
**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEUROCIÊNCIAS
INSTITUTO DE PESQUISAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DO CÉREBRO**

DANIEL RODRIGO MARINOWIC

**AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO E NEURODIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-
TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS (iPSC) DE PACIENTES COM
DISPLASIA CORTICAL**

**PORTO ALEGRE,
2016**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEUROCIÊNCIAS
INSTITUTO DE PESQUISAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DO CÉREBRO

**AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO E NEURODIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-
TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS (iPSC) DE PACIENTES COM
DISPLASIA CORTICAL**

DANIEL RODRIGO MARINOWIC

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa DaCosta

Porto Alegre,
2016

Dados Internacionais de Catalogação-CIC

M332 Marinowic, Daniel Rodrigo.

Avaliação da migração e neurodiferenciação de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) de pacientes com displasia cortical. / Daniel Rodrigo Marinowic – Porto Alegre, 2016.

142 f. il. Inclui dois artigos científicos.

Tese (Doutorado) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de Concentração em Neurociências.

Orientador : Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa

1 CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS. 2. DISPLASIA CORTICAL. 3. EPILEPSIA REFRATÁRIA. I. Jaderson, Costa da Costa. II. Título

CDU 576

**Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária
Ceres Nascimento de Castro. CRB10/2117**



Dedico a minha família pelo esteio durante essa trajetória.

Ao meu pai Waldemar e minha mãe Líria pela educação e incentivo,

meu irmão Márcio pelo arquétipo de conduta de vida,

minha cunhada Graciela por engrandecer essa família através do meu amado Vicente.

Minha esposa Bárbara por sempre acreditar, ouvir e entusiasmar.

E novamente, a dois novos seres crescentes que logo abrilhantarão a citada família, sejam bem vindas!!!!



AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Jaderson Costa DaCosta, pelo brilhantismo na conduta de seus orientandos e pela capacidade de despertar o anseio em responder as interpelações científicas. Sem nenhuma dúvida, foi e sempre será minha grande inspiração. Obrigado pelos vívidos ensinamentos e pelas oportunidades.

Minha amiga e maestrina Dra. Denise Cantarelli Machado, por todos esses anos de aprendizado e companheirismo. Obrigado por sempre apresentar-se como oráculo as minhas dúvidas e proezas experimentais.

Minha querida amiga Alessandra Sebben, por toda recíproca científica e pelo auxílio em diversas etapas da construção dessa tese.

Minha amiga e fiel escudeira Fernanda Majolo, pelo tamanho empenho na concretização desta linha de pesquisa.

Aos meus colegas e amigos Juliano Borges, Ricardo Zalewski, Pâmela Azevedo, Gabriele Zaniratti e Zaquer Costa pelo pronto apoio que sempre apresentaram.

Meus queridos alunos de iniciação científica Ismael Plentz e Gabriela Pallamolla, pela dedicação e entusiasmo que sempre apresentaram, continuem assim!!

Meus queridos colegas e amigos Simone Salamoni e Ricardo Breda, obrigado pelo acolhimento e por todos esses anos de convívio e amizade.

Ao Dr. Vinícius Duval, pelo incansável auxílio e por sua ímpar solicitude aos que o procuram.

Ao meu amigo Dr. Milton Paulo de Oliveira, pelo acesso e apoio na aquisição da matéria basal dos experimentos.

A equipe do Programa de Cirurgia da Epilepsia em especial ao Dr. Eliseu Paglioli, Dr. André Palmini, Yuri Magalhães e Maria Dal Pozzo.

Meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram e me auxiliaram durante e execução desse trabalho.

*“Tenho dificuldade em aceitar que os resultados científicos,
principalmente em neurobiologia, sejam algo mais do que aproximações provisórias para serem saboreadas
por uns tempos e abandonadas
logo que surjam melhores explicações.
No entanto, o ceticismo relativo ao atual alcance da ciência,
especialmente no que diz respeito à mente,
não envolve menos entusiasmo na tentativa de
melhorar as aproximações provisórias”*

António R. Damásio

RESUMO

As alterações do desenvolvimento do córtex cerebral apresentam-se como um grupo de malformações com uma distinção e patogênese ainda não bem definidas. A displasia cortical focal (DCF) é uma das formas mais frequentes de malformações do desenvolvimento cortical, sendo a patologia subjacente a uma parcela significativa de epilepsias parciais refratárias ao tratamento medicamentoso. A displasia cortical focal engloba múltiplos tipos de alterações tanto na arquitetura cortical quanto em anormalidades citológicas. Palmini e colaboradores classificaram as displasias corticais focais de acordo com observações na substância branca e na arquitetura da camada cortical. Os mecanismos envolvidos na gênese da DCF são pouco investigados, principalmente pelo número limitado de casos e a falta de modelos experimentais adequados e suas causas provavelmente estão relacionadas a mutações somáticas. A falta de modelos pré-clínicos preditivos que possam ser utilizados no estudo da fisiopatologia e o histórico enfraquecido quando se trata em traduzir a descoberta terapêutica de modelos animais para o uso humano, fortalece a necessidade de estudar o desenvolvimento cerebral a partir de células originadas do próprio paciente. A geração de células iPSC e diferenciação tecidual específica de células de pacientes acometidos por doenças neurológicas relevantes possui um valor inestimável para a realização de testes além de fornecerem uma capacidade adicional e única para estudar o desenvolvimento inicial e a progressão das patologias associadas ao SNC.

O objetivo do presente trabalho é estabelecer um modelo celular de Displasia Cortical Focal através da geração de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) a partir de fibroblastos de pacientes afetados.

Fibroblastos humanos foram obtidos de biópsias de pele de dois pacientes com DCF e foram cultivados até a quinta passagem. Foi realizada análise imunopatológica e das vias de sinalização AKT/mTOR no tecido cerebral displásico. Células iPSC foram geradas a partir dos fibroblastos através da exposição a vetores virais contendo os genes OCT4, KLF4, SOX2, e C-MYC e caracterizadas por imunohistoquímica. Foi realizado ensaio de migração celular dos fibroblastos (24h, 48h e 72h) e das iPSC (3 dias e 7 dias). As células iPSC foram neurodiferenciadas e analisadas nos períodos de 14 dias, 22 dias e 35 dias. Nesses períodos, foram realizadas análises morfológicas, imunohistoquímica (polarização) e moleculares (genes relacionados a via PI3K/ATK/mTOR).

Ambos os pacientes foram diagnosticados com DCF tipo IIb. O paciente 01 apresentou valores maiores que o paciente 02 em relação à área marcada das vias AKT e mTOR, tanto na via fosforilada como não fosforilada no tecido cerebral, com diferenças estatisticamente significativas. Clones iPSC dos pacientes e controles foram gerados e caracterizados a partir dos fibroblastos de pele. Tanto as iPSC dos pacientes quanto do controle apresentaram morfologia e polarização semelhante a células nervosas após protocolo de neurodiferenciação. No ensaio de migração celular, fibroblastos com DCF migraram com mais intensidade em 24 horas ($p < 0,0001$) e 48 horas ($p < 0,001$). As células iPSC não apresentaram diferença no potencial de migração celular nos períodos analisados. Durante o protocolo de neurodiferenciação, as células iPSC dos pacientes com DCF apresentaram valores menores de expressão dos genes 4EBP-1, β -Catenina, CIAP-1, CIAP-2 e PI3K, e valores mais elevados da expressão de MCL 1. Alterações na migração celular no tecido adulto e em processos como de proliferação celular acentuada, deficiência de proteína de adesão celular, alteração na expressão de genes responsáveis pelo controle de apoptose e alteração na via PI3K responsável no sistema nervoso central pela sobrevivência celular, controle de apoptose, migração neuronal, desenvolvimento morfológico dos neurônios e formação das neurotransmissões, puderam ser evidenciadas nas células dos pacientes com DCF em relação aos pacientes controle e podem estar relacionadas com a formação do cérebro com displasia.

ABSTRACT

Changes in the cerebral cortex development are presented as a group of distinct defects with a not well-defined pathogenesis. The focal cortical dysplasia (FCD) is one of the most frequent form of cortical development malformation, that encompasses multiple types of changes both in the cortical architecture and cytological abnormalities. It is an underlying pathology of a significant proportion of partial epilepsy refractory to drug treatment. Especially the limited number of cases and the lack of suitable experimental models rarely document the mechanisms involved with the genesis of FCD. The scarce predictive preclinical models that can be used to study the pathophysiology and to translate the therapeutic discovery from animal models to human use, strengthens the need to study the brain development from cells originated from patients that harbor these central nervous systems diseases. The generation of iPSC cells and the differentiation into specific cells and tissues will provide important testing and an unique ability to study the development and progress of CNS diseases.

The objective of this study was to establish a cellular model of focal cortical dysplasia through the generation of induced pluripotent stem cells (iPSC) from fibroblasts derived from affected patients.

