cerebral foram incubadas com o anticorpo anti-nNOS. A recuperação da antigenicidade foi obtida em secções tratadas com microondas por 20 minutos em tampão Tris-HCl 50 mM pH 9.5 (A) e citrato de sódio 10 mM pH 6.0 (C), mas não em secções incubadas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 9.5 sem tratamento com microondas (B). D, controle negativo onde foi omitida a incubação com o anticorpo primário. A intensidade de marcação mais forte foi obtida em tampão Tris-HCl 50 mM pH 9.5. Aumento original A, B, C e D 33x.

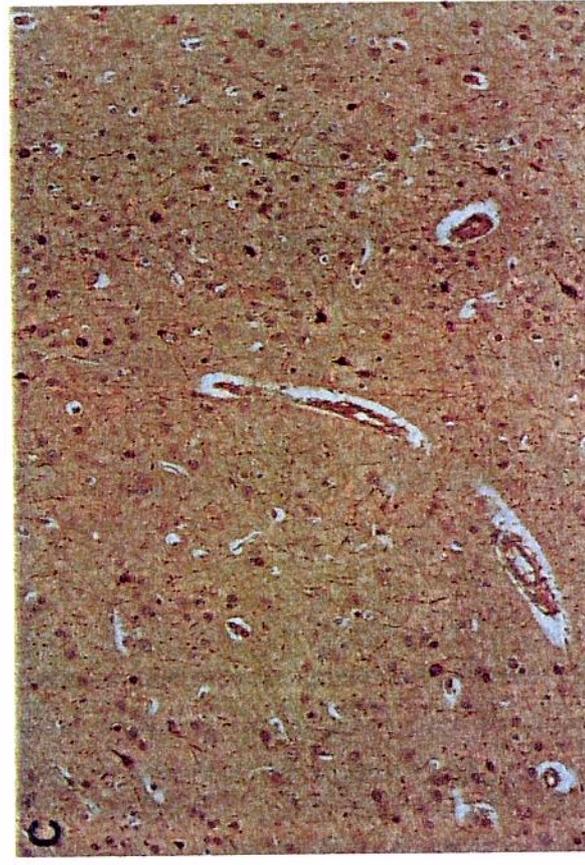
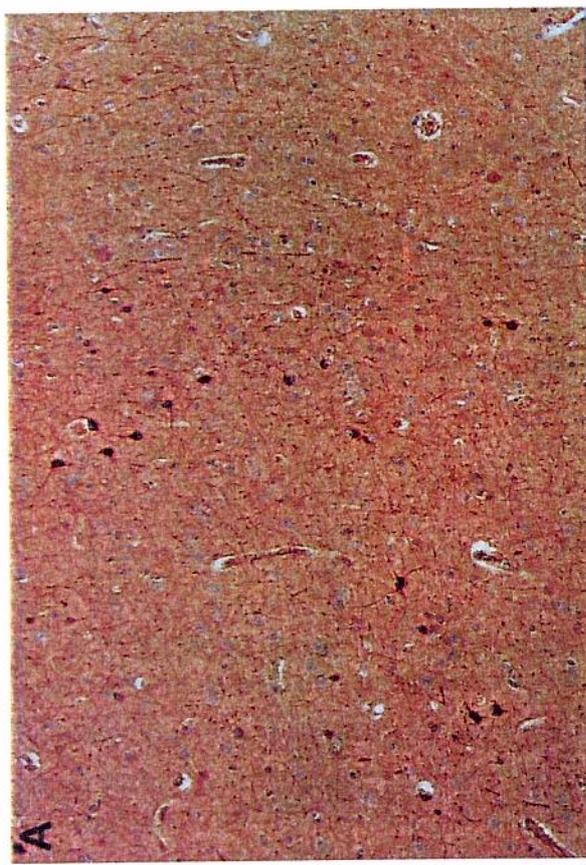
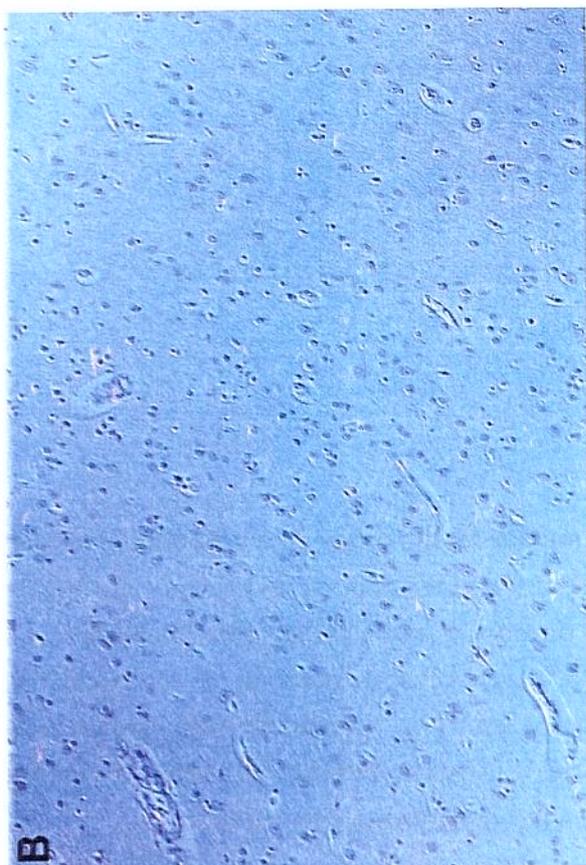


Figura 1

**Figura 2. Especificidade do anticorpo anti-nNOS (Transduction) utilizando imunoblot.** Imunoblot demonstrando a especificidade do anticorpo anti-nNOS, visualizando uma banda na altura de 160 kDa (seta) correspondente ao peso molecular da nNOS e bandas de menor peso molecular. Raias 1 a 4 foram aplicadas amostras de córtex frontal, raias 5 a 8 foram aplicadas amostras de córtex parietal, raias 9 a 12 foram aplicadas amostras de córtex temporal e raias 13 a 16 foram aplicadas amostras de córtex occipital dos casos da tabela 3 respectivamente. +, controle positivo da nNOS. -, controle negativo da nNOS onde foi omitida a incubação com o anticorpo primário anti-nNOS.

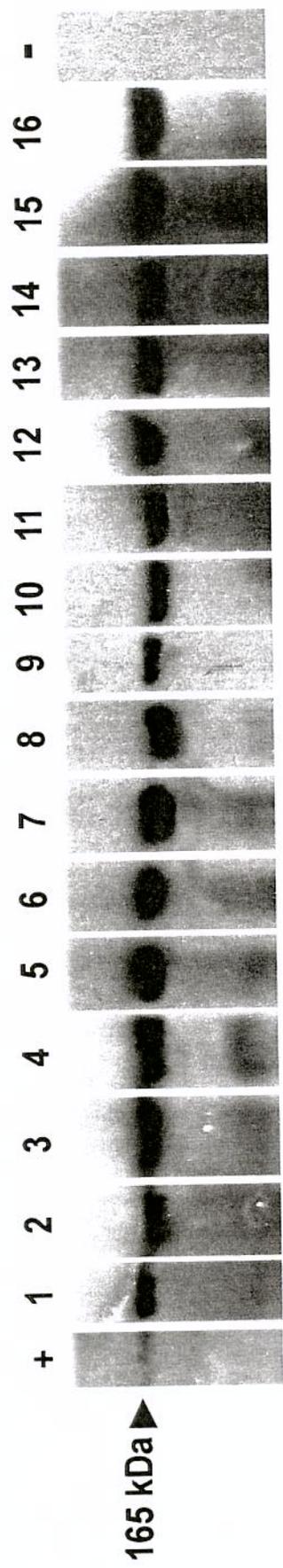


Figura 2

**Figura 3. Heterotopia Neuronal, “síndrome do córtex duplo”.** **A**, córtex occipital mostrando uma heterotopia neuronal em banda, conhecida como “síndrome do córtex duplo”. Notar o aspecto “em vírgula” da heterotopia; a área delimitada foi utilizada para as reações imunohistoquímicas. **B**, coloração por HE mostrando neurônios heterotópicos e aparente desorganização da laminação cortical. Barra 50  $\mu$ m. GM: substância cinzenta; WM: substância branca.

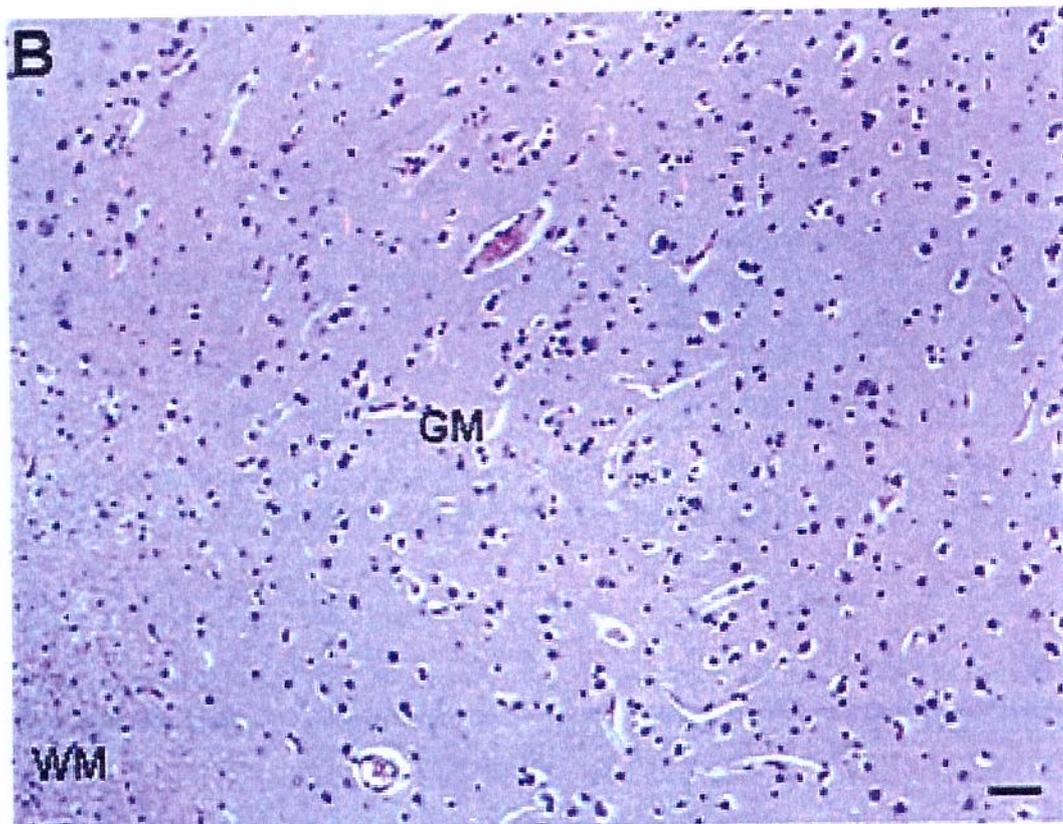
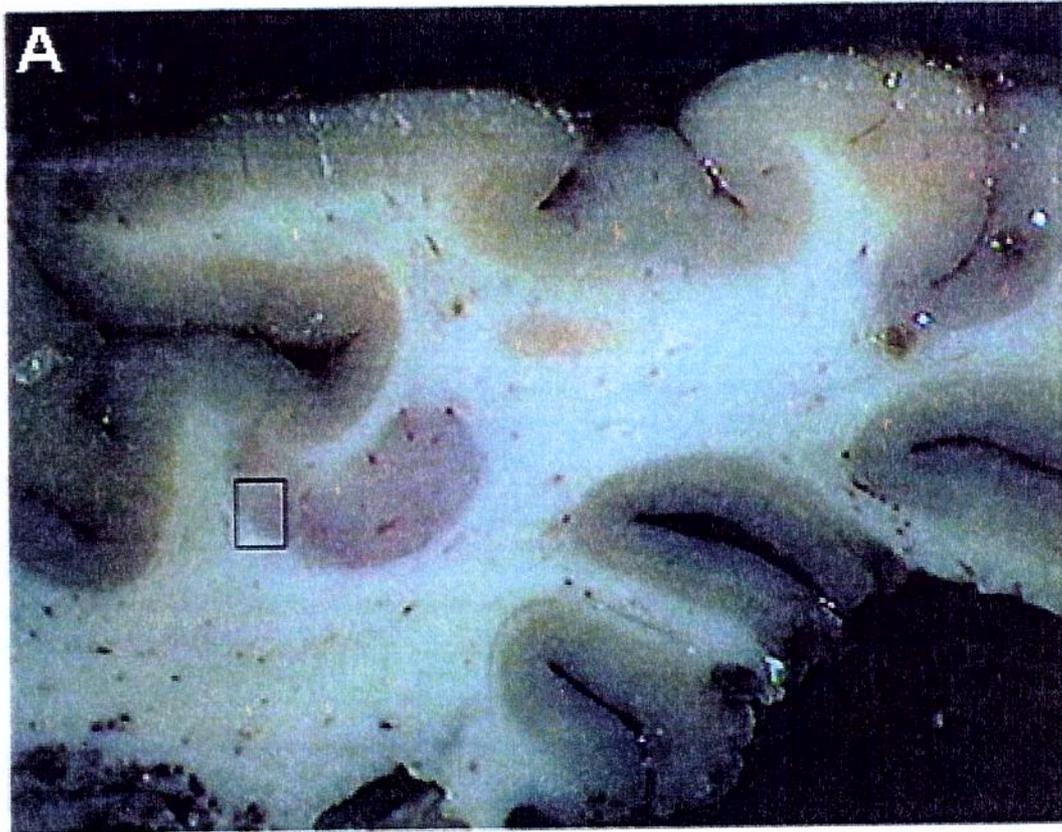


Figura 3

**Figura 4. Caracterização imunohistoquímica da heterotopia neuronal em banda em córtex humano. A e B,** secção de tecido correspondente à área delimitada na Figura 3 A incubada com anticorpo anti- nNOS. Notar neurônios com citoplasma e núcleo fortemente marcados e também fibras com varicosidades marcadas. O córtex isotópico apresenta uma aparente desorganização da laminação cortical. **C,** secção controle onde foi omitida a incubação com o anticorpo primário. Barra **B** e **C** 50  $\mu\text{m}$ , **A** 30  $\mu\text{m}$ .

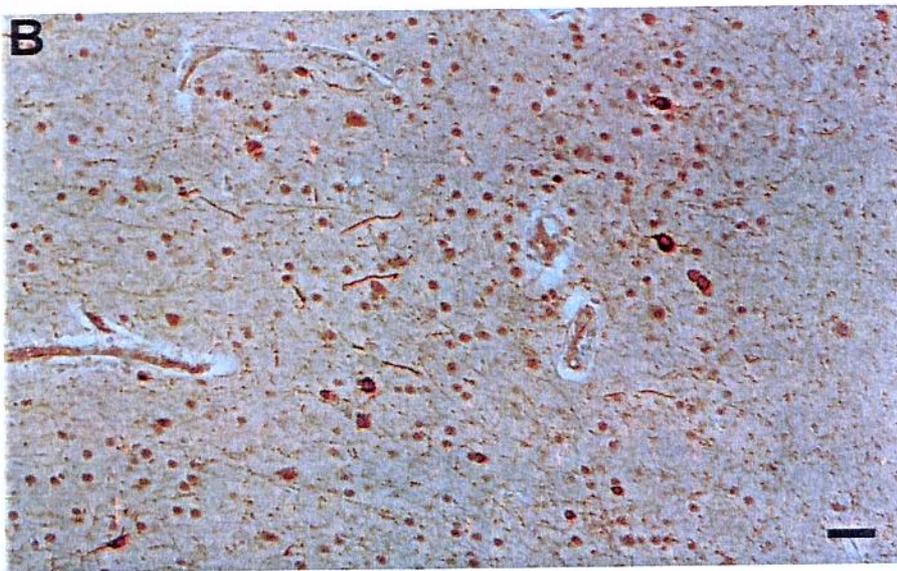
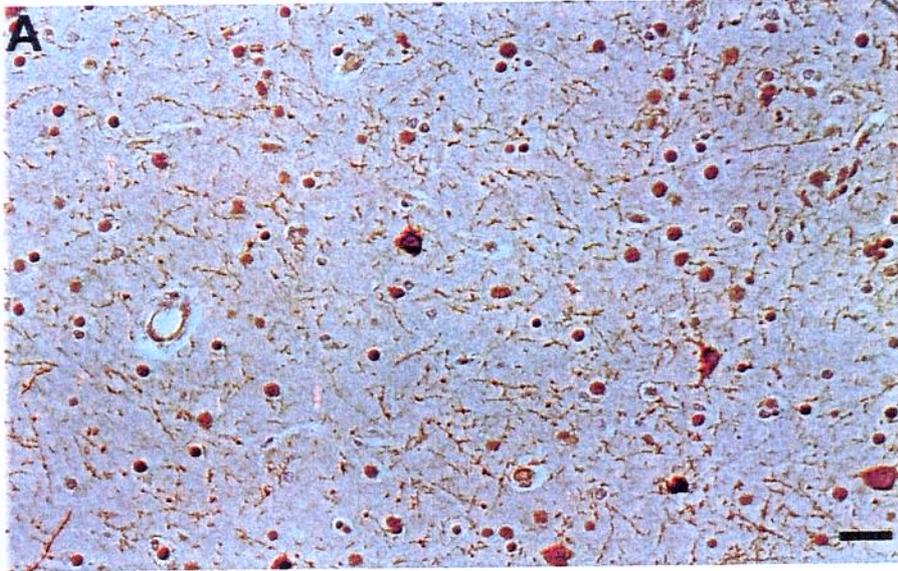


Figura 4

**Figura 5.** Caracterização imunohistoquímica da heteropia neuronal em banda em córtex humano. **A** e **B**, secções de tecido incubadas com anticorpo anti-GFAP mostrando a marcação de grande número de fibras (**A**) e também de astrócitos (**B**) no córtex heterotópico. **C** e **D**, secções de tecido incubadas com anticorpo anti-neurofilamento, notar a marcação intensa de fibras na substância branca (**C**) e os feixes entre o córtex heterotópico e o córtex adjacente (**D**). Barra 50  $\mu$ m.

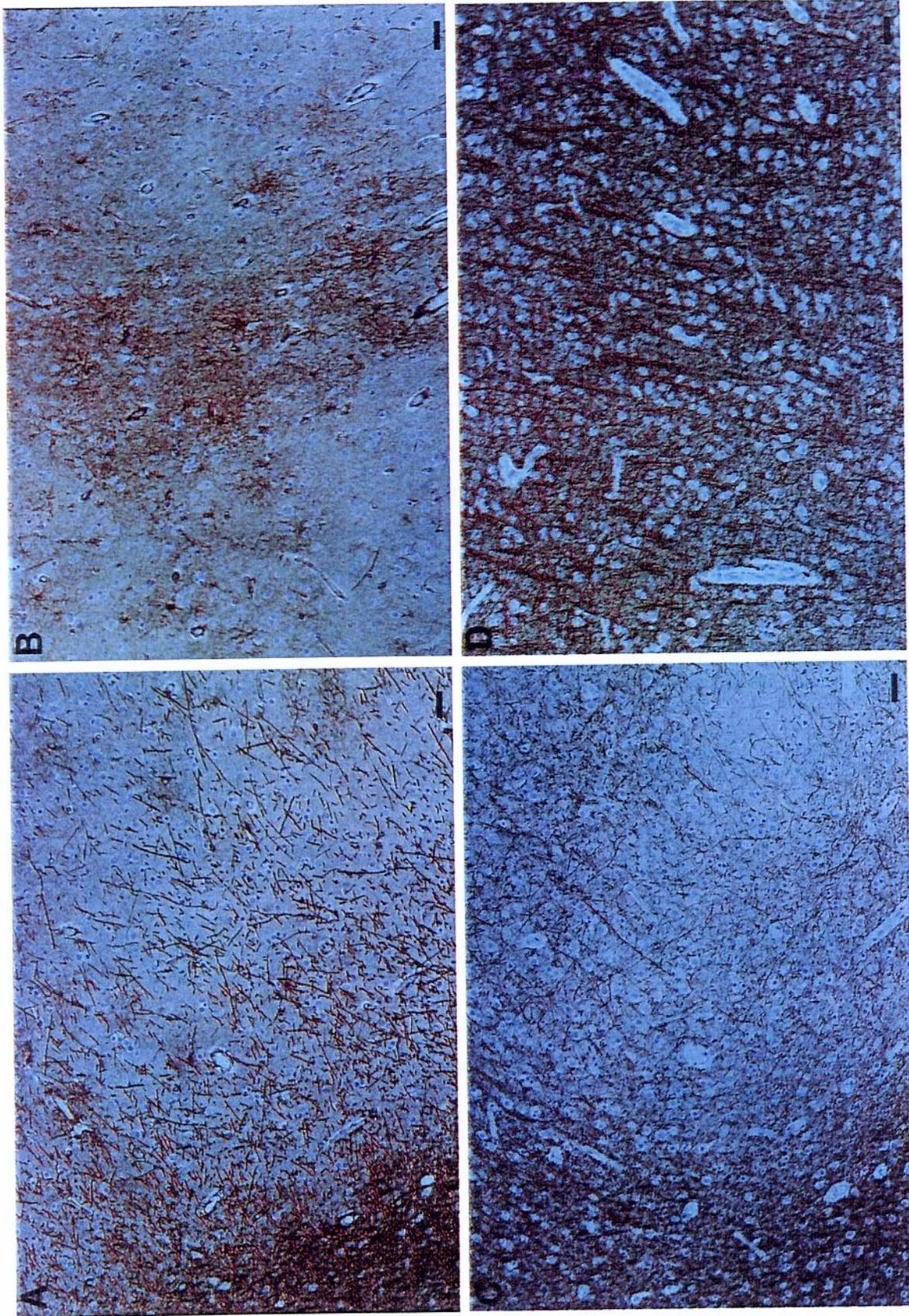


Figure 5

**Figura 6. Heterotopia Neuronal.** **A**, macroscopia do córtex occipital mostra uma heterotopia em banda extensa. **B**, secção corada com HE onde é visualizada a septação da região heterotópica. **C**, nota-se agregados de neurônios heterotópicos na substância branca. Barra **B** 100  $\mu\text{m}$  e **C** 50  $\mu\text{m}$ . GM: substância cinzenta; WM: substância branca.