Human fibroblasts were obtained from skin biopsies from two patients and cultured up to the fifth passage. Immunofluorescence analysis of AKT/mTOR signaling pathways was performed in the dysplastic brain tissue. iPSC cells were generated from fibroblasts through transfection with a viral vector containing the genes OCT4, KLF4, SOX2, and C-MYC and characterized by immunohistochemistry. Cell migration co-cultured with fibroblast and iPSC was investigated. Morphological and molecular characterization of neurodifferentiated iPSC were performed by immunohistochemistry and PI3K/ATK/mTOR signaling pathway analysis. Both patients were diagnosed with FCD type Iib. The AKT and mTOR phosphorylated and non-phosphorylated was higher in brain sections from patient 01. iPSC clones from patients and controls were generated from skin fibroblasts. Both iPSC from patients and controls showed polarization and morphology similar to nerve cells. In the cell migration assay, fibroblasts derived from FCD migrate with greater intensity within 24 hours ($p < 0,0001$) and 48 hours ($p < 0,001$), and iPSC cells did not present difference in cell migration. During neurodifferentiation, iPSC cells from patients with FCD showed lower

values of 4EBP-1, β -catenin, CIAP-1, CIAP-2 and PI3K, and higher values of MCL 1 gene expression. Changes in cell migration in adult tissue, uncontrolled cell proliferation, cell adhesion protein deficiency, and alterations in the expression of genes responsible for apoptosis and PI3K pathway that are implicated with an complete and well successful CNS formation. Alterations in some of these were detected in cells and iPSC from patients with FCD and may be related to the ethiopathology of the disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formação das diferentes camadas corticais durante a neurogênese embrionária.....	22
Figura 2. Esquema ilustrativo da classificação de Palmini e colaboradores.....	24
Figura 3. Esquema ilustrativo da classificação segundo Blümcke e colaboradores.....	25
Figura 4. Diferentes células neurais humanas relacionadas a patologias do sistema nervoso central que podem ser eficientemente geradas por diferenciação (DD) ou por conversão em linhagem (LC) a partir de células iPSC para estudo de mecanismos de doenças.....	29
Figura 5. Esquema mostrando as vantagens do uso de células iPSC como modelos de doenças humanas.....	29
Figura 6. Potenciais aplicações das iPSC para a terapia celular e modelagem de doença e testes de novas drogas.....	30
Figura 7. Disposição dos fragmentos de pele em placa de Petri de 60 mm.....	35
Figura 8. Cultura de fibroblasto com confluência adequada para transfecção viral.....	38
Figura 9. Retirada manual/limpeza dos clones gerados.....	38
Figura 10. Detalhe da retirada/limpeza manual dos clones gerados.....	39
Figura 11. Imagem da visualização macroscópica dos clones gerados cultivados em placa de 60 mm² sobre Matrigel.....	39
Figura 12. Clone de iPSC apresentado áreas de diferenciação (setas) a serem retiradas manualmente pela manutenção diária dos cultivos (Aumento 200X).....	40
Figura 13. Captura de imagem de clone de iPSC no dia de repique.....	40
Figura 14. Representação do inserto contendo a membrana porosa inserida no poço de uma placa de cultura de 24 poços.....	41
Figura 15. Ensaio de migração celular de fibroblastos utilizando inserto com porosidade de 8 µm.....	42
Figura 16. Eletroencefalograma do Pct 01.....	47
Figura 17. Imagem de RM indicando area de displasia transmantica no lobo frontal direito, com indefinição e borramento da interface córtico-subcortical.....	47
Figura 18. Histopatologia do Pct 01.....	48

Figura 19. Eletroencefalograma do Pct 02	49
Figura 20. Imagem de RM indicando nódulos de heterotopia subcortical e periventricular no lobo frontal esquerdo, com indefinição e borrramento da interface córtico-subcortical.	49
Figura 21. Histopatologia do Pct 01	50
Figura 22. Imunofluorescência do tecido displásico	51
Figura 23. Análise da imunofluorescência das vias Akt e mTOR do tecido displásico....	51
Figura 24. Cultura primária de fibroblasto de pele	52
Figura 25. Captura de imagem de cultura das células após a exposição aos vetores virais.....	53
Figura 26. Captura de imagem da caracterização das iPSC através de microscopia confocal.	53
Figura 27. Captura de imagem das células iPSC após 20 dias de indução a neurodiferenciação	54
Figura 28. Captura de imagens de células após 35 dias de indução a neurodiferenciação.	55
Figura 29. Captura de imagem das células iPSC após protocolo de neurodiferenciação por 35 dias e marcação por imunofluorescência.....	55
Figura 30. Ensaio de migração celular de fibroblastos marcados com Rodamina	56
Figura 31. Ensaio de migração celular dos fibroblastos dos pacientes portadores de DCF e pacientes controles	57
Figura 32. Ensaio de migração celular de células iPSC marcadas com Rodamina.....	57
Figura 33. Gráfico representando ensaio de migração celular das iPSC após três e sete dias de indução a migração.....	58
Figura 34. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR de todos os genes analisados e todos os grupos do estudo	61
Figura 35. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene 4EBP-1 durante a neurodiferenciação das iPSC.	62
Figura 36. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene β-Catenina durante a neurodiferenciação das iPSC.	62
Figura 37. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene CIAP-1 durante a neurodiferenciação das iPSC.	62

Figura 38. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene CIAP-2 durante a neurodiferenciação das iPSC.	63
Figura 39. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene MCL 1 durante a neurodiferenciação das iPSC.	63
Figura 40. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene PI3K durante a neurodiferenciação das iPSC.	63

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Sequencias de <i>primers</i> utilizadas na avaliação da expressão de genes relacionados a via PI3K/AKT.....	45
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT ou PKB	via de sinalização Proteína kinase B
B27	Suplementação para cultura de neurônios
BDNF	fator neurotrófico derivado de cérebro (do inglês <i>Brain Derived Neurotropic Factor</i>)
cDNA	DNA complementar a um RNA
CO₂	Gás Carbônico
DAPI	Corante nuclear (do inglês <i>4',6-diamidino-2-phenilindol</i>)
DCF	Displasia Cortical Focal
DD	Diferenciação Direta
DMEM	Meio de cultura de células (do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DNase	Enzima que degrada Ácido Desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DPBS	Tampão salina (do inglês <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>)
EEG	Eletroencefalograma
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos (do inglês <i>Fibroblast Growth Fator</i>)
FITC	Isotocinato Fluoresceína
IAP	inibidores de apoptose (do inglês <i>Inhibitor of Apoptosis</i>)
iPSC	Células-Tronco Pluripotentes Induzidas (do inglês: <i>Induced Pluripotent Stem Cell</i>)
iROCK	Inibidor de ROCK quinase
ISCI	Iniciativa Internacional de Células-tronco (do inglês <i>International Stem Cell Initiative</i>)
KSR	Soro para suplementação de meio de cultura (do inglês <i>Knockout Serum Replacement</i>)
LC	Conversão em Linhagem (do inglês <i>Lineage Conversion</i>)
MAP2	Microtubulo Neuronal 2 (do inglês <i>Microtubule-Associated Protein 2</i>)

MDR	Resistência a múltiplos fármacos (do inglês <i>Multidrug Resistance</i>)
MOI	Multiplicidade de Infecção (do inglês <i>Multiplicity of Infection</i>)
mTOR	via de sinalização (do inglês: <i>Mammalian Target Rapamycin</i>)
N5	Meio de cultura para neurônios (do inglês <i>Neurobasal Medium</i>)
NeuN	Anti-núcleo neuronal (do inglês <i>Neuronal Nuclear Antigen</i>)
NF-kB	Fator Nuclear Kappa B (do inglês <i>Factor Nuclear Kappa B</i>)
NFL	Neurofilamento L (do inglês <i>neurofilament protein – L</i>)
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PI3K	via de sinalização Fosfoinosidido-3-kinase (do inglês <i>phosphoinositide-3-dependent kinase</i>)
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RM	Ressonância Magnética
RNA	Ácido Ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>)
SCNT	Transferência Nuclear de Células Somáticas (do inglês: <i>Somatic Cell Nuclear Transfer</i>)
SeV	Vírus SENDAI (do inglês <i>Sendai Vírus</i>)
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
WNT	Via de sinalização do inglês <i>Wingless/integrated</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 JUSTIFICATIVA	20
3 REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1 MALFORMAÇÕES CORTICAIS	21
3.2 DISPLASIA CORTICAL FOCAL	23
3.3 CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS (iPSC)	26
3.4 iPSC E AS DOENÇAS NEUROLÓGICAS.....	27
4 OBJETIVO	33
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
5 METODOLOGIA.....	34
5.1 ASPECTOS ÉTICOS	34
5.2 OBTENÇÃO DOS FIBROBLASTOS	34
5.3 TESTE DE CONTAMINAÇÃO PARA MYCOPLASMA	35
5.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO DISPLÁSICO	36
5.5 ANÁLISE DA FOSFORILAÇÃO DA VIA AKT e mTOR	36
5.6 GERAÇÃO DAS CÉLULAS iPSC	37
5.7 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR	40
5.8 NEURODIFERENCIAÇÃO DAS iPSC	42
5.9 AVALIAÇÃO DA NEURODIFERENCIAÇÃO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA ...	43
5.10 ANÁLISE MOLECULAR ATRAVÉS DE qRT-PCR.....	44
6 RESULTADOS	46
6.1 PACIENTES ENVOLVIDOS NO ESTUDO.....	46
6.2 ANÁLISE VIA AKT/mTOR.....	50
6.3 OBTENÇÃO DOS FIBROBLASTOS DE PELE	51
6.4 REPROGRAMAÇÃO CELULAR.....	52

6.5 NEURODIFERENCIAÇÃO DA iPSC	54
6.6 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR	56
6.7 ANÁLISE MOLECULAR	58
7 DISCUSSÃO	64
8 CONCLUSÃO.....	83
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
ANEXOS	94
ANEXO 1 - ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO EM REVISTA INDEXADA	94
ANEXO 2 - ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO EM REVISTA INDEXADA	105

1 INTRODUÇÃO

A displasia cortical focal (DCF) é uma das formas mais frequentes de malformações do desenvolvimento cortical, sendo a patologia subjacente a uma parcela significativa de epilepsias parciais refratárias ao tratamento medicamentoso (PALMINI et al., 2004).