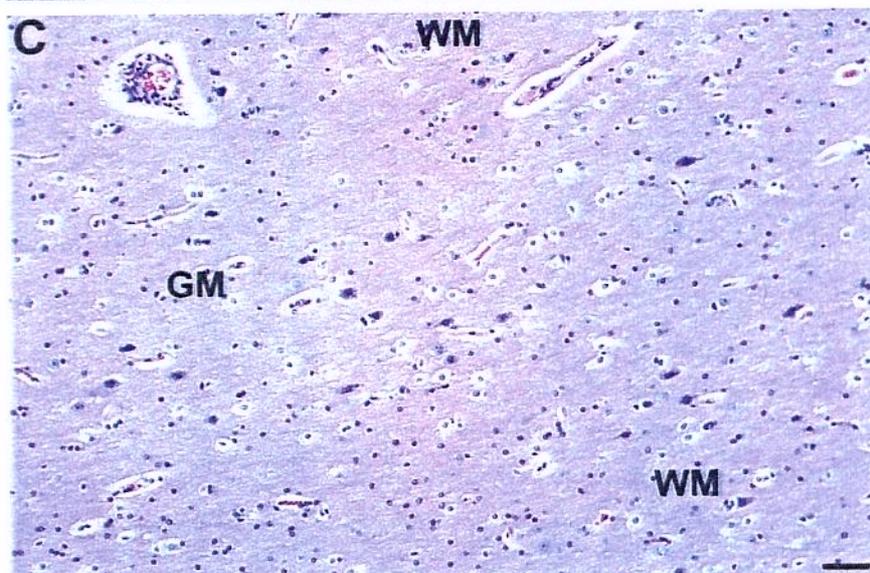
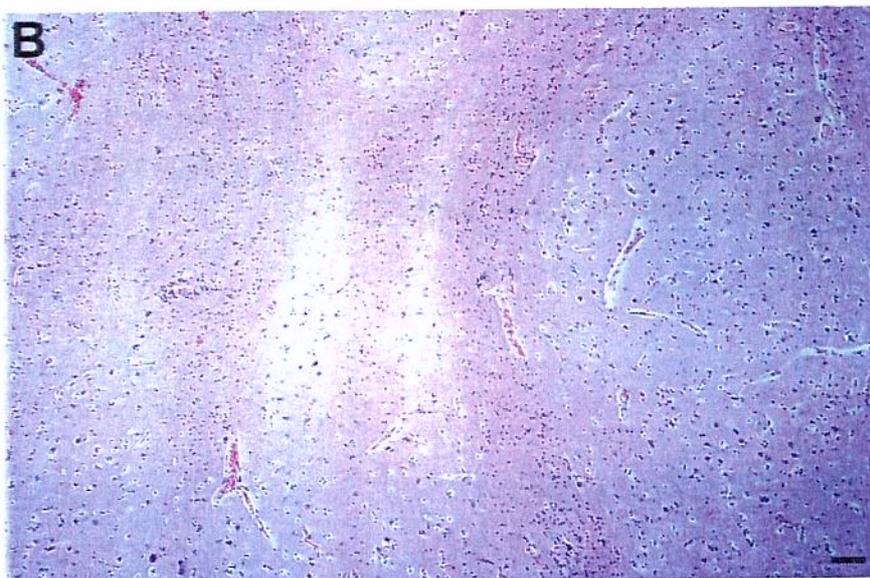
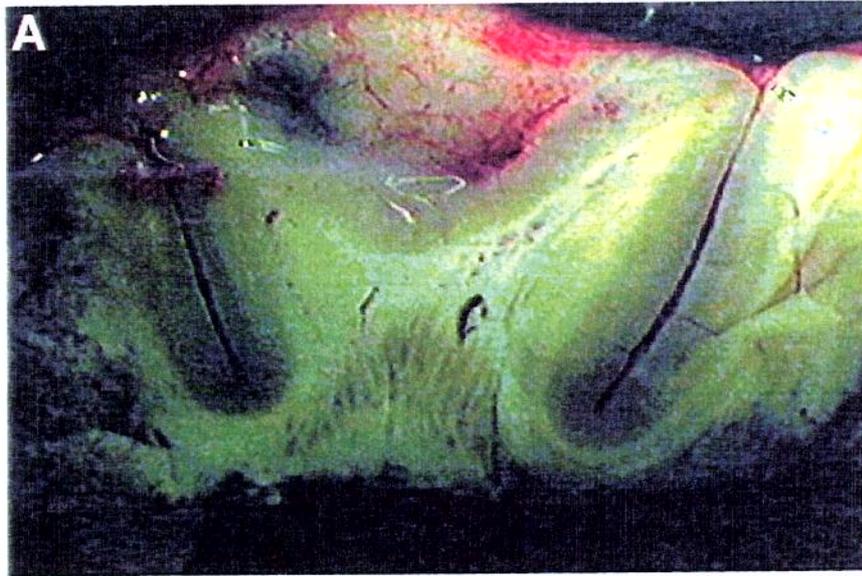
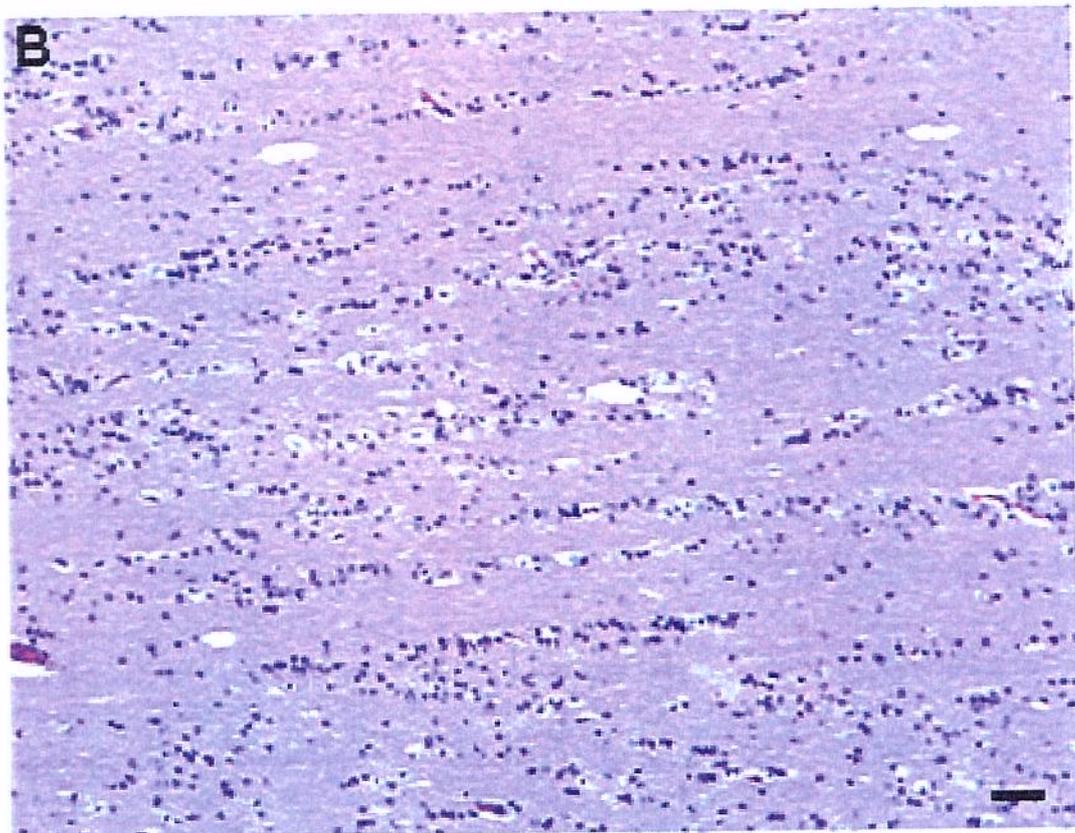
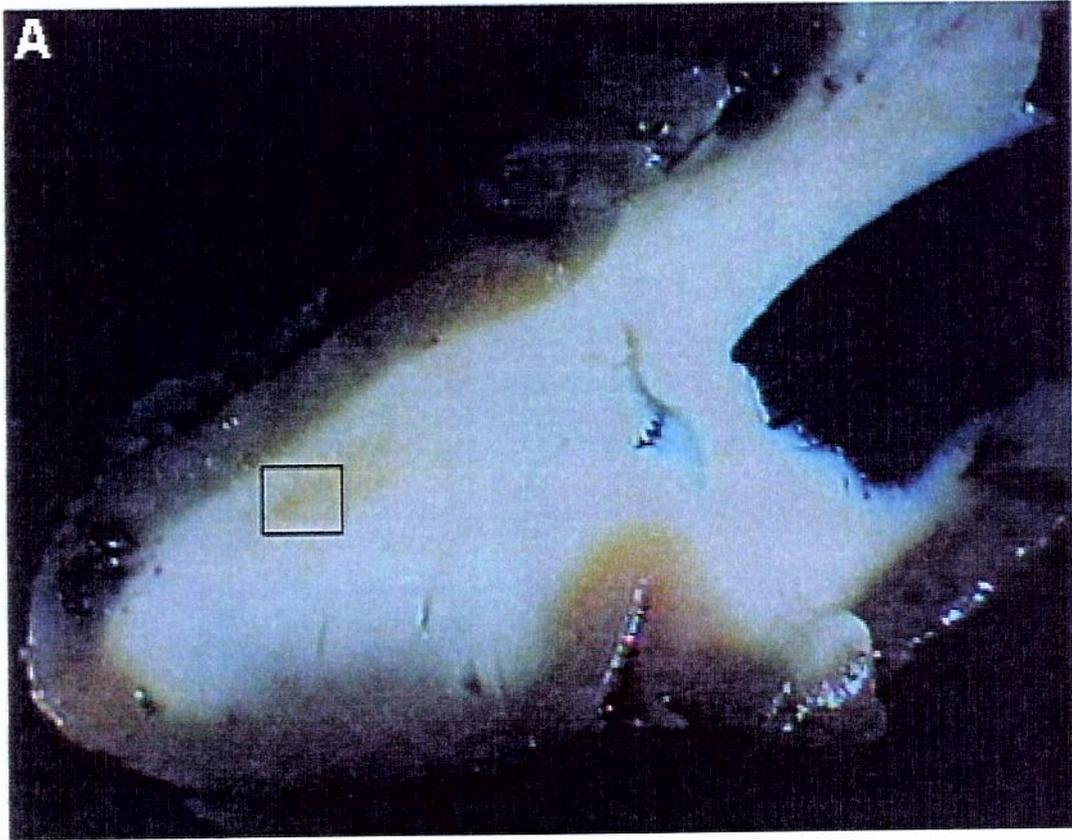


Figura 6

**Figura 7. Heterotopia Neuronal.** **A**, macroscopia do córtex frontal ilustrando a região da heterotopia neuronal **B**, heterotopia neuronal, com presença de nódulos heterotópicos subependimários. Notar o alinhamento de neurônios na substância branca. Barra 50  $\mu\text{m}$ .



**Figura 7**

**Figura 8. Displasia Cortical Focal tipo Taylor.** Secções de tecido coradas pelo método HE mostrando a desorganização da laminação cortical ( **A** ) e presença de neurónios grandes citomegálicos, inclusive “dark neurons” ( **C** ) e “balloon cell” ( **B** ). Barra **A** 100  $\mu\text{m}$ , **B** e **C** 50  $\mu\text{m}$ .

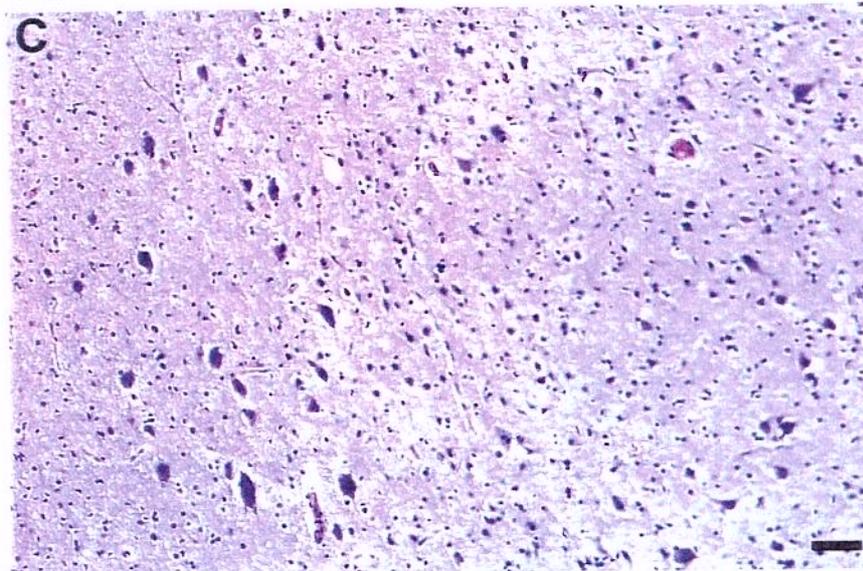
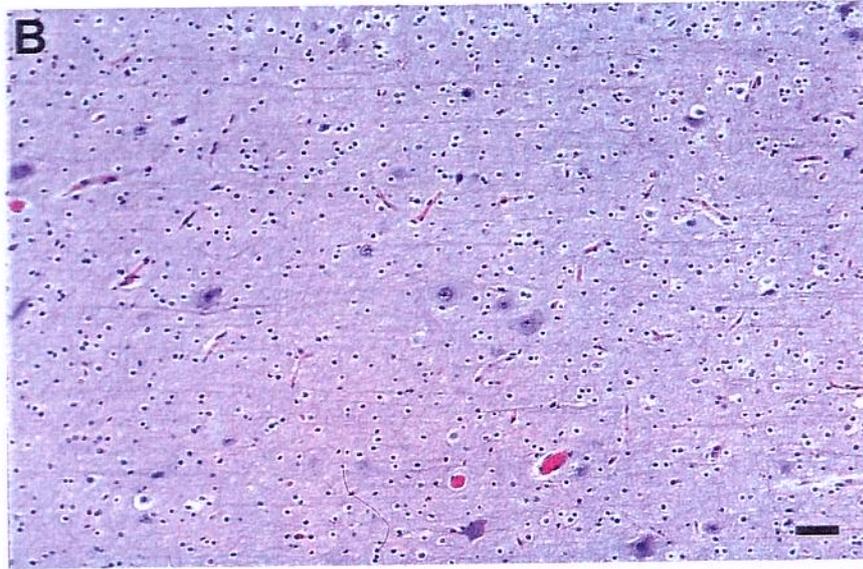
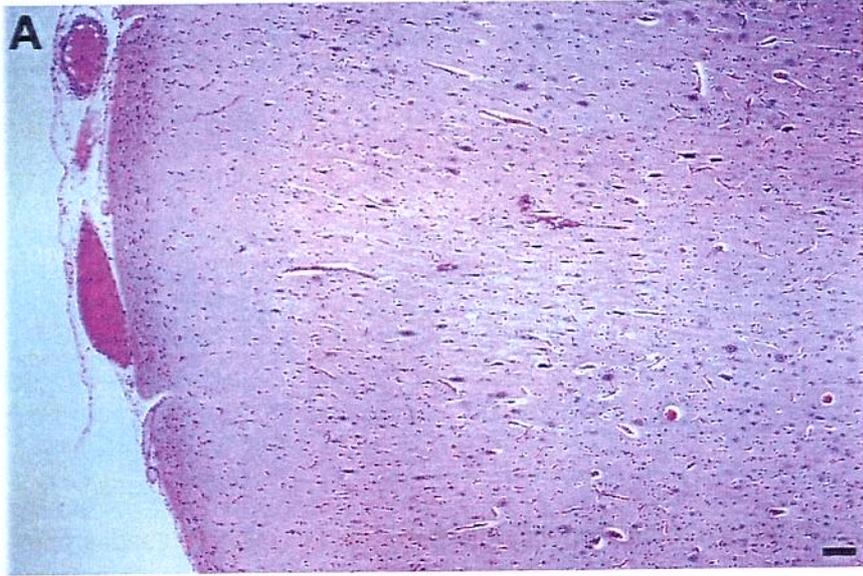


Figura 8

**Figura 9. Displasia Cortical Focal tipo Taylor.** Secções de tecido incubadas com anticorpo anti-nNOS. **A**, intensa expressão de nNOS IR em fibras varicosas em toda espessura cortical, especialmente na camada molecular. **B**, nNOS IR em neurônios de tamanho pequeno e médio por toda a espessura cortical, predominando nas camadas III (**C**) e V (**D**). Notar a presença de dendritos com comprimento maior que 400  $\mu\text{m}$  (**C**, setas) orientados em direção à lâmina I. Neurônios no limite entre as substâncias branca e cinzenta também apresentaram nNOS IR (**D**). Barra **A** 100  $\mu\text{m}$ ; **B**, **C** e **D** 50  $\mu\text{m}$ .

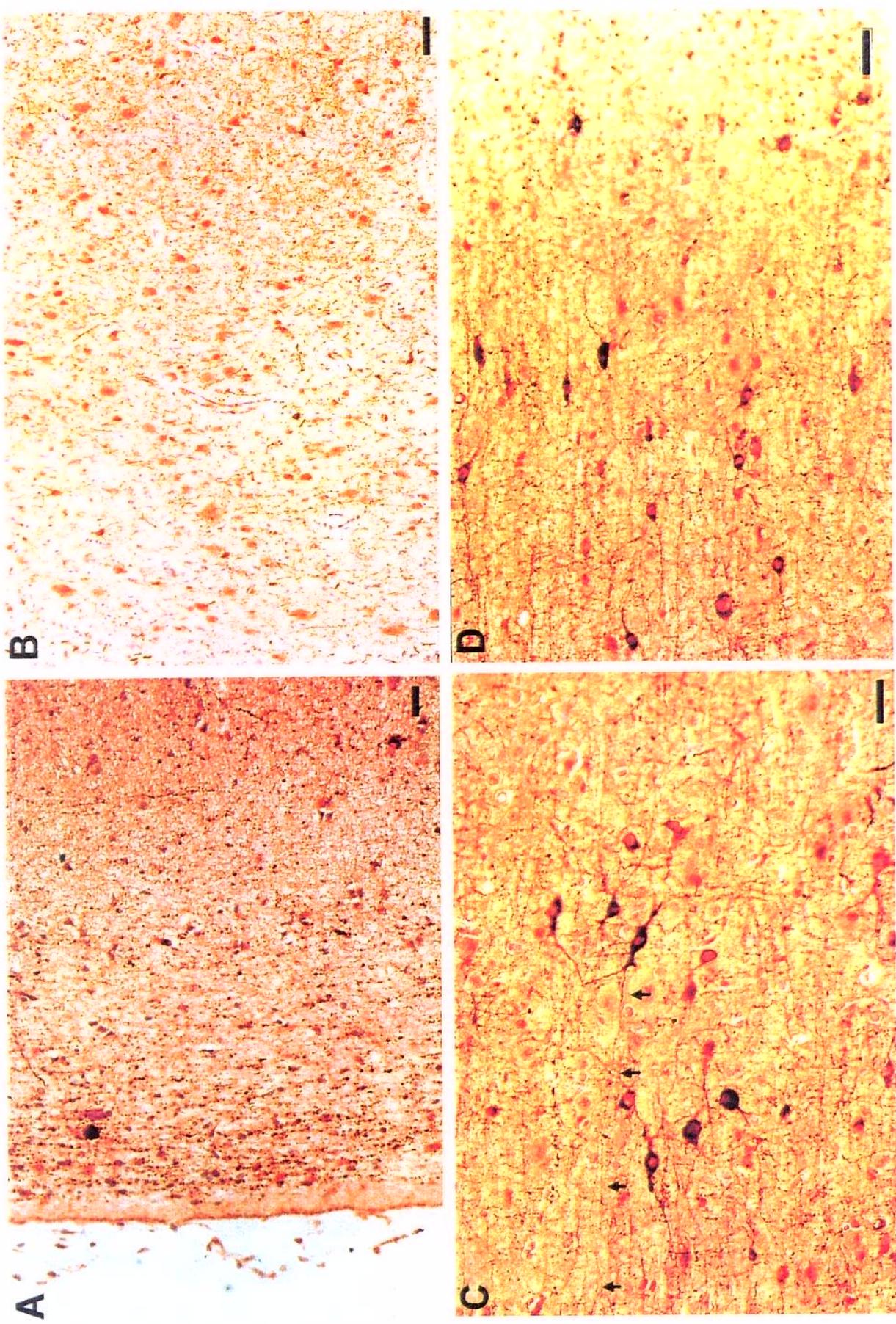
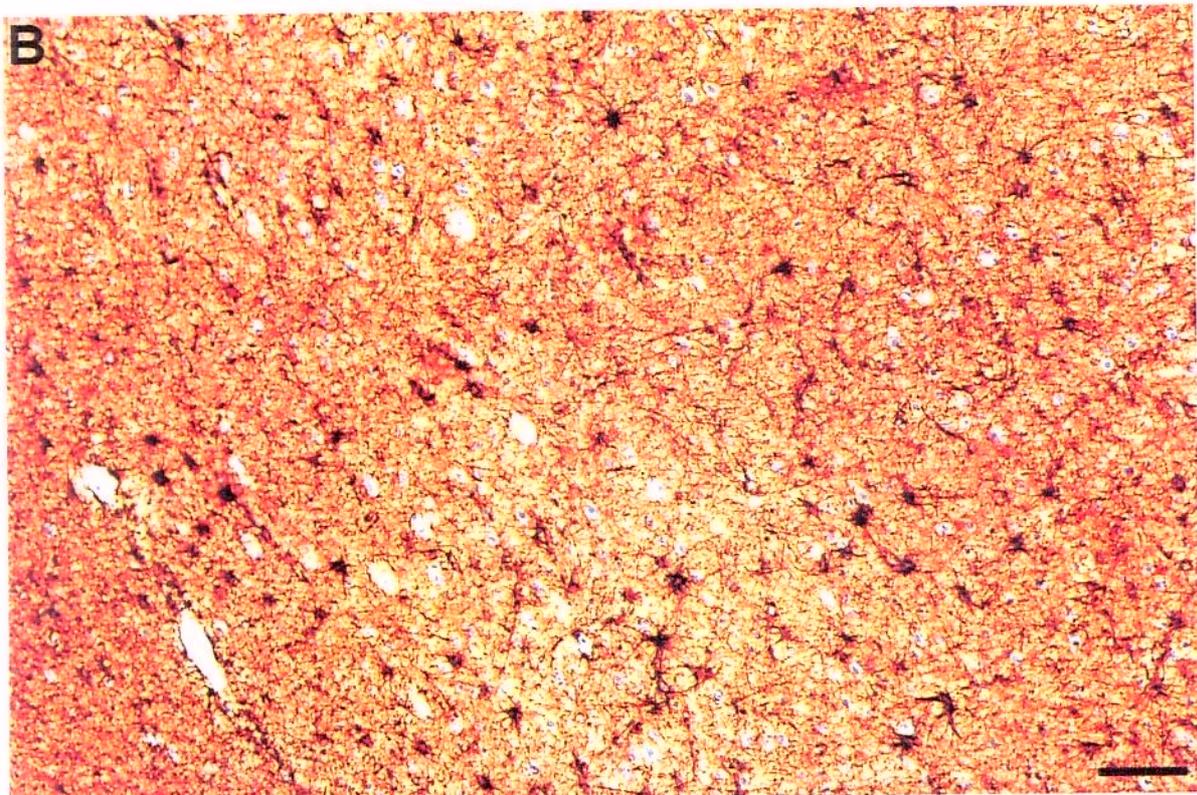
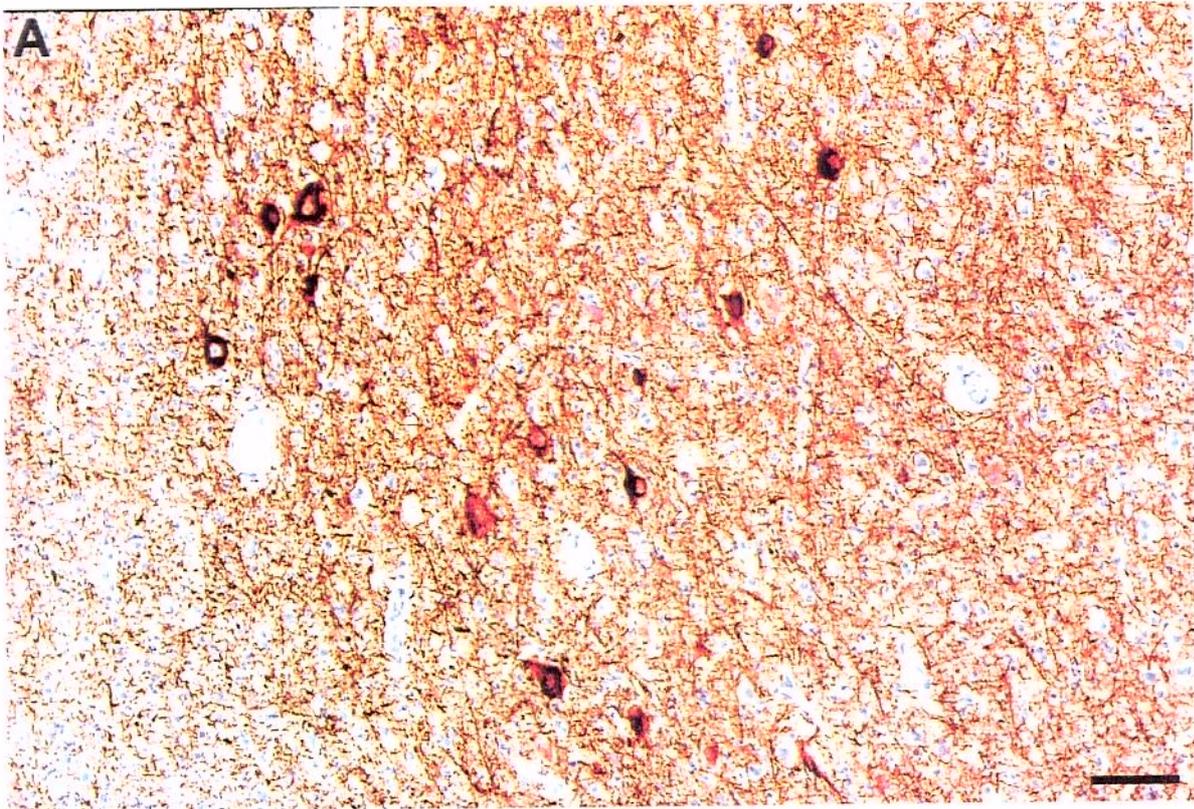


Figura 9

**Figura 10. Displasia Cortical Focal tipo Taylor.** **A**, secção de tecido incubada com anticorpo anti-neurofilamento mostrando neurônios grandes fortemente marcados na região dos "dark neurons". **B**, secção de tecido incubada com anticorpo anti-GFAP marcando astrócitos e fibras gliais. Barra 30 $\mu$ m.



**Figura 10**

**Figura 11. Heterotopia Glio-Neuronal Marginal, região do botão glial.** **A**, secção de tecido corada com HE. **B e C** secção de tecido incubada com anticorpo anti-nNOS mostra a marcação de poucos neurônios, mas de tipos diferentes (**C**). **D e E**, secções de tecido com fibras positivas para anticorpos anti-neurofilamento (**D**) e anti-GFAP (**E**). **F**, controle negativo onde foi omitida a incubação com anticorpo primário. Barra 30 $\mu$ m.