Um subconjunto de patologias tem sido associado principalmente a alterações na migração celular e neurodiferenciação. Essa categoria de anormalidades do desenvolvimento cortical inclui as lisencefalias as polimicrogurias e as displasias corticais focais (GOLDEN, 2001; RORKE, 1994).

As manifestações clínicas da DCF relacionam-se com extensão e localização das lesões displásicas. As crises convulsivas estão sempre presentes, porém, outros achados como afasias, déficits intelectuais, alterações de comportamento, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e déficits de memória podem compor o quadro neurológico (PASCUAL-CASTROVIEJO et al., 2012).

Os mecanismos envolvidos na gênese da displasia cortical focal são pouco investigados, principalmente pelo número limitado de casos e a falta de modelos experimentais adequados (KABAT; KROL, 2012) bem como suas causas que provavelmente estão relacionadas a mutações somáticas clonais que afetam semelhantes vias de sinalização em determinados pacientes (KUZNIECKY, 2015).

A geração de células iPSC e diferenciação tecidual específica de células de pacientes acometidos por doenças neurodegenerativas possui um valor inestimável para a realização de testes além de fornecerem uma capacidade adicional e única para estudar o desenvolvimento inicial e a progressão das patologias associadas ao SNC (ICHIDA; KISKINIS, 2015; PARENT; ANDERSON, 2015). Células iPSC podem ser geradas de pacientes portadores de uma determinada doença e posteriormente diferenciadas para o células adultas que expressem a doença. Com base nas doenças em que o fenótipo é expresso nas células adultas, pode-se realizar a edição e correção no genoma dessas células, rastrear compostos capazes de corrigir a patologia celular ou avaliar a possível toxicidade de algumas drogas (ZHANG; ZHANG; XIE, 2013).

O presente estudo tem como objetivo apresentar um modelo celular de DCF e estudar as possíveis alterações nos processos de migração e neurodiferenciação a partir de fibroblastos de pacientes afetados.

2 JUSTIFICATIVA

Estudos utilizando modelos celulares autólogos fielmente representam as doenças humanas reais e suas peculiaridades fisiológicas individuais. O uso de células iPSC originadas de pacientes portadores de displasia cortical focal permitirá uma investigação, em todas as fases do neurodesenvolvimento, das evidências clínicas e moleculares encontradas no tecido afetado adulto, devido a oportunidade que a metodologia das iPSC oferece de obtenção de células em nível embrionário a partir de um tecido adulto afetado.

O entendimento global do neurodesenvolvimento, das neuropatologias e do funcionamento normal do sistema cerebral, depende do conhecimento amplo da formação do cérebro, do padrão das conexões entre os neurônios, e entre as regiões cerebrais, bem como das comunicações sinápticas que constituem essas devidas conexões desde sua gênese até sua fase de maturação e manutenção.

Estudos com iPSC constituem uma exímia ferramenta para experimentos de alto rendimento, permitindo, além da investigação fisiológica e patológica, a construção de plataformas de triagem de novos medicamentos para diversas doenças humanas.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 MALFORMAÇÕES CORTICAIS

Os avanços nos estudos neurobiológicos identificaram vários marcos na formação do neuroblasto, migração, organização cortical, diferenciação neuronal, formação de conectividade e morte celular (GREIG et al., 2013; PARNAVELAS, 2000). Certas anomalias do neurodesenvolvimento podem ser atribuídas a um desses estágios de citogênese e histogênese no primeiro trimestre de gestação e para de crescimento e diferenciação que ocorrem no segundo e terceiro trimestres (WICHTERLE et al., 2001). Durante o primeiro trimestre, os neurônios pós-mitóticos que acabarão residindo no córtex, surgem na zona ventricular adjacente aos ventrículos. Eles migram ao longo das glias radiais para formar as várias camadas do córtex cerebral. Cerca de 1/3 dos neurônios não utilizam o arcabouço da glia radial e migram de forma tangencial na direção cortical (RAKIC, 1978). É necessário que os neurônios que estão migrando passem através de neurônios que já se encontram em posição no córtex, levando a uma laminação em que o neurônio recém-chegado a zona cortical resida na superfície mais externa do córtex formando (Figura 01). Esta organização final de apenas seis camadas histologicamente distintas reúne uma extraordinária diversidade de subtipos neuronais, que servem como blocos para um computacionalmente poderoso circuito neural. Nos últimos anos, um enorme progresso tem sido feito para a compreensão dos eventos moleculares que controlam o desenvolvimento do córtex cerebral bem como das patologias associadas a alterações nesse processo (GREIG et al., 2013).

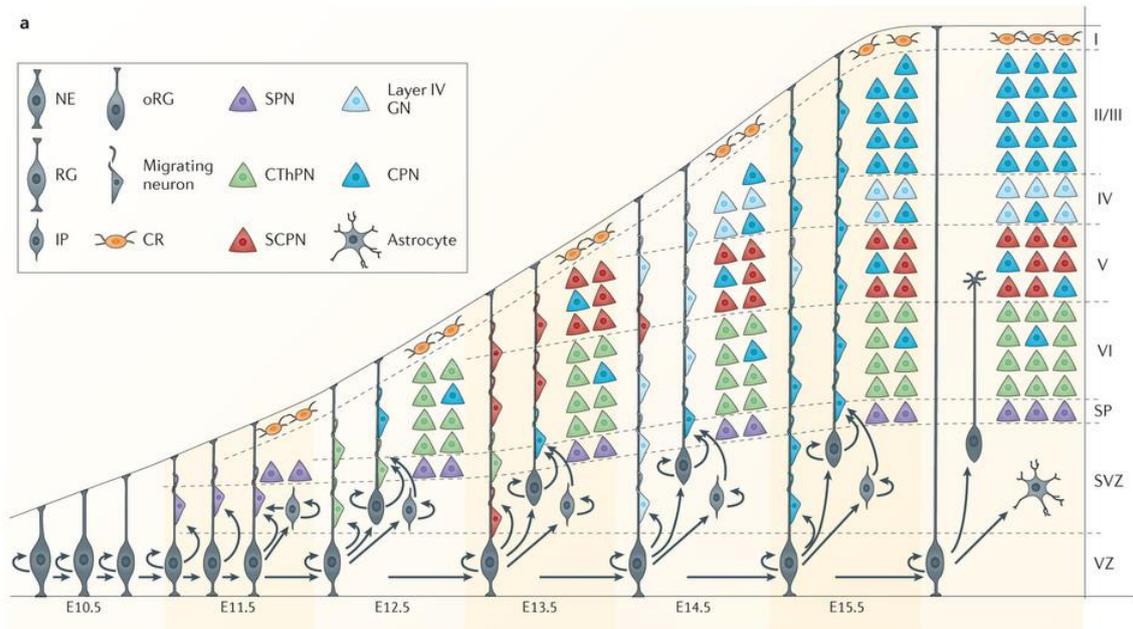


Figura 1. Formação das diferentes camadas corticais durante a neurogênese embrionária. A glia radial (RG) presente na zona ventricular (VZ) começa a servir de arcabouço para neurônios de projeção em torno de 11,5 dias do período embrionário (E11,5). Ao mesmo tempo, são geradas células progenitoras intermediárias (IP) e outras células gliais (oRG), estabelecendo a zona subventricular (SVZ) atuando no aumento da produção neuronal. Depois de completada a neurogênese, as células progenitoras neurais passam ao papel gliogênico, gerando os astrócitos e oligodendrócitos. As células Cajal-Retzius migram principalmente da camada neocortical I. Outros neurônios são nascidos na zona ventricular (VZ) ou sub ventricular (SVZ) migram ao longo dos processos gliais para chegar ao seu destino final laminar. Figura retirada de Greig LC, et al. Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. Nature reviews Neuroscience (GREIG et al., 2013).

As alterações do desenvolvimento do córtex cerebral apresentam-se como um grupo de malformações com uma distinção e patogênese ainda não bem definidas. Entre as malformações corticais, um subconjunto de patologias tem sido associado principalmente a alterações na migração celular e neurodiferenciação. Essa categoria de anormalidades do desenvolvimento cortical inclui as lisencefalias as polimicrogurias e as displasias corticais focais. Atualmente investiga-se que além das alterações na migração celular e neurodiferenciação, outros fatores são considerados na patogênese das malformações corticais, como a proliferação celular, morte celular, crescimento e desenvolvimento intracortical pós migração celular, formações dos axônios e dendritos (GOLDEN, 2001; RORKE, 1994).

A incidência das malformações corticais na população ainda é desconhecida. Uma das grandes dificuldades de se obter dados sobre a incidência de malformações é em grande parte devido à heterogeneidade de alterações que compõem esse grupo de anomalias (GOLDEN, 2001). Nas cirurgias de epilepsia refratária ao tratamento medicamentoso, a

incidência de pacientes com displasia cortical focal (DCF) varia entre 12% e 40%, sendo considerada uma doença de frequência relativamente alta na cirurgia da epilepsia (ARAI et al., 2012; BLUMCKE et al., 1999; NORDBORG et al., 1999; PRAYSON; SPREAFICO; VINTERS, 2002). As maiorias das patologias associadas à alteração na migração celular durante a corticogênese apresentam uma variedade de genes que podem estar associados ao fenótipo doente, porém em alguns casos os aparecimentos são esporádicos. Vários fatores ambientais já foram associados a malformações corticais. A exposição materna durante o período gestacional a agentes como etanol, alguns ácidos, mercúrio, radiação, exposição a agentes virais, entre outros, já foram associados como causadores de alterações no neurodesenvolvimento cortical (GOLDEN, 2001).

3.2 DISPLASIA CORTICAL FOCAL

A displasia cortical focal é uma das formas mais frequentes de malformações do desenvolvimento cortical, sendo a patologia subjacente a uma parcela significativa de epilepsias parciais refratárias ao tratamento medicamentoso (PALMINI et al., 2004). A displasia cortical focal engloba múltiplos tipos de alterações, divididas em dois principais grupos: O primeiro grupo está caracterizado por anormalidades de arquitetura cortical através da desorganização colunar dada pela formação de micro colunas orientadas verticalmente constituídas de pelo menos oito neurônios e uma interrupção laminar pela alteração da composição da sexta camada tangencial do córtex. O segundo grupo possui anormalidades citológicas com células neuronais hipertróficas, fora do local anatômico, encontradas na camada V, e/ou células abalonadas com membrana mal definida, com núcleo único ou múltiplos e citoplasma eosinofílico com características de células neuronais e linhagem glial, característica da displasia cortical focal tipo Taylor, descrita pela primeira vez em 1971 (KABAT; KROL, 2012; TAYLOR et al., 1971).

Taylor descreveu em seu artigo original a DCF como uma patologia distinta caracterizada por uma desorganização laminar e neurônios displásicos. Com um comprometimento da organização do córtex em suas seis camadas histológicas tradicionalmente conhecidas. Descreveu achados histopatológicos semelhantes às anormalidades encontradas na esclerose tuberosa, entretanto, quando comparadas mais

detalhadamente, diferenças entre as imagens puderam ser notadas e classificadas (TAYLOR et al., 1971).

Palmini e colaboradores em 2004 (PALMINI et al., 2004) classificaram as displasias corticais focais de acordo com observações na substância branca e na arquitetura da camada cortical. As classificações foram descritas da seguinte forma: Tipo I - Presença de neurônios heterotópicos na substância branca, alteração na arquitetura da camada cortical e presença de neurônios gigantes. Tipo IIa - Presença de neurônios heterotópicos na substância branca, alteração na arquitetura da camada cortical, presença de neurônios gigantes e presença de células dismórficas. Tipo IIb - Presença de neurônios heterotópicos na substância branca, alteração na arquitetura da camada cortical, presença de neurônios gigantes, presença de células dismórficas e presença de neurônios abalonados (Figura 2).

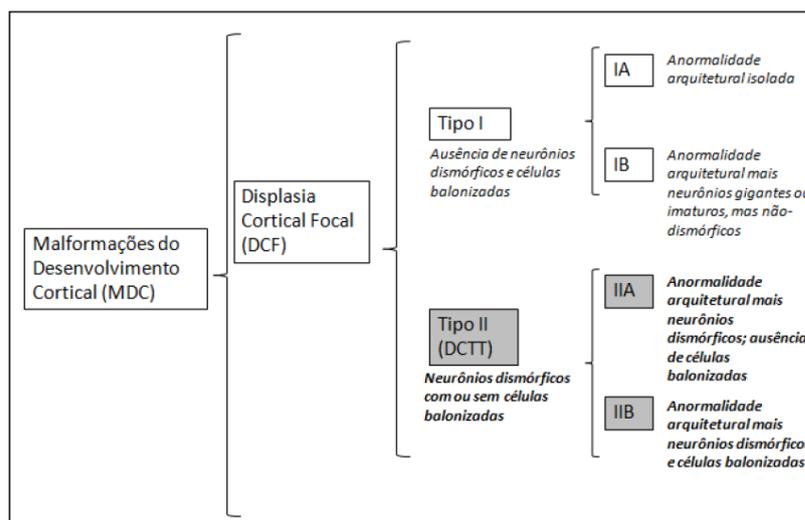


Figura 2. Esquema ilustrativo da classificação de Palmmini e colaboradores. Figura retirada de Palmmini, A. et al. Terminology and classification of the cortical dysplasias. *Neurology*. 2004;62 (PALMINI et al., 2004).

No ano de 2011, Blümcke e colaboradores (BLUMCKE et al., 2011) modificaram a classificação de Palmmini, distinguindo três tipos de displasia cortical focal como Tipo I (isolada), II (isolada) e III (associada com a lesão principal) e suas subdivisões. DCF tipo Ia - Laminação radial anormal do córtex. Tipo Ib - Laminação tangencial anormal do córtex. Tipo Ic - Laminação radial e tangencial do córtex. DCF tipo IIa - Presença de neurônios dismórficos. Tipo IIb - Presença de células abalonadas DCF tipo IIIa - Laminação cortical do lobo temporal associada a esclerose hipocampal. Tipo IIIb - Adjacente a tumor glioneural.

Tipo IIIc - Adjacente a malformações vasculares. Tipo IIIId - Adjacente a outras patologias associadas (traumas, hipóxia isquemia, encefalopatias, entre outras) (Figura 3).

FCD Type I (isolated)	Focal Cortical Dysplasia with abnormal radial cortical lamination (FCD Ia)	Focal Cortical Dysplasia with abnormal tangential cortical lamination (FCD Ib)		Focal Cortical Dysplasia with abnormal radial and tangential cortical lamination (FCD Ic)
FCD Type II (isolated)	Focal Cortical Dysplasia with dysmorphic neurons (FCD IIa)		Focal Cortical Dysplasia with dysmorphic neurons and balloon cells (FCD IIb)	
FCD Type III (associated with principal lesion)	Cortical lamination abnormalities in the temporal lobe associated with hippocampal sclerosis (FCD IIIa)	Cortical lamination abnormalities adjacent to a glial or glio-neuronal tumor (FCD IIIb)	Cortical lamination abnormalities adjacent to vascular malformation (FCD IIIc)	Cortical lamination abnormalities adjacent to any other lesion acquired during early life, e.g., trauma, ischemic injury, encephalitis (FCD IIIId)

Figura 3. Esquema ilustrativo da classificação segundo Blümcke e colaboradores. Figura retirada de Blumcke I, *et al.* The clinicopathologic spectrum of focal cortical dysplasias: a consensus classification proposed by an ad hoc Task Force of the ILAE Diagnostic Methods Commission. *Epilepsia*. 2011;52(1):158-74 (BLUMCKE et al., 2011).

O diagnóstico da DCF é inicialmente dado por técnicas de neuroimagem, através do exame de ressonância magnética (RM) do cérebro, e confirmada pelo diagnóstico anatomopatológico após análise de biópsia retirada na ressecção cortical para o tratamento da epilepsia refratária (TASSI et al., 2001; URBACH et al., 2002). A análise histopatológica do tecido displásico permite a classificação das DCF's através das suas características estruturais, da arquitetura das camadas corticais, da presença de neurônios heterotópicos na substância branca e presença de neurônios gigantes ou abalonados.

Nos casos de DCF, as crises convulsivas geralmente iniciam na infância, sendo a refratariedade a medicação um achado comum entre os pacientes (TASSI et al., 2001). A remissão das crises costuma ocorrer após intervenção cirúrgica, entretanto, sugeriu-se que, com o avanço da idade as crises podem também diminuir (ANDERSON; HARDER; DUNCAN, 2011). Comumente, as regiões extra temporais são as mais afetadas na DCF, sendo a região do lobo frontal com maior descrição de alterações estruturais (COLOMBO et al., 2003; WAGNER et al., 2011). As manifestações clínicas da DCF relacionam-se com extensão e localização das lesões displásicas. As crises convulsivas estão sempre presentes, porém, outros achados como afasias, déficits intelectuais, alterações de comportamento, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e déficits de memória podem compor o quadro neurológico (PASCUAL-CASTROVIEJO et al., 2012).

Os mecanismos envolvidos na gênese da displasia cortical focal são pouco investigados, principalmente pelo número limitado de casos e a falta de modelos experimentais adequados (KABAT; KROL, 2012). As causas ainda desconhecidas da DCF provavelmente estão relacionadas a mutações somáticas clonais que afetam semelhantes vias de sinalização em determinados pacientes (KUZNIECKY, 2015). Entre algumas vias de sinalização estudadas, estudos apresentam resultados de um aumento na sinalização de mTOR em pacientes portadores de DCF com base nas moléculas forforiladas como as proteínas ribossomais S6. Esse achado é particularmente pertinente a DCF tipo IIb onde de 80% a 90% dos neurônios abalonados e neurônios gigantes presentes no córtex desses pacientes apresentam um aumento na fosforilação dessas proteínas (HSU, P. P. et al., 2011). Alguns casos de DCF apresentam ativação de moléculas relacionadas à fosforilação da via Fosfoinosídeo-3-quinase (PI3K – do inglês *phosphoinositide-3-dependent kinase*) e da via Proteína quinase B (AKT ou PKB) nos tecidos displásicos (ZHOU et al., 2009). A fosforilação da via PI3K em resposta a algum estímulo, está relacionada a um conjunto coordenado de eventos que controlam o crescimento celular, início do ciclo celular, migração e sobrevivência celular (CANTLEY, 2002).

3.3 CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS (iPSC)

As duas conquistas consideradas mais relevantes para medicina regenerativa são: a reprogramação de células somáticas através da transferência nuclear para ovócitos anucleados e a posterior reprogramação de células somáticas através da ativação de fatores de transcrição pela transfecção de genes que conferem a pluripotência as células.