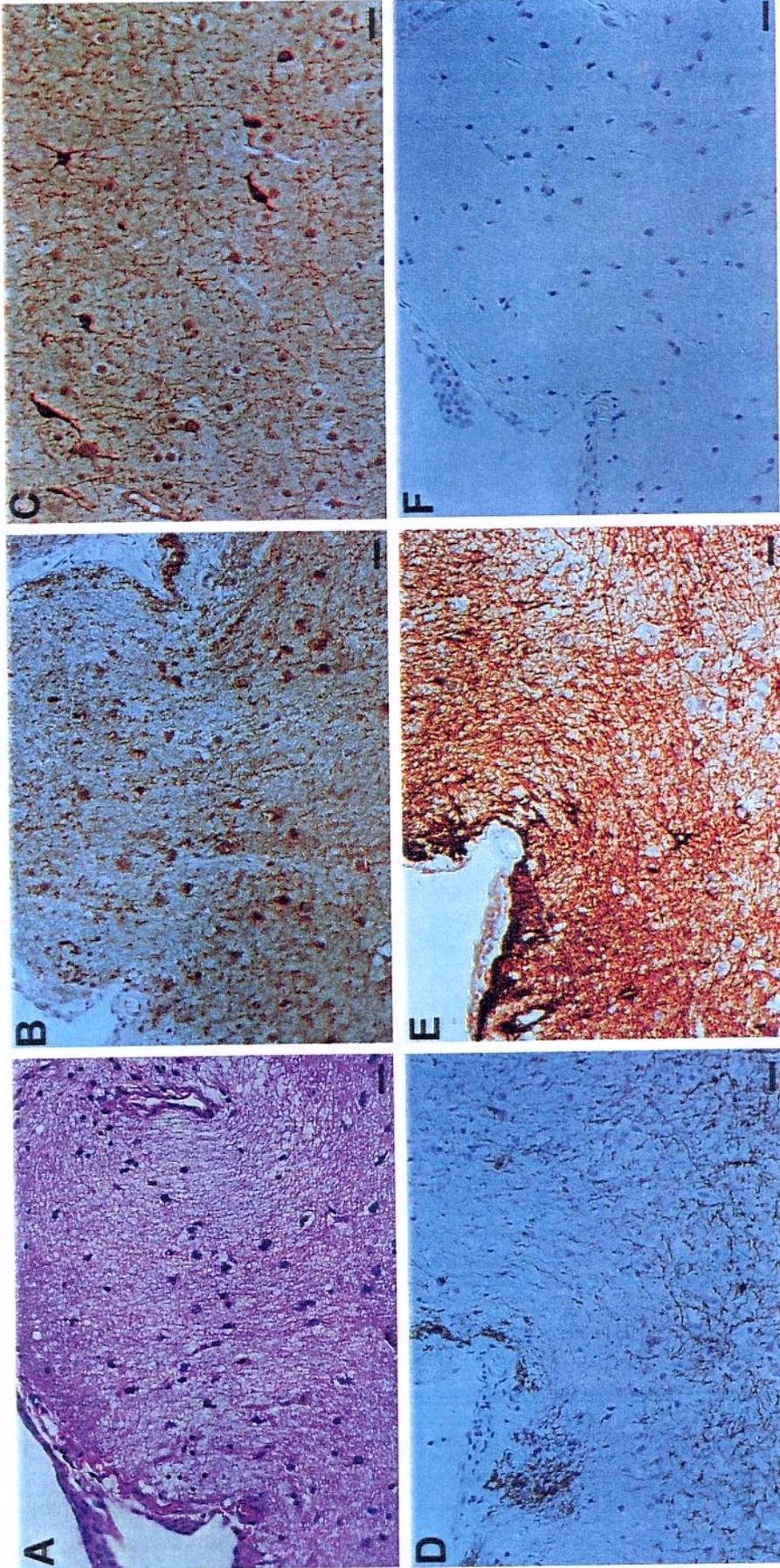
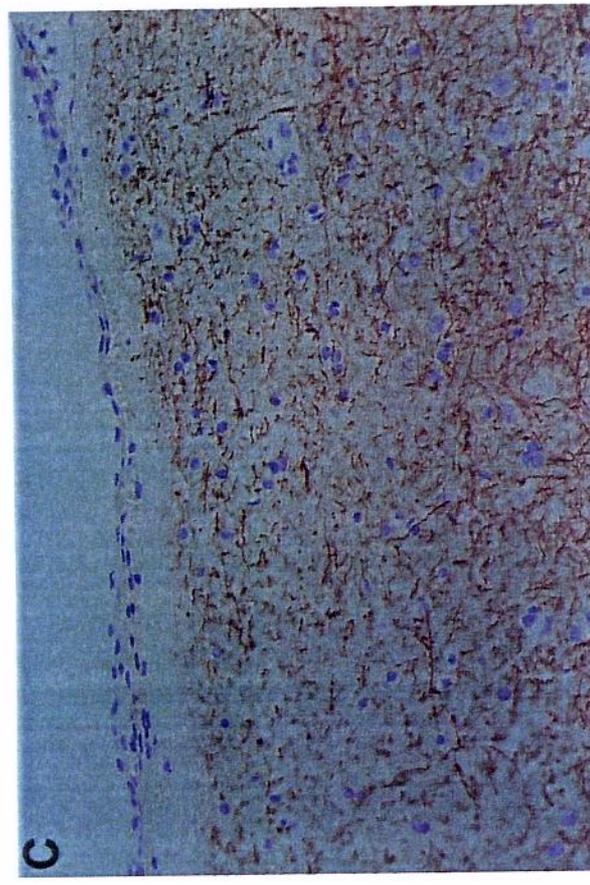
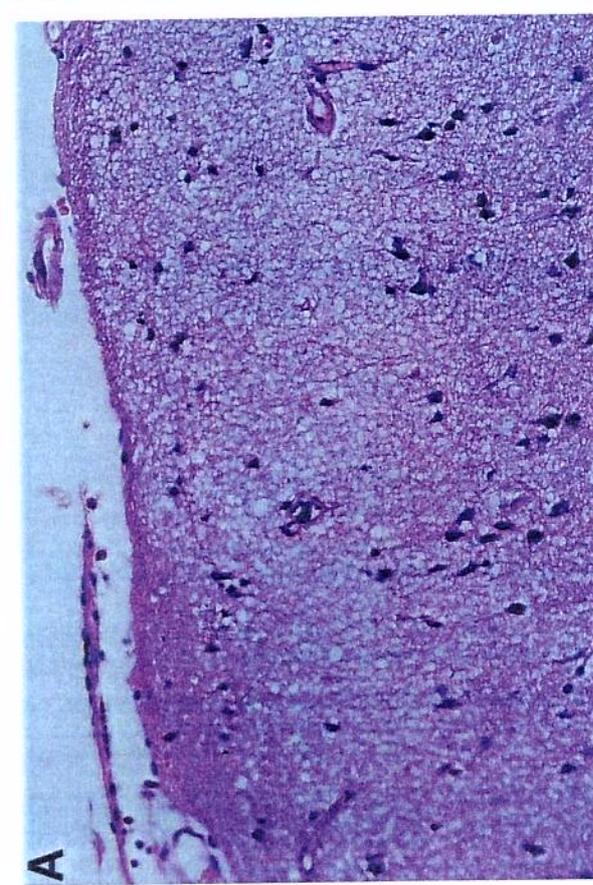
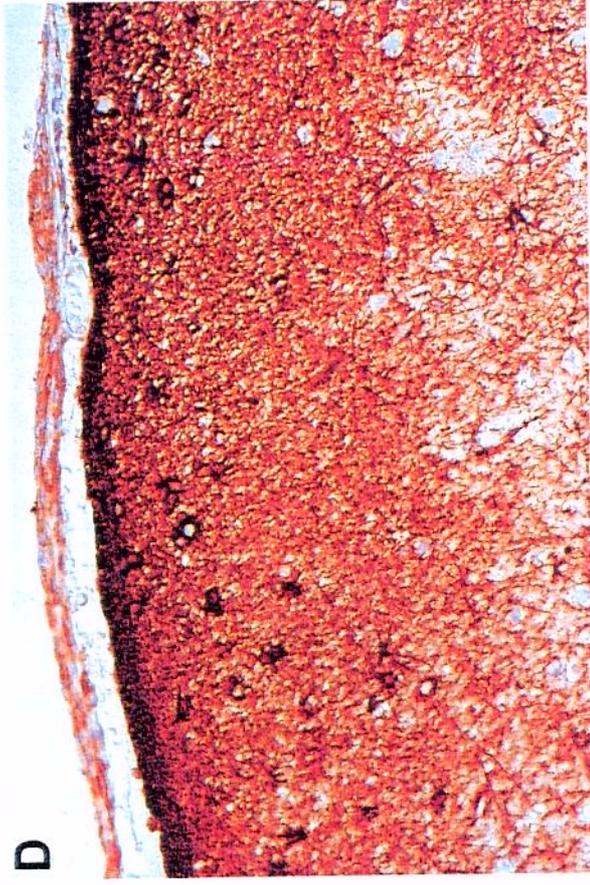
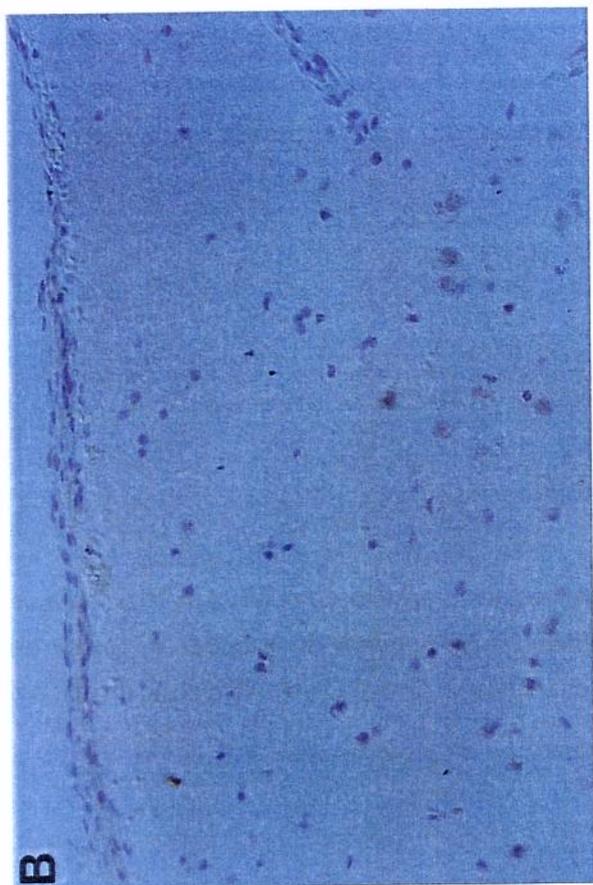


Figura 11

**Figura 12. Heterotopia Glio-Neuronal Marginal, região próxima do botão glial. A,** secção de tecido corada com HE. **B,** controle negativo onde foi omitida a incubação com anticorpo primário. **C,** secção de tecido incubada com anticorpo anti-neurofilamento mostra a marcação de fibras. **D,** algumas células com aspecto semelhante a neurônios são GFAP IR. Barra 30 $\mu$ m.



**Figure 12**

**Figura 13. Secções de tecido do neocórtex cerebral humano coradas com HE. A-F** sequência de fotos desde a camada molecular em direção à substância branca, mostrando a estrutura laminar do neocórtex cerebral e os tipos celulares presentes. Seta, cabeça de seta, asterisco e cruz indicam áreas correspondentes entre os painéis. Barra 50  $\mu\text{m}$ .

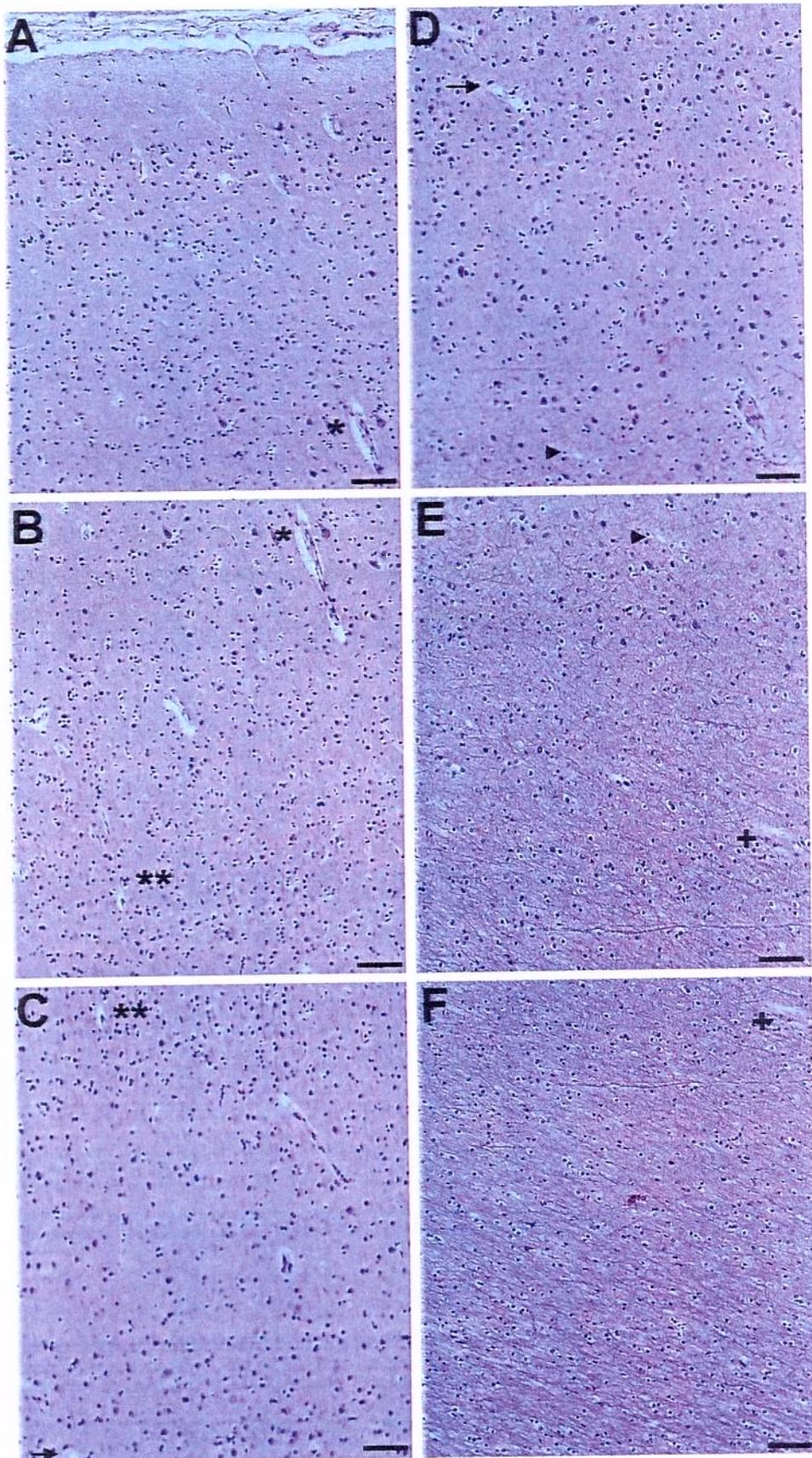


Figura 13

**Figura 14. Secções de tecido do neocórtex cerebral humano imunomarcadas com anticorpo anti-nNOS. A-F** sequência de fotos desde a camada molecular em direção à substância branca, mostrando o padrão de distribuição de neurônios e estruturas nNOS-IR em todas as camadas do neocórtex cerebral. Seta, cabeça de seta, asterisco e cruz indicam áreas correspondentes entre os painéis. Barra 20  $\mu$ m.