A primeira destas conquistas foi relatada no ano de 1962 através dos experimentos de John Gurdon. Ele mostrou que ovócitos de anfíbios anucleados são capazes de restaurar a pluripotência ao material nuclear extraído de células adultas através da técnica chamada Transferência Nuclear de Células Somáticas (SCNT do inglês *Somatic Cell Nuclear Transfer*). A técnica SCNT foi demonstrada com sucesso em diversas células, incluindo mamíferos como carneiros, ratos, coelhos e humanos (CAMPBELL et al., 1996; CHESNE et al., 2002; CHUNG, Y. G. et al., 2014; NITYANANDAM; BALDWIN, 2015; TACHIBANA et al., 2013).

Em 2006, os pesquisadores japoneses Kazutoshi Takahashi e Shinya Yamanaka (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006), apresentaram a técnica de produção de células pluripotentes através da reprogramação de fibroblastos de camundongos e, em 2007, em células humanas (TAKAHASHI et al., 2007). Estas células foram reprogramadas pela adição de quatro diferentes genes: Oct4, KLF-4, SOX-2, e C-MYC, por meio de vetores virais. As células produzidas por esse método são chamadas de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC do inglês *Induced Pluripotent Stem Cells*) e são muito similares às células-tronco embrionárias, apresentando as mesmas características de auto renovação e potencial de diferenciação em linhagens dos três folhetos embrionários. (FRIES et al., 1994; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006).

No ano de 2012, Gurdon e Yamanaka dividiram o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia por apresentaram uma mudança no paradigma referente à compreensão da diferenciação celular e da plasticidade de células diferenciadas (NITYANANDAM; BALDWIN, 2015).

Sabe-se atualmente que as células somáticas podem ser reprogramadas através da transferência nuclear em ovócitos anucleados, pela fusão celular entre células somáticas e células embrionárias, indicando que ovócitos anucleados e células embrionárias podem conferir totipotência ou pluripotência às células somáticas ou então transfecção de material genético responsável por conferir pluripotência em nível embrionário (FRIES et al., 1994).

3.4 iPSC E AS DOENÇAS NEUROLÓGICAS

O estudo das alterações neurológicas e neuropsiquiátricas tem sido um grande desafio para os pesquisadores. Apesar de investimentos significativos na área, à falta de modelos pré-clínicos preditivos que possam ser utilizados no estudo da fisiopatologia, estudo de mecanismos, identificação de alvos terapêuticos e testes de novas drogas, são bastante escassos (DOLMETSCH; GESCHWIND, 2011). Apesar dos modelos animais serem valiosos na elucidação de doenças e no direcionamento a marcadores e genes relacionados a determinadas patologias, eles possuem um histórico enfraquecido quando se trata em traduzir a descoberta terapêutica para o uso humano (DRAGUNOW, 2008). A importância da utilização de células humanas para o estudo de doenças é evidente pelo número de drogas que

apresentam eficácia e segurança quando testadas em modelos animais, porém, subsequentemente falham em ensaios clínicos, sendo em parte atribuído as diferenças entre as espécies (ICHIDA; KISKINIS, 2015). Estudos utilizando tecido *post mortem* podem oferecer uma grande janela de alterações estruturais do cérebro em nível celular e molecular. Uma prova disso é que cerca de 90% das drogas aprovadas em modelos experimentais e testadas em ensaios clínicos, deixam de ser aprovadas por falhas na eficácia ou pela descoberta de toxicidade não esperada para o ensaio (WOOSLEY; COSSMAN, 2007; ZHANG et al., 2013). Modelos de doenças que fielmente representam as doenças humanas reais e suas peculiaridades fisiológicas são necessárias para melhorar a taxa de sucesso das descobertas e desenvolvimentos de novas drogas (ZHANG et al., 2013).

Considerando esses levantamentos e limitações, surge a necessidade de estudar o desenvolvimento cerebral a partir de células originadas do próprio paciente (DOLMETSCH; GESCHWIND, 2011). A disponibilidade e a facilidade de obtenção são fundamentais na escolha das células para estudos *in vitro*.

Os fibroblastos são encontrados no estroma de diferentes tecidos, eles desempenham um papel fundamental na manutenção da integridade e homeostase do tecido conjuntivo, sendo as principais células envolvidas no processo de reparo tecidual local (CLEARY; GIBSON, 1983). A reprogramação de células somáticas adultas, como fibroblastos, em nível embrionário, é uma abordagem atraente e promissora para a medicina regenerativa, possibilitando também o estudo *in vitro* de doenças genéticas complexas que ainda não são bem compreendidas.

As células iPSC diferenciadas em tecidos específicos de difícil obtenção como cardiomiócitos, células hepáticas e neurônios, são utilizadas em estudos translacionais para testes de fármacos. A geração de células iPSC e diferenciação tecidual específica de células de pacientes acometidos por doenças neurodegenerativas (Figura 4) possui um valor inestimável para a realização de testes além de fornecerem uma capacidade adicional e única para estudar o desenvolvimento inicial e a progressão das patologias associadas ao SNC (ICHIDA; KISKINIS, 2015; PARENT; ANDERSON, 2015). Modelos celulares apresentam alta relevância para o estudo de doenças em humanos (Figura 5), fornecendo excelentes condições para o entendimento de mecanismos e constituindo uma exímia ferramenta para experimentos de alto rendimento, permitindo inclusive a construção de plataformas para a

triagem de novos medicamentos em diversas doenças humanas (DOLMETSCH; GESCHWIND, 2011).

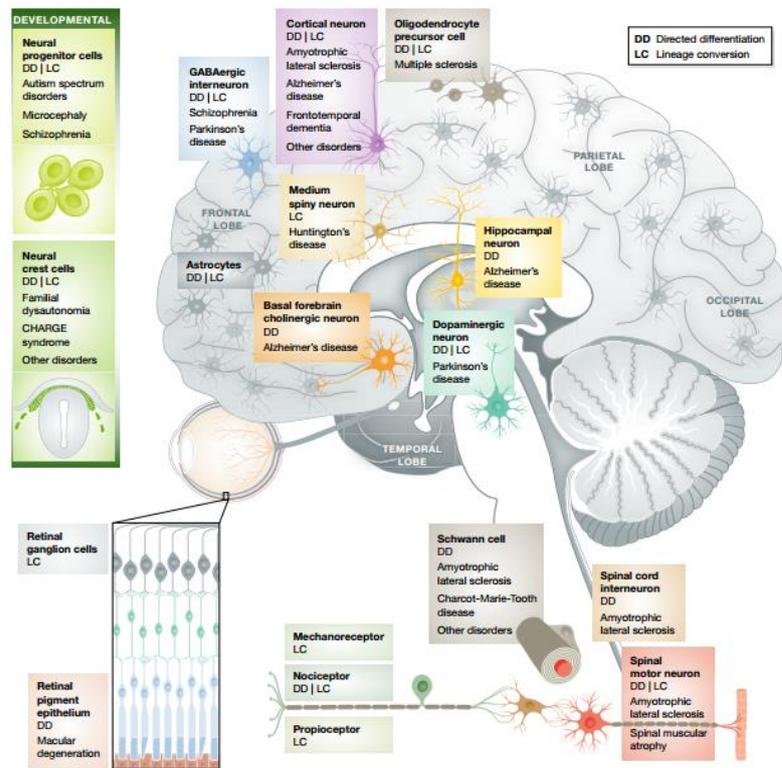


Figura 4. Diferentes células neurais humanas relacionadas a patologias do sistema nervoso central que podem ser eficientemente geradas por diferenciação (DD) ou por conversão em linhagem (LC) a partir de células iPSC para estudo de mecanismos de doenças. Figura retirada de Ichida JK, *et al.* Probing disorders of the nervous system using reprogramming approaches. The EMBO journal. 2015;34(11):1456-77. (ICHIDA; KISKINIS, 2015).

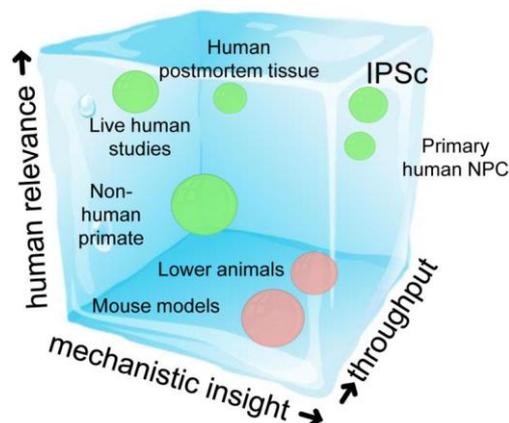


Figura 5. Esquema mostrando as vantagens do uso de células iPSC como modelos de doenças humanas. O uso deste tipo de modelo é de alta relevância em humanos, muito útil para o estudo de mecanismos fisiopatológicos e permite a realização de experimentos de alto rendimento, devido à facilidade de obtenção de um grande número de células. Figura retirada de Dolmetsch R, *et al.* The human brain in a dish: the promise of iPSC-derived neurons. Cell. 2011;145(6):831-4 (DOLMETSCH; GESCHWIND, 2011).

A aplicação da tecnologia da geração de células iPSC está baseada em duas grandes áreas de atuação, a geração de células específicas para o uso em medicina regenerativa e/ou a modelagem de doenças e triagem de novos fármacos (Figura 6).

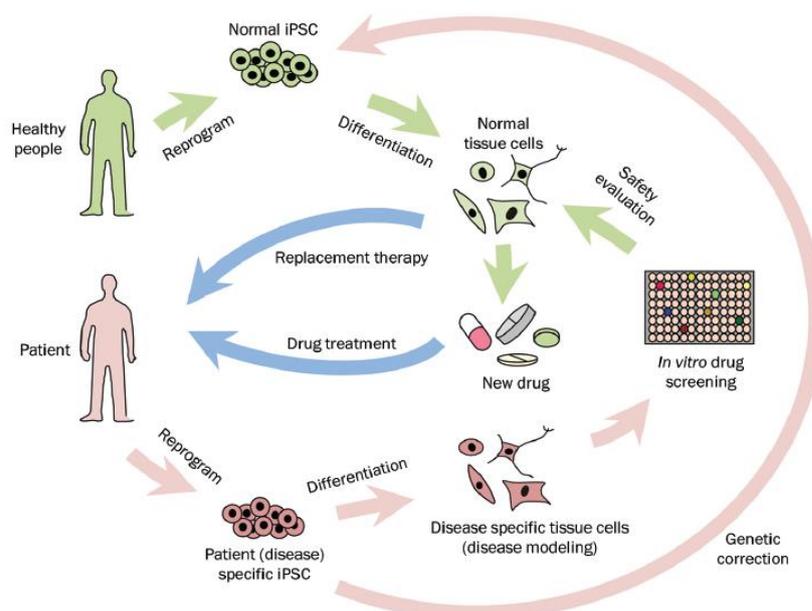


Figura 6. Potenciais aplicações das iPSC para a terapia celular e modelagem de doença e testes de novas drogas. Células iPSC de pacientes saudáveis podem ser geradas e diferenciadas para vários tipos celulares saudáveis e utilizadas para terapia celular em pacientes específicos ou utilizadas como controle em testes de novas drogas. Células iPSC de pacientes acometidos por uma determinada doença podem ser geradas, corrigidas geneticamente para uso em terapia celular, utilizadas como modelo para estudos do desenvolvimento embrionário das doenças e ensaios de *screening* e desenvolvimento de novas drogas. Figura retirada de Zhang R, *et. al.* iPSCs and small molecules: a reciprocal effort towards better approaches for drug discovery. *Acta pharmacologica Sinica*. 2013;34(6):765-76 (ZHANG et al., 2013).

Um aspecto bastante empolgante no uso de iPSC é a possibilidade de gerar células autólogas para o transplante em terapia celular. A origem somática e autóloga das células iPSC tem minimizado os problemas éticos e religiosos e também de rejeição imunológica relacionados principalmente ao uso de células embrionárias na medicina regenerativa (ZHANG et al., 2013). Estratégias de substituição celular já foram relatadas para diferentes órgãos e diferentes patologias utilizando células iPSC. Hanna e colaboradores demonstraram pela primeira vez que células iPSC derivadas de um modelo de rato com anemia falciforme

puderam ser geneticamente corrigidas e diferenciadas *in vitro* para precursores hematopoiéticos e transplantadas nos animais doentes. Essas células restabeleceram o funcionamento normal do sistema hematopoiético nos animais com anemia falciforme (HANNA et al., 2007).

No ano de 2008, Wernig e colaboradores geraram neurônios dopaminérgicos funcionais a partir de células iPSC e transplantaram esses neurônios em um modelo de ratos portadores de Doença de Parkinson. Os animais restabeleceram a atividade normal de dopamina e reduziram os sintomas característicos da doença (WERNIG et al., 2008).

Plataformas de descoberta e desenvolvimento de novas drogas utilizando modelos de doenças geradas a partir de iPSC de pacientes acometidos, é considerada agora uma ferramenta extremamente útil para tentar preencher a lacuna existente entre os modelos animais e os ensaios clínicos. Para isso, células iPSC devem ser geradas de pacientes portadores de uma determinada doença e posteriormente diferenciadas para o células adultas que expressem a doença. Com base nas doenças em que o fenótipo é expresso nas células adultas, pode-se realizar a edição e correção no genoma dessas células, rastrear compostos capazes de corrigir a patologia celular ou avaliar a possível toxicidade de algumas drogas (ZHANG et al., 2013).

Neurônios ou células gliais humanas não estão prontamente disponíveis para a pesquisa experimental. Estudos de patologias associadas ao SNC têm sido tradicionalmente limitados a modelos animais ou linhagens celulares de menor relevância para o entendimento da fisiopatologia. O advento das células iPSC forneceu uma nova abordagem para o entendimento das desordens neurológicas principalmente no seu período de desenvolvimento embrionário (DOLMETSCH; GESCHWIND, 2011; ICHIDA; KISKINIS, 2015; ZHANG et al., 2013).

Atualmente, as células-tronco pluripotentes induzidas vem sendo uma crescente nos estudos de doenças neurológicas, apresentando modelos celulares de diversas ordens como esclerose múltipla (SONG, B. et al., 2012), atrofia cerebelar (LUO et al., 2012), Alzheimer (DUAN et al., 2014; HOSSINI et al., 2015; ISRAEL et al., 2012; YAGI et al., 2011), Síndrome de Rett (DJURIC et al., 2015; LIVIDE et al., 2015; MARCHETTO et al., 2010; WILLIAMS et al., 2014), esclerose lateral amiotrófica (DEVLIN et al., 2015; KISKINIS et al., 2014; SAREEN et al., 2013; WAINGER et al., 2014), ataxia telangiectasia (LEE, P. et al., 2013), síndrome de Dravet (JIAO et al., 2013), disautonomia familiar (LEE, G. et al.,

2009), síndrome do X frágil (DOERS et al., 2014), síndrome de Gaucher (TISCORNIA et al., 2013), doença de Huntington (GUO et al., 2013; YAO et al., 2015), síndrome de Lesch-Nyhan (MEKHOUBAD et al., 2012), microencefalia (LANCASTER et al., 2013), doença de Parkinson (CHUNG, C. Y. et al., 2013; REINHARDT et al., 2013; SANDERS et al., 2014), esquizofrenia (PAULSEN BDA et al., 2012; ROBICSEK et al., 2013; YOON et al., 2014), entre outras. A tecnologia da reprogramação celular trouxe a realidade da heterogeneidade clínica observada em pacientes: é a observação clínica levada à pesquisa em laboratório. (ICHIDA; KISKINIS, 2015).

4 OBJETIVO

Estabelecer um modelo celular para estudo da displasia cortical focal baseado na indução de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) a partir de fibroblastos de pacientes afetados.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar as possíveis diferenças na neurodiferenciação de células-tronco pluripotentes induzidas de pacientes com displasia cortical e pacientes controle;

Avaliar o potencial de migração dos fibroblastos e das células-tronco pluripotentes induzidas;

Investigar possíveis alterações na via AKT e na via mTOR nos tecidos displásicos;

Quantificar a atividade de genes relacionados a neurogênese, migração celular e fosforilação da via PI3K/AKT durante diferentes períodos da neurodiferenciação de iPSC de pacientes afetados e pacientes controle e tecido cerebral displásico;

Correlacionar as alterações histológicas e de vias de sinalização do tecido displásico e das células iPSC geradas.

5 METODOLOGIA

5.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS sob o número CAAE 17943213.9.0000.5336 com parecer número 485.927 de 10/12/2013.

5.2 OBTENÇÃO DOS FIBROBLASTOS

Os fibroblastos humanos foram obtidos de biópsias de pele de dois pacientes (45 anos, masculino e 12 anos, feminino), livres de doenças infecciosas atendidos no Programa de Cirurgia de Epilepsia do Hospital São Lucas da PUCRS por epilepsia refratária ao tratamento medicamentoso e sem outra doença neurológica após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido e dois pacientes (41 anos, feminino e 50 anos, feminino), saudáveis, livres de doenças infecciosas e doença neurológica atendidos no Programa de Cirurgia de Plástica do Hospital São Lucas da PUCRS após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. A coleta foi realizada através de biópsia de fragmentos de pele residuais da cirurgia de epilepsia e cirurgia plástica. As biópsias de pele obtidas dos pacientes do programa de Cirurgia Plástica constituirão o grupo controle do estudo. As biópsias de pele dos controles foram conduzidas ao Centro de Terapia Celular do Instituto do Cérebro/Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS. Os fragmentos de pele foram seccionados em pedaços de aproximadamente 5 mm². Foi realizada remoção manual do tecido adiposo. Os fragmentos de pele foram colocados em uma placa de Petri de 60 mm com a face da derme voltada para placa (Figura 07). Foi adicionado meio DMEM suplementado 20% de soro fetal bovino (Gibco), 100 U/mL de penicilina (Gibco), 100 U/mL de estreptomicina (Gibco), 100 µg/mL de gentamicina (Gibco) e 20 ng/mL de fator de crescimento de fibroblastos (FGF - do inglês *Fibroblast Growth Fator*) (Life Technologies). Os fragmentos de pele foram mantidos em

estufa úmida a 37°C com 5% CO₂. Após atingir confluência superior a 80%, foi realizado teste de contaminação para *Mycoplasma* e então cultivados até a sétima passagem. Foi realizada coleta do tecido cerebral displásico em consonância com o serviço de patologia clínica do Hospital São Lucas da PUCRS para análise histopatológica.