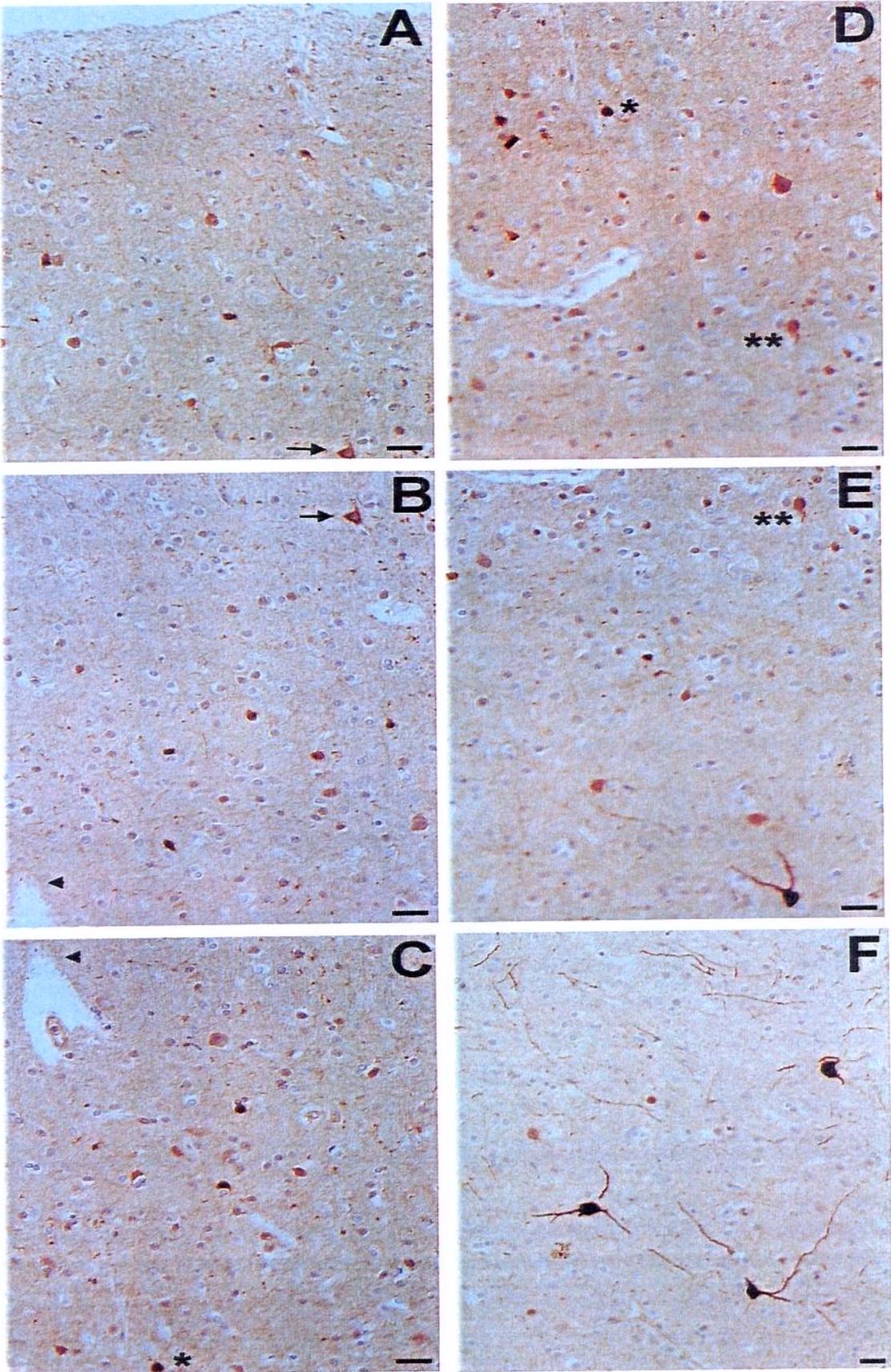
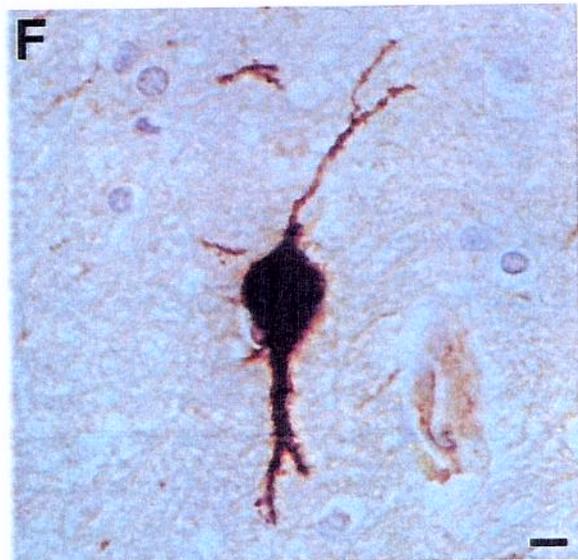
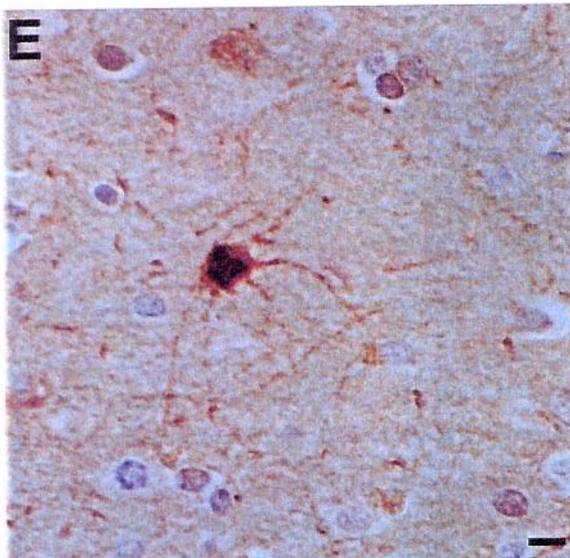
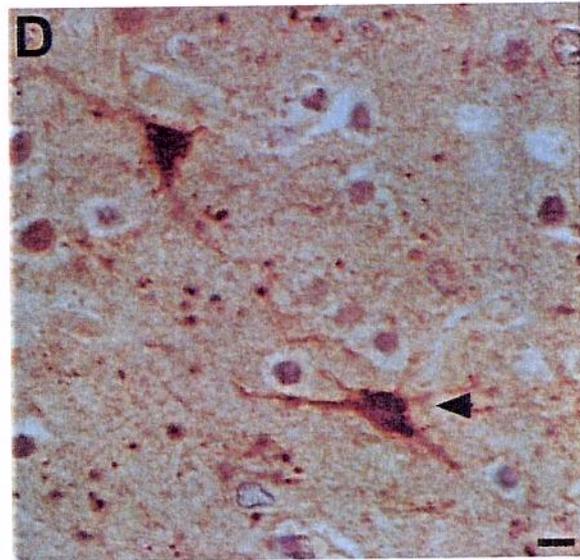
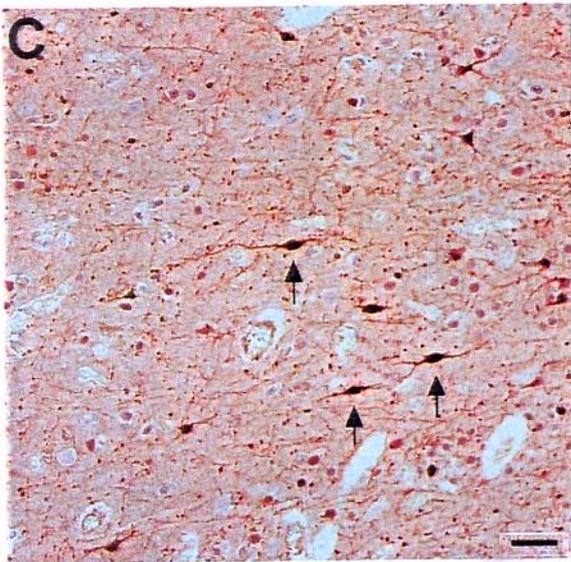
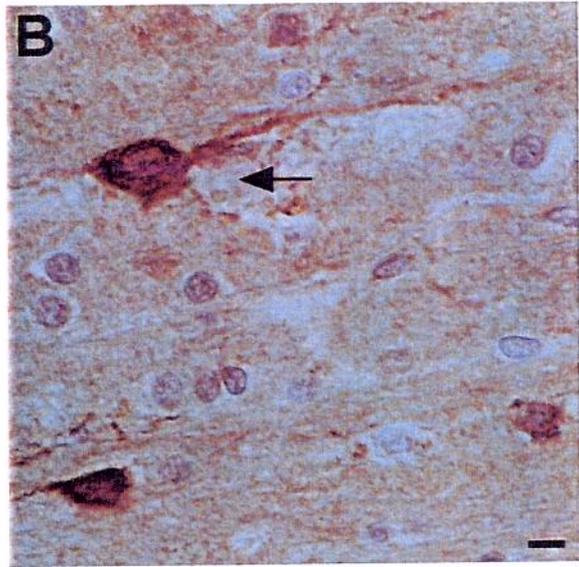
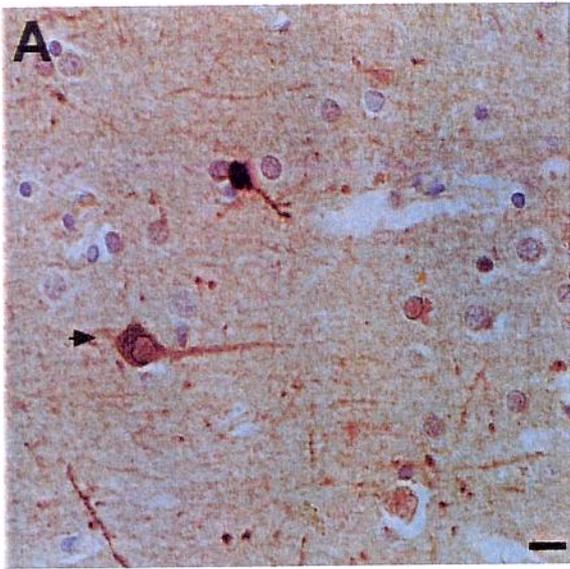


Figura 14

**Figura 15. Secções de tecido do neocórtex cerebral mostrando os tipos celulares diferentes que apresentam nNOS-IR. A** mostra uma célula (cabeça de seta pequena) com aspecto de neurônio piramidal na camada III do neocórtex com processo marcado positivamente. **B** apresenta um neurônio piramidal (seta grande) grande com processo marcado positivamente na camada V do neocórtex. **C** neurônios bipolares (setas pequenas) com processos marcados positivamente e **D** neurônio multipolar (cabeça de seta grande) com processos marcados positivamente que se apresentam nas camadas mais profundas do neocórtex (III-VI). **E** neurônio gliaforme com processos marcados positivamente na transição substância branca/cinzenta e **F** neurônio com marcação Golgi-like na substância branca e com processos marcados positivamente. Barra **A, B, D, E e F** 10  $\mu\text{m}$ ; **C** 50  $\mu\text{m}$ .



**Figura 15**

**Figura 16. Neurônios nNOS-IR em secções de tecido do neocórtex cerebral humano.** **A** mostra um neurônio (cabeça de seta) com marcação restrita ao citoplasma celular, enquanto **B** mostra neurônios com predomínio de marcação no núcleo (asterisco), mas com marcação do citoplasma (cruz). **C** mostra, com maior aumento, neurônio (seta) com marcação de ambos núcleo e citoplasma, com maior intensidade na região perinuclear. Barra **A** e **B** 20  $\mu\text{m}$ ; **C** 10  $\mu\text{m}$ .