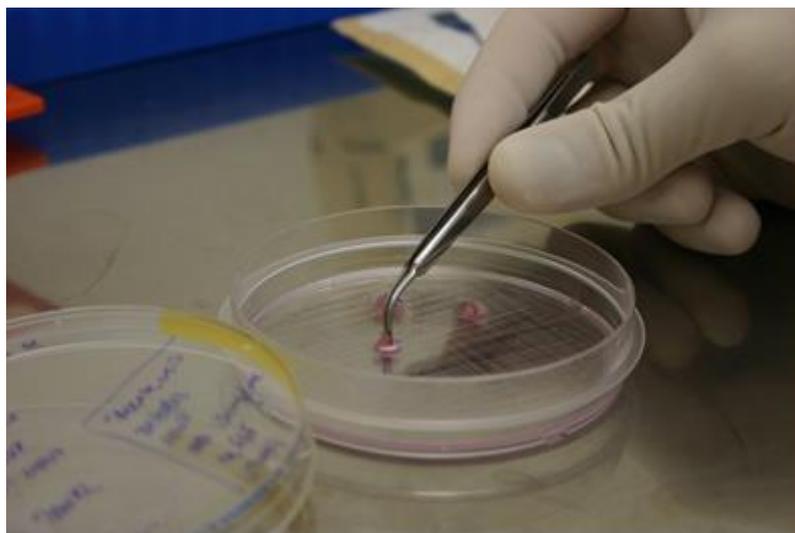


Figura 7. Disposição dos fragmentos de pele em placa de Petri de 60 mm. A placa é inicialmente preparada com ranhuras para fixação do fragmento de pele. (Fonte: Ismael Plentz).

5.3 TESTE DE CONTAMINAÇÃO PARA MYCOPLASMA

Antecedendo a primeira passagem das células, foi realizado teste para verificação de possível contaminação por *Mycoplasma*. Para isso, foi realizado o ensaio MycoAlert PLUS (Lonza) conforme orientação do fabricante. Foram coletados 2 mL de sobrenadante da cultura celular a ser testada e centrifugado a 200 g por 5 minutos. Após a centrifugação, foram coletados 100 µL do sobrenadante e adicionado a uma placa de cultura de 96 poços. A cada poço, foi adicionado 100 µL do reagente MycoAlert Reagent (Lonza) e as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. Foi então realizada a primeira leitura em espectrofotômetro Spectra Max M2 (Molecular Devices) utilizando comprimento de onda de 550/620 nm em modo luminescência. Após a leitura, foi adicionado do substrato MycoAlert Substrate (Lonza) e novamente as amostras foram incubadas a temperatura ambiente agora por 10 minutos. Foi então realizada a segunda leitura utilizando os mesmos parâmetros da

primeira. Para obtenção dos resultados, foi realizado cálculo da razão entre a segunda e a primeira leitura. O ensaio foi realizado utilizando controle positivo MycoAlert Control (Lonza).

5.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO DISPLÁSICO

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

5.5 ANÁLISE DA FOSFORILAÇÃO DA VIA AKT e mTOR

A análise da fosforilação das vias AKT e mTOR foi realizada através de imunofluorescência. As lâminas do tecido displásico foram desparafinadas e incubadas com tampão específico à temperatura ambiente por uma hora. Foram adicionados separadamente os anticorpos primários anti-AKT (Cell Signaling), anti-AKT fosforilada (Cell Signaling), anti-mTOR (Cell Signaling) e anti-mTOR fosforilada (Cell Signaling). As lâminas foram incubadas a 4°C por doze horas protegidas da luz. Após a incubação do anticorpo primário, foi adicionado o anticorpo secundário conjugado com isotocinato fluoresceína (FITC) e as lâminas foram incubadas a temperatura ambiente por duas horas. A seguir, as lâminas foram lavadas com DPBS (Gibco) e foi adicionado 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma-Aldrich) a 0,01% para marcação nuclear. Foi realizada análise utilizando microscópio confocal Zeiss LSM-5 exciter (Zeiss). Para análise quantitativa, foram selecionados, aleatoriamente, 10 campos visuais utilizando lentes objetivas de 20X, respeitando o número mínimo de 20 células analisadas a partir da marcação de DAPI.

5.6 GERAÇÃO DAS CÉLULAS iPSC

As células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) foram geradas através da exposição dos fibroblastos a vetores virais contendo os genes OCT4, KLF4, SOX2, e C-MYC utilizando KIT CytoTune®-iPSC 2.0 Sendai Reprogramming (Life Technologies) conforme orientação do fabricante. Os fibroblastos foram cultivados em placas de cultura de seis poços e para transfecção foram selecionados os poços que apresentaram confluência de cerca de 70% de superfície de cultivo (Figura 08). A quantidade de partículas virais utilizada foi calculada através da equação de MOI. A quantidade determinada de vírus foi diluída em 1 mL de meio de cultura DMEM/F12 (Life Technologies) suplementado com 20% de Knockout™ Serum Replacement (KSR) (Life Technologies), Aminoácidos não Essenciais de DMEM (1X) (Life Technologies), Glutamax (1X) (Life Technologies) e antibióticos. Os fibroblastos foram expostos ao meio contendo os vírus e incubados a 37°C a 5% CO₂ por 24 horas. As células foram lavadas com DPBS e cultivadas sob as mesmas condições por um período de seis dias.

No sétimo dia após a transfecção, os cultivos foram tratados com Tripsina EDTA (Life Technologies) e transferidos a uma placa de cultura preparada com Matrigel (BD Corning). Após 24 horas, o meio de cultura foi aspirado e as células passaram a ser cultivadas em meio de cultura para células embrionárias mTeSR (Stem Cell Technologies). Após cerca de 20 dias, os clones foram retirados manualmente e cultivados em novas placas contendo preparo de Matrigel (Figuras 09 e 10). Após esse período, os clones puderam ser visualizados naturalmente sem o auxílio de um microscópio (Figura 11). Após o terceiro repique, os clones foram caracterizados utilizando anticorpos anti-Nanog (Merck), anti-Sox2 (Merck), anti-Oct4 (Merck), anti-TRA1-60 (Merck) e anti-TRA1-81 (Merck). Para isso, os clones foram cultivados em placas de 24 poços, o meio de cultura foi aspirado e as células fixadas com PFA 4% (Sigma-Aldrich). Foi adicionado tampão de bloqueio e após os anticorpos conjugados com fluoróforos diluídos (1:100) em tampão de diluição. As células foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Foi realizada duas lavagens com tampão DPBS (do inglês *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) (Life Technologies) e a marcação nuclear utilizando DAPI.



Figura 8. Cultura de fibroblasto com confluência adequada para transfecção viral. (Aumento 200X).



Figura 9. Retirada manual/limpeza dos clones gerados. O microscópio é colocado no interior do fluxo laminar para esse procedimento. (Foto do autor).

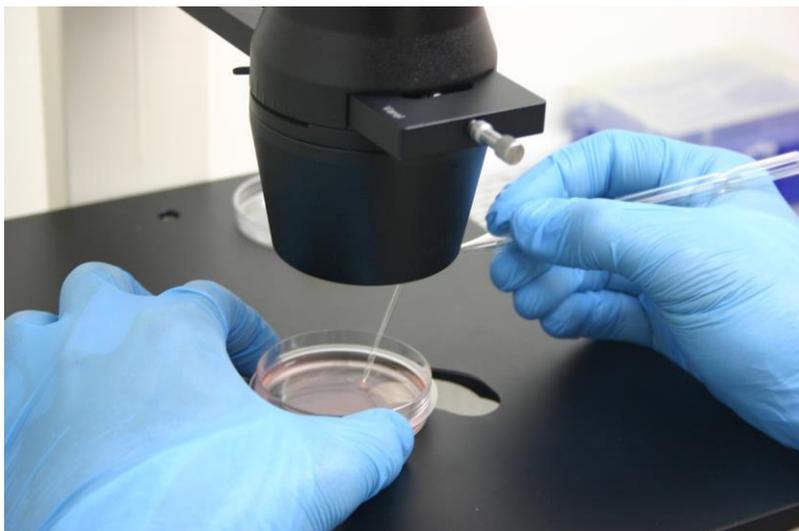


Figura 10. Detalhe da retirada/limpeza manual dos clones gerados. (Foto do autor)

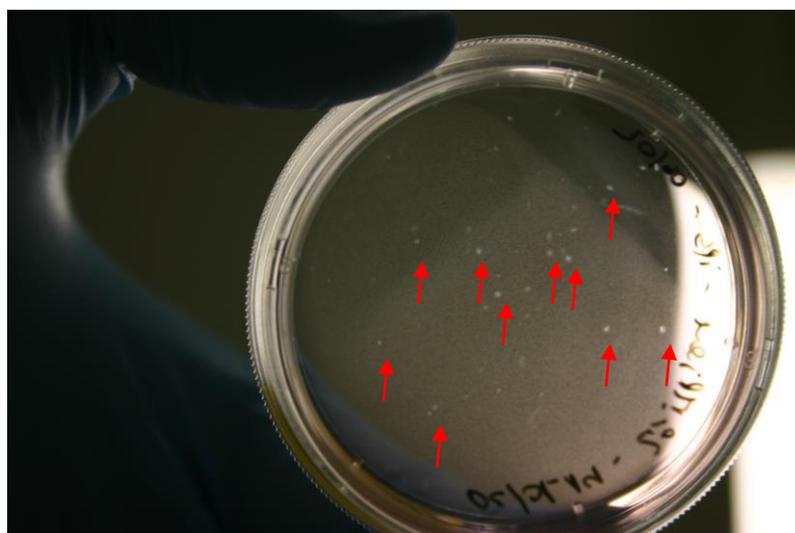


Figura 11. Imagem da visualização macroscópica dos clones gerados cultivados em placa de 60 mm² sobre Matrigel. As setas indicam os clones iPSC. (Foto do autor).

Diariamente até o final dos experimentos, foi realizada manutenção do meio de cultura bem como a limpeza manual dos clones para evitar a proliferação de células diferenciadas presentes nas bordas ou áreas centrais dos clones (Figura 12). Ao atingirem o tempo limite de uso de uma placa contendo Matrigel (aproximadamente 15 dias), foram realizados repiques manuais cortando os clones com auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro (Figura 13) para o recultivo ou congelamento.