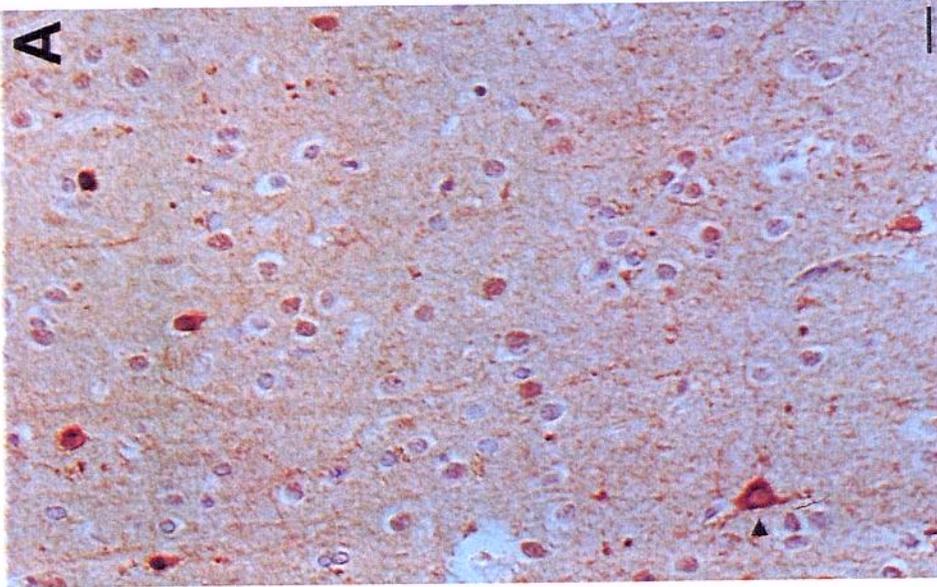
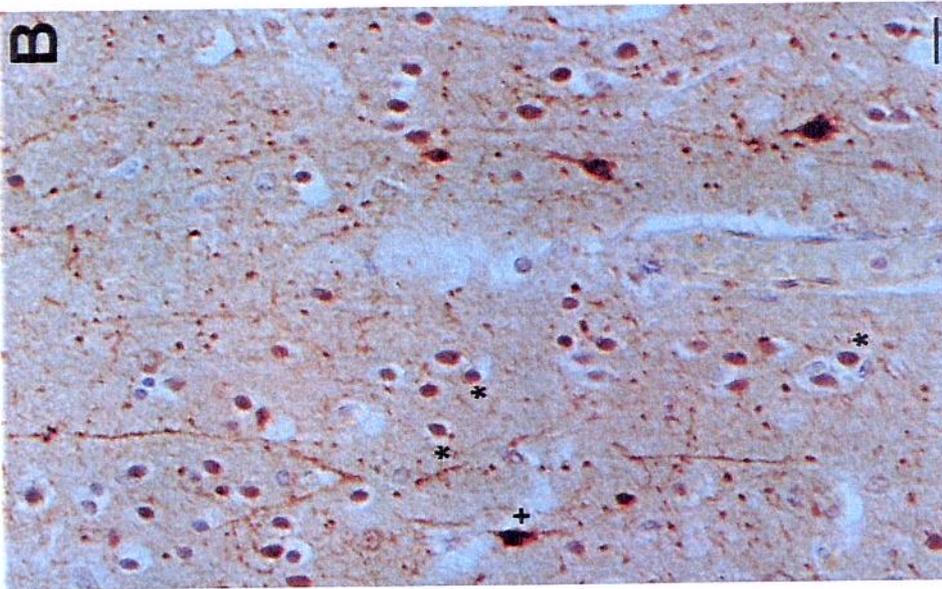
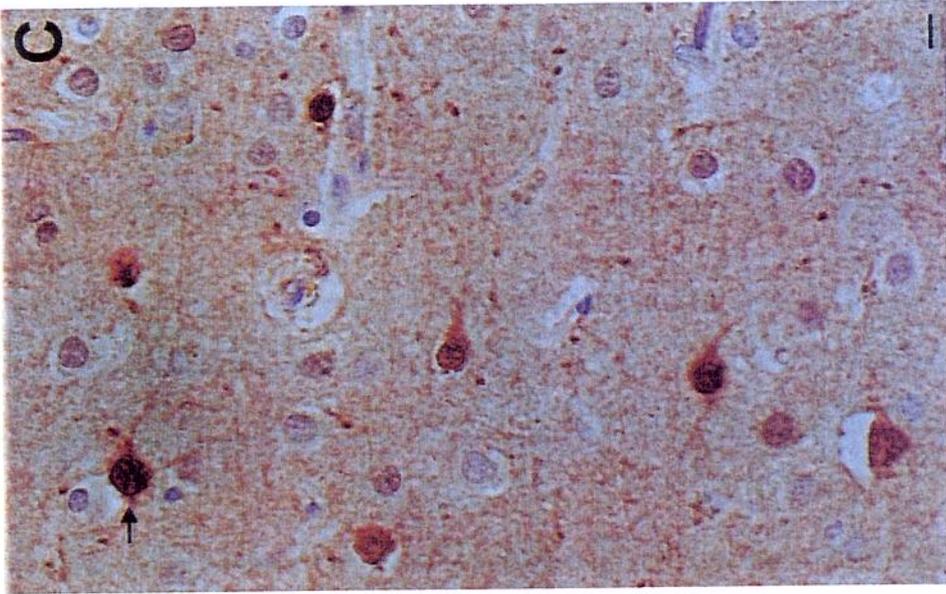


Figura 16

**Figura 17. Fibras nNOS-IR em secções de tecido do neocórtex cerebral.** **A** mostra a presença de fibras orientadas paralelamente à superfície pial na camada molecular (seta), além de fibras orientadas em sentidos diversos nas camadas mais profundas à camada molecular (cabeça de seta). **B** apresenta fibras marcadas positivamente na transição substância branca/cinzenta (cabeça de seta). **C** mostra um maior aumento onde há fibras marcadas positivamente na substância cinzenta do neocórtex; notar fibra (setas) de aproximadamente 400  $\mu\text{m}$  atravessando as camadas corticais em direção à superfície pial. Barra 50  $\mu\text{m}$ .

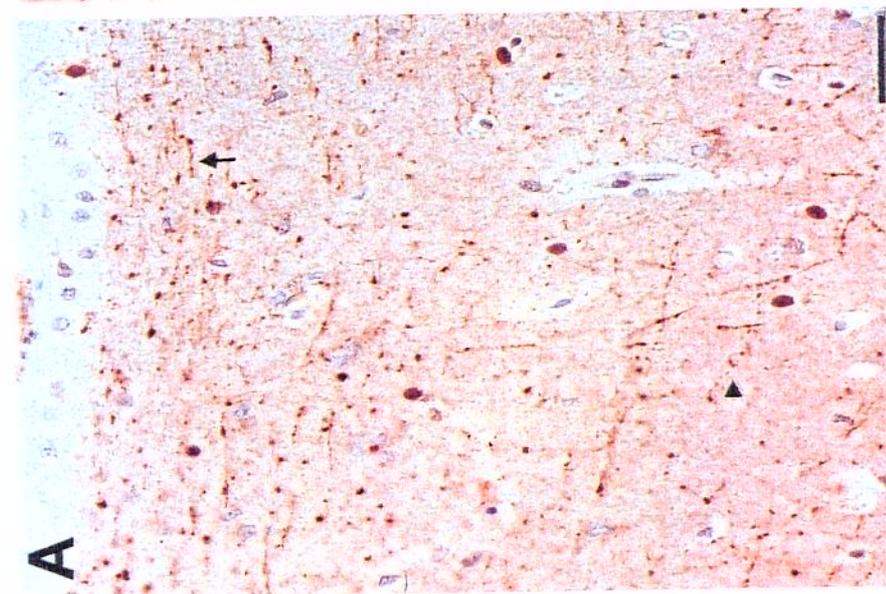
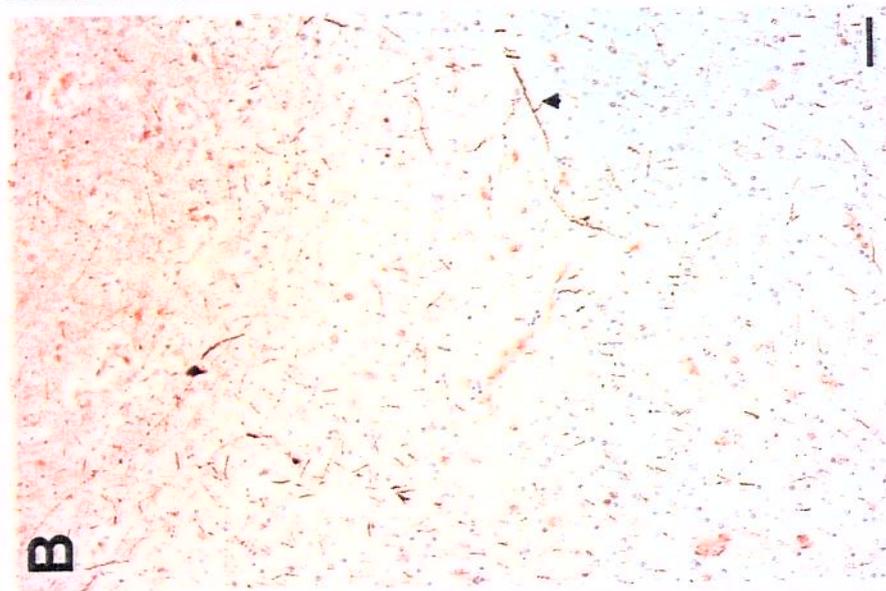
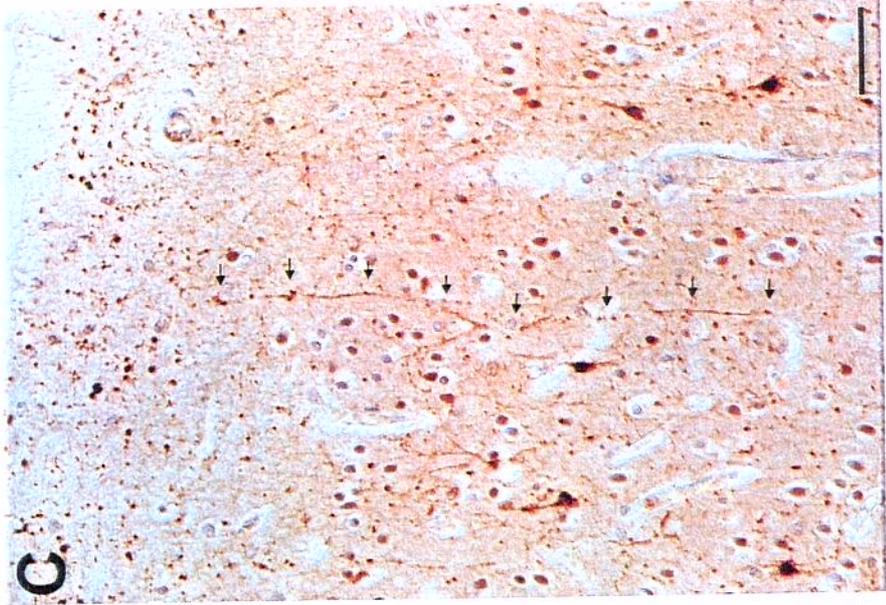


Figura 17

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## VII. Referências Bibliográficas

- AICARDI J. Aicardi syndrome. In: Dysplasias of cerebral cortex and epilepsy. Eds R. Guerrini, F. Andermann, R. Canapicchi, J. Roger, B. G. Zifkin and P. Pfanner p211-216, 1996.
- ALLENDOERFER K.L. and SHATZ C.J. The subplate, a transient neocortical structure: Its Role in the Development of Connections between Thalamus and Cortex. **Annu. Rev. Neurosci.** v. 17, p. 185-218, 1994.
- ANDREW P.J. and MAYER B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. **Cardiovascular Res** v. 43, p. 521-531, 1999.
- ARNOLD S.E. and TROJANOWSKI J.Q. Human fetal hippocampal development: I. Cytoarchitecture, myeloarchitecture, and neuronal morphologic features. **J. Comp. Neur.**, v. 367, p. 274-292, 1996.
- AYAJIKI K., KINDERMANN M., HECKER M., FLEMING I. and BUSSE R. Intracellular pH and tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells. **Circ Res** v. 78, p. 750-758, 1996.
- BARLOW D. J., EDWARDS M. S. and THORNTON J. M. Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. **Nature** 322:747-748, 1986.
- BARTH P.G. Disorders of Neuronal Migration. **Can. J. Neurol. Sci.** P. 01-12, 1987.
- BLUM-DEGEN D., HEINEMANN T., LAN J., PEDERSEN V., LEBLHUBER F., PAULUS W., RIEDERER P. and GERLACH M. Characterization and regional distribution of nitric oxide synthase in the human brain during normal ageing. **Brain Res** 834:128-135, 1999.
- BREDT D.S. and SNYDER S.H. NITRIC OXIDE: A Physiologic Messenger Molecule. **Annu. Rev. Biochem.** 63:175-95, 1994.
- BREDT D.S., FERRIS C.D. and SNYDER S.H. Nitric oxide synthase regulatory sites. **J Biological Chemistry.** vol 267 No. 16 p. 10976-81, 1992.
- BREDT D. S., HWANG P. M., GLATT C. E., LOWENSTEIN C., REED R. R. and SNYDER S. H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P450 reductase. **Nature.** 351:714-718, 1991.

- BREDT D.S., HWANG P.M. and SNYDER S.H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature**. 347:768-770, 1990.
- BRENNAN J.E., XIA H., CHAO D.S., BLACK S.M. and BREDT D.S. Regulation of neuronal nitric oxide synthase through alternative transcripts. **Dev Neurosci**. 19:224-31, 1997.
- CATTORETTI G., PILERI S., PARRAVACINI C., BECKER M. H. G., POGGI S., BIFULCO C., KEY G., D'AMATO L., SABATTINI E., FEUDALE E., REYNOLDS F., GERDES J. and RILKE F. Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. **J Pathol**. 171:83-98, 1993.
- CHRISTOPHERSON K. S. and BREDT D. S. Nitric Oxide in Excitable Tissues: Physiological Roles and Disease. The American Society for Clinical Investigation. Inc.100:2424-2429, 1997.
- CONTESTABILE A. Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. **Brain. Res. Ver.** 32, 476-509, 2000.
- COOP A.J. and HARDING B.N. Neuronal migration disorders in humans and in mouse models- an overview. **Epilep. Res.** 36:133-141, 1999.
- COTTER D.R., HONAVAR M. and EVERALL I. Focal cortical dysplasia: a neuropathological and developmental perspective. **Epilep Res.** 36:155-164, 1999.
- COWAN W.M., FAWCETT J.W., O'LEARY D.D. and STANFIELD B.B. Regressive events in Neurogenesis. **Science** 225(4668):1258-65, 1984.
- CROW J.P. and BECKMAN J.S. Reactions between nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: footprints of peroxynitrite in vivo. In: Nitric oxide, Louis Ignarro and Ferid Murad (Eds.) **Advances in Pharmacology**. vol. 34 pp.17-43, 1995. Academic Press, San Diego CA.
- DAWSON V. L. and DAWSON T. M. Nitric oxide in neuronal degeneration. **Proc Soc Exp Biol Med** 211(1):33-40, 1996.
- DE MONTELLANO P. R. O., NISHIDA C., RODRIGUEZ-CRESPO I. and GERBER N. Nitric oxide synthase structure and electron transfer. **Drug Metab Dispos.** 26(12):1185-1189,1998.

- DIAS M.M., VASCONCELOS T.M., CALDO H., TEIXEIRA S.A., CHIMELLI L., J.-PINA-NETO, LARSON R.E. and **MARTINS A.R.** Expressão da miosina-V (BMV), de proteína glial Fibrilar acidica (GFAP) e de neurofilamento (NF) em heterotopias cerebelares humanas nos síndromes de Edwards e de Patau". Painel apresentado no V Simpósio de Iniciação Científica da USP (V SICUSP), realizado em Ribeirão Preto, SP, em 31 de outubro de 1997
- DOWNEM M., ZHAO M. L., LEE P., WEIDENHEIM K.M., DICKSON D.W. and LEE S.C. Neuronal nitric oxide synthase expression in developing and adult human CNS. **J Neuro Experi Neurology**. 58:12-21, 1999.
- EGBERONGBE Y.I., GENTLEMAN S.M., FALKAI P., BOGERTS B., POLAK J.M. and ROBERTS G.W The distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the human brain. **Neuroscience**. 59: 561-578, 1994.
- FORSTERMANN U. and KLEINERT H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of three isoforms. **Nau – Schm Arch Pharmacol**. 352:351-364, 1995.
- FORSTERMANN U., SCHMIDT H.H.H.W., POLOCK J., SHENG H., MITCHELL J.A., WARNER T.D., NAKANE M. and MURAD F. Isoforms of nitric oxide synthase: characterization and purification from different cell types. **Biochem Pharmacol** . 42:1849-1857, 1991.
- FRAENKEL-CONRAT H., BRANDON B. A. and OLCOTT H.S. The reaction of formaldehyde with proteins. Participation of indole groups. Gramicidin. **J Biol Chem**. 168:99-118, 1947.
- FURCHGOTT F. and ZAWADZKI J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation smooth muscle by acetylcholine. **Nature**. 288:373-76, 1980.
- GARTHWAITE J. and BOULTON C. L. Nitric oxide signalling in the central nervous System. **Annu Rev Physiol**. 57:683-706, 1995.
- GONZALEZ-HERNANDEZ T., DE LA CRUZ A.P. and MANTOLAN-SARMIENTO B. Histochemical and Immunohistochemical Detection of Neurons that Produce Nitric Oxide: Effect of Different Fixative Parameters and Immunoreactivity Against Non neuronal NOS Antisera. **J. Histoche. Cytoche**. 44(12): 1399-1413, 1996.

- GORREN A.C.F.; SCHRAMMEL A.; SCHMIDT K. and MAYER B. Thiols and neuronal nitric oxide synthase: complex formation, competitive inhibition, and enzyme stabilization. **Biochemistry**. 36:4360-66, 1997.
- GOW A.J., DURAN D., MALCOLM S. and ISCHIROPOULOS H. Effects of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. **FEBS Letters** 385:63-66, 1996.
- HANNAN A.J., SERVOTTE S., KATSNELSON A., SISODIYA S., BLAKEMORE C., SQUIER M. and MOLNÁR Z. Characterization of nodular neuronal heterotopia in children. **Brain**. 122,219-238, 1999.
- HONAVAR M. E MELDRUM B. S. Defeitos da migração neuronal. Em: Greenfield's Neuropathology. 6ª edição vol. 1. eds. Graham, D. I. and Lantos P. L. p 931-962, 1997.
- ISCHIROPOULOS H. Biological Tyrosine Nitration: A Pathophysiological Function of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 356:1-11, 1998.
- JAFFREY S. R. and SNYDER S. H. PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. **Science**. 274:774-777, 1996.
- KALB R.G. and AGOSTINI J. Molecular evidence for nitric oxide-mediated motor neuron development. **Neuroscience**. 57: 1-8, 1993.
- KENDLER A. AND GOLDEN J.A. Progenitor cell proliferation outside the ventricular and Subventricular zones during human brain development. **J Neuropathol Exp Neur**. 55(12):1253-8, 1996.
- KOSTOVIC I. and RAKIC P. Development History of the Transient Subplate Zone in The Visual and Somatosensory Cortex of the Macaque Monkey and Human Brain. **J. Comp. Neurol**. 297:441-470, 1990.
- KOTSONIS P., FROHLIC L.G., SHUTENKO Z.V., HOREJSI R., PFLEIDERER W. and SCHMIDT H.H.H.W. Allosteric regulation of neuronal nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin and suppression of auto-damaging superoxide. **Biochem J**. 348:767-776, 2000.

- LAEMMLI U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** (London) 227, 680-685, 1970.
- LAEMMLI U.K. and FAVRE M. Maturation of the head of bacteriophage T4 **J Mol Biol.** 80:575-599, 1973.
- LOWRY O.H.; ROSEBROUGH N.J.; FARR A.L., and RANDALL R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem.** 193: 265-75, 1951.
- MACDONALD G., DILLMAN P. and SHIRLEY I. Evaluation of six histological fixatives using image analysis to measure reaction product concentration. **J Histotechnol.** 18:119-125, 1995.
- MARLETTA M. A. Nitric Oxide Synthase: Aspects Concerning Structure and Catalysis. **Cell.** 78:927-930, 1994.
- MARLETTA M.A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **J Biol Chem.** 268:12231-34, 1993.
- MARTINS A.R., DIAS M.N., VASCONCELOS T.M., CALDO H., COSTA M.C.R., CHIMELLI L. and LARSON R.L. Microwave-stimulated recovery of myosin-V immunoreactivity from formalin-fixed, paraffin-embedded human CNS. **J. Neur. Methods** 01-06, 1999.
- MATSUMOTO T., NAKANE M., POLLOCK J.S., KUK J.E. and FORSTERMANN U. A correlation between soluble brain nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase activity is only seen after exposure of the tissue to fixative. **Neurosci. Lett.** 155:61-64, 1993.
- MAYER B. and HEMMENS B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. **Trends Biochem Sci;** 22:477-81, 1997.
- MISCHEL P.S., NGUYEN L.P. and VINTERS H.V. Cerebral cortical dysplasia associated with pediatric epilepsy. Review of neuropathological features and proposal for a grading system. **J. Neuropathol. Exper. Neurol.** 54: 137-154, 1995.
- MORITZ G.C., TENORIO F., ALLODI S. and MENDEZ-OTERO R. Expression of nitric oxide synthase in the developing rat hippocampus. **Neurosc Letters.** 263:89-92, 1999.

- MURAD F. Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cGMP Signal transduction system. **Adv Pharmacol** 26:19-33, 1994.
- NATHAN C. and HIBBS J.B. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. **Curr. Opin. Immunol.** 3: 65-70, 1991.
- NOCTOR S.C., FLINT A.C., WELSSMAN T.A., DAMMERMAN R.S. and KRIEGSTEIN T.A. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. **Nature.** 409:714-720, 2001.
- OHYU J. and TAKASHIMA S. Developmental characteristics of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) immunoreactive neurons in fetal to adolescent human brains. **Development Brain Research.** 110:193-202, 1998.
- PALMINI A, ANDERMANN F, OLIVIER A, *et al.* Focal neuronal migration disorders and intractable partial epilepsy: results of surgical treatment. **Ann Neurol.** 30: 750-757, 1991.
- PALMINI A, DA COSTA J. C., ANDERMANN F, *et al.* Focal electrographic ictal activity during acute cortical recording over dysplastic lesions in humans. **Epilepsia** 33:75, 1992.
- PALMINI A., GAMBARDELLA A., ANDERMANN F., DUBEAU F., DA COSTA J.C., OLIVIER A., TAMPIERI D., GLOOR P., QUESNEY F., ANDERMANN E., PAGLIOLI E., PAGLIOLI-NETO E., COUTINHO L., LEBLANC R. and KIM H. Intrinsic Epileptogenicity of Human Dysplastic Cortex As Suggested by Corticography and Surgical Results. **Annu. Neur.** Vol 37 476-487, 1995.
- RAKIC P. Specification of cerebral cortical areas. **Science** 241:170-176, 1988.
- RAKIC P. Principles of neural cell migration. **Experientia.** 46:882-891, 1990.
- SARNAT H. Cerebral dysgenesis: embryology and clinical expression. New York: Oxford University Press, 1992.
- SCHMIDT H. H. W. and WALTER U. NO at Work. **Cell.** 78:919-925, 1994.
- SHI S-R, COTE R.J. and TAYLOR C.R. Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present and future. **J. Histochem Cytochem.** 45:327-43, 1997.
- SIDMAN R. L. and RAKIC P. Neuronal migration, with special reference to developing human brain: A review. **Brain Res.** 62:1-35, 1973.

- SIMONATI A., TOSATI C., PIAZZOLA E. and RIZZUTO N. Cell proliferation and death: morphological evidence during corticogenesis in the developing human brain. **Microsc Res Tech** 45(6):341-52, 1999.
- SINGER W and GRAY CM. Visual feature integration and the temporal correlation hypothesis. **Annu Rev Neurosci** 18:555-86, 1995.
- SOARES T. J., COIMBRA T. M, **MARTINS A. R.**, PEREIRA A. G. F., CARNIO E. C., BRANCO L. G. S., ALBUQUERQUE-ARAUJO W. I. C., DE NUCCI G., FAVARETTO A. L. V., GUTKOWSKA J., MCCANN S.M. AND ANTUNES-RODRIGUES J. Atrial Natriuretic Peptide and Oxytocin Induce Natriuresis by Release of Cyclic GMP. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, 96: 278-283, 1999.
- SPREAFICO R., AVANZINI G. AND ANDERMANN F. Abnormal Cortical Development and Epilepsy 1ª edição, 1999.
- SUURMEYER A. J. H. and BOON M. E. Notes on the application of microwaves for antigen retrieval in paraffin and plastic tissue sections. **Eur J Morphol.** 31:144-50, 1993.
- TAYLOR D. C., FALCONER M. A., BRUTON C. J. and CORSELLIS J. A. N. Focal dysplasia of the cerebral cortex in epilepsy. **J. Neurol. Psychiatry.** 34:369-387, 1971.
- TESCH G. H., WEI M., NG Y-Y., ATKINS R. C. and LAN H. Y. Enhancement of immunodetection of cytokines and cytokine receptors in tissue sections using microwave treatment. **Cell Vision.** 2:435-39, 1995.
- TOLE S., CHRISTIAN C. and GROVE E. A. Early specification and autonomous development of cortical fields in the mouse hippocampus. **Development.** 124:4959-4970, 1997.
- TOWBIN H., STAEGELIN T. and GORDON J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci USA**; 76:4350-54, 1979.
- VINTERS H. V., FISHER R. S., CORNFORD M. E., *et al.* Morphological substrates of infantile spasms: studies based on surgically resected cerebral tissue. **Child Nerv. Syst.** 8:8-17, 1992.

- VON DER MALSBURG C. and SCHNEIDER W. A neural cocktail-party processor. **Biol Cybern.** 54(1):29-40, 1986..
- YACHNIS A.T., RORKE L.B and TROJANOWSKI M.D. Cerebellar displasias in humans: Development and possible relationship to glial and neuroectodermal tumors of the cerebellar vermis. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology.** 53(1):61 71, 1994.
- YAN X-X., and RIBAK C. E. Prenatal development of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Diaphorase Activity in the Human Hippocampal Formation. **Hippocampus.** 7:215-231, 1997.
- YEW D. T., WONG H. W., LI W. P., LAI H. W. L. and WAN-HUA AMY YU. Nitric oxide synthase neurons in different areas of normal aged and Alzheimer's brains. **Neuroscience.** 89(3):675-686, 1999.
- WOOD J. and GARTHWAITE J. Models of the diffusional spread of nitric oxide: Implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties **Neuropharmacology.** 33:1235-1244, 1994.
- ZANARDO R., COSTA E., FERREIRA H.H.A., ANTUNES E., **MARTINS A.R.**, MURAD F. and DE NUCCI G. Pharmacological and immunohistochemical evidence for a functional nitric oxide synthase system in rat peritoneal eosinophils. **Proc Natl Acad Sci USA.** 94: 14111-114, 1997.

## **SUMMARY**

## X. Summary

Nitric oxide (NO) is a diffusible and reactive molecular messenger in the nervous, vascular and immune systems. NO is not stored, but rather synthesized on demand from the amino acid L-arginine by a family of isoenzymes, the nitric oxide synthases (NOS). NO is a mediator of many physiological roles. In the brain, NO acts as a neurotransmitter/neuromodulator and regulate many cerebral functions. NO also plays patophysiological roles such as in epilepsy and some neurodegenerative diseases.

The heading of cortical dysplasia groups heterogenous disorders of development often associated with epilepsy. Some neocortical dysplasias are considered disorders of neuronal migration, which have variously been classified regarding their morfology or putative etiology.

We describe here cytoarchitetonc alterations in displatic tissue from patients affected by pharmacologically resistant epilepsy, which were obtained at surgery for epilepsy. This study shows the distribution of nNOS immunoreactivity-like structures in displastic and normal neocortex. Normal cortex was obtained from patients without history of neurologic disease and evidence of neuropathologic changes.

In the displastic cortex, cortical laminar disorganization was found in all cases. The strongest nNOS immunoreactivity was detected in the cytoplasm and nucleus of neurons in the deepest cortical layers and in the white matter. The normal cortex showed nNOS immunoreactivity predominantly in neurons of layers III e V. Varicose fibers were detected throughout both the normal and displastic cortex.

Assuming that the nNOS immunoreactivity in the deepest cortical neurons of displastic neocortex corresponds to a catalytically active form of the enzyme, we suggest that the release of NO by them might additively activate target neurons, possibly via soluble guanylate cyclase, thereby leading to their hypersynchronization, and eventually triggering an epileptic discharge.