Figura 12. Clone de iPSC apresentado áreas de diferenciação (setas) a serem retiradas manualmente pela manutenção diária dos cultivos (Aumento 200X).

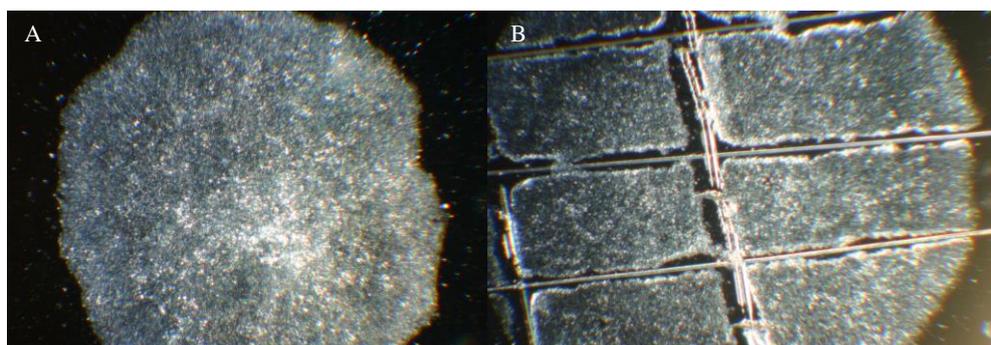


Figura 13. Captura de imagem de clone de iPSC no dia de repique. A: Clone sem áreas de diferenciação pronto para realização do repique. B: Repique manual do clone para cultivo em nova placa de cultura (Aumento 40X).

5.7 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR

Para avaliação da migração celular, os fibroblastos e as células iPSC foram cultivadas em insertos celulares FluoroBlock 8.0 (BD Biosciences). Esses insertos possuem uma membrana com poros de 8 μm de diâmetro que permite a passagem das células para o sítio atrativo e um bloqueio de fluorescência. Os insertos são acoplados a placas de 24 poços, gerando um ambiente com duas diferentes câmaras que compartilham meio líquido (Figura 14).

Para avaliação da migração dos fibroblastos, foi adicionado na câmara inferior (placa de cultura), 600 μL de meio de cultura DMEM (Gibco) suplementado com 30% de soro fetal bovino (Gibco), 100 U/mL de penicilina (Gibco), 100 U/mL de estreptomicina (Gibco), 100 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina (Gibco). A câmara superior (inserto) foi inserida no poço contendo o meio indutor e foram adicionados 200 μL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 100 U/mL de penicilina (Gibco), 100 U/mL de estreptomicina (Gibco), 100 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina (Gibco) contendo 5×10^4 células para cada poço. O plaqueamento foi realizado em duplicata.

Para avaliação da migração das iPSC, foi adicionado na câmara inferior (placa de cultura), 600 μL de meio E8 suplementado com 30% de soro Knockout™ (KSR – do inglês *Serum Replacement*) (Life Technologies). A câmara superior (inserto) foi inserida no poço contendo o meio indutor e foram adicionados 200 μL de meio de cultura E8 contendo 5×10^4 células para cada poço. O plaqueamento foi realizado em duplicata.

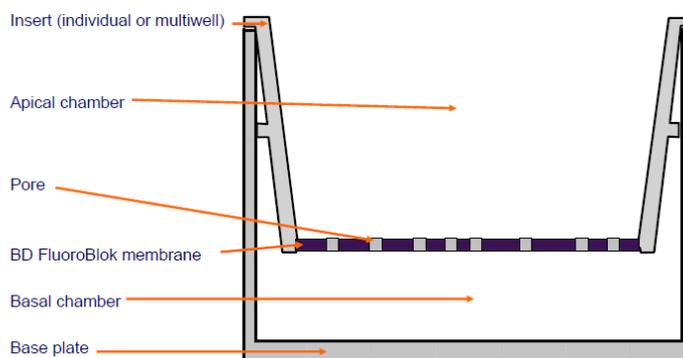


Figura 14. Representação do inserto contendo a membrana porosa inserida no poço de uma placa de cultura de 24 poços. As células foram cultivadas na câmara superior e induzidas a migração para câmara inferior através do estímulo gerado pela concentração de soro. (Fonte: BD Biosciences Webinars: www.bdbiosciences.com/webinars)

Os fibroblastos foram avaliados após de 24 horas, 48 horas e 72 horas e as células iPSC após 3 dias e sete dias do início do ensaio. Em cada um dos períodos, os insertos foram retirados dos poços, lavados duas vezes com tampão DPBS e fixados com paraformaldeído 4% por 10 minutos. Após, foram novamente lavados com DPBS e então foi adicionado rodamina para coloração das células que migraram através da membrana porosa. Os insertos foram observados em microscópio confocal Zeiss LSM-5 exciter utilizando comprimento de onda de 543 nm. A membrana dos insertos possui um bloqueio de fluorescência permitindo

que somente as células que transpassaram pelos poros da membrana sejam excitadas pela fonte de laser com comprimento de onda de excitação entre 490 – 700 nm (Figura 15). Para cada tempo de avaliação, foram capturados aleatoriamente 20 campos visuais utilizando lentes objetivas de 20X. As imagens foram quantificadas utilizando o parâmetro área de marcação através do software Image ProPlus 7.

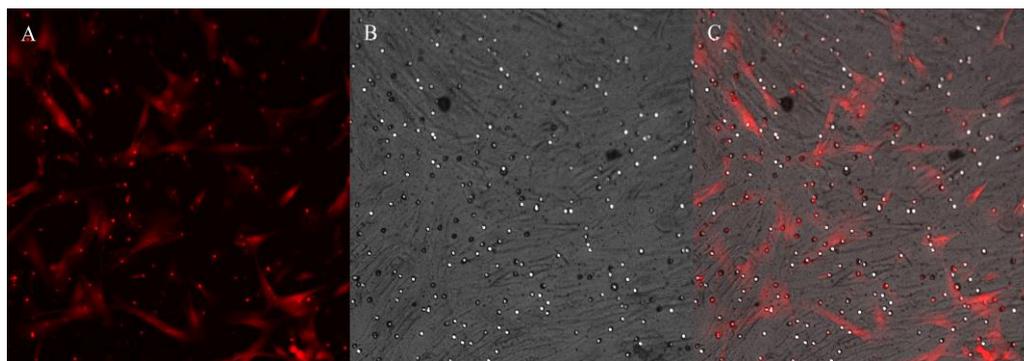


Figura 15. Ensaio de migração celular de fibroblastos utilizando inserto com porosidade de 8 μm . A: Células coradas com rodamina e visualizadas por excitação a laser em 543 nm. B: Imagem do inserto capturado em campo claro mostrando todas as células contidas no inserto. C: Colocalização das imagens mostrando células que migraram (marcação vermelha) e células que não migraram (campo claro). (Aumento 200X)

5.8 NEURODIFERENCIAÇÃO DAS iPSC

Para indução a neurodiferenciação, os clones de células iPSC foram cultivados de forma dissociada (monocamada). Os clones foram passados manualmente para as placas Petri de 60 mm e 48 horas após a passagem, foram cultivados por uma hora em meio E8 contendo 10 μM de inibidor de Rock quinase (iROCK – Chemicon). O meio foi aspirado e foi adicionado 3 mL de Accutase (Chemicon) mantendo exposição por um minuto. A Accutase foi aspirada e os clones lavados duas vezes com tampão DPBS. Foram adicionados 3 mL de meio E8 contendo 10 μM de iROCK e então removidos com auxílio de espátula. Foi realizada dissociação manual dos clones através de pipeta e ponteira de 1000 μL . Foram cultivadas placas de 24 poços contendo cerca de 5 a 7 clones dissociados por poço.

O método de neurodiferenciação adotado foi adaptado a partir daquele descrito por Song e colaboradores em 2008 (SONG, S.; SANCHEZ-RAMOS, 2008). Os clones agora dissociados como monocamada, foram cultivados em meio Neurobasal Medium N5 (Gibco)

suplementado com 20 ng/mL de fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF – do inglês *Brain Derived Neurotropic Factor*) (Sigma-Aldrich), B27 1X (Gibco) e 10% de KSR. As culturas foram mantidas em estufa úmida a 37°C com 5% CO₂ com troca diária de meio. As células foram cultivadas pelos períodos de 12 dias, 25 dias e 35 dias. Foram realizadas capturas de imagem em campo claro utilizando microscópio Axiovert 25 (Zeiss) em diferentes estágios do protocolo de neurodiferenciação.

5.9 AVALIAÇÃO DA NEURODIFERENCIAÇÃO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

A avaliação da neurodiferenciação e identificação das estruturas neuronais foi realizada através de ensaio de imunofluorescência. Após as diferentes etapas de avaliação da neurodiferenciação, o meio de cultura indutor foi aspirado e as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos. As culturas foram então lavadas duas vezes com tampão DBPS e foi adicionado 1 mL por poço de solução de bloqueio (Soro Fetal Bovino e Albumina Sérica Bovina) (Life Technologies), incubado por uma hora a temperatura ambiente. Após a incubação, foi adicionado o anticorpo FluoroPan Neuronal Marker (Chemicon) conjugado com isotocinato fluoresceína isothicyanate (FITC) diluído em tampão de bloqueio (1:100). Esse anticorpo é composto de um conjunto de anticorpos formado por anti-núcleo neuronal (NeuN), anti-citoesqueleto neuronal (NFL), anti-microtubulo neuronal (MAP2) e anti microtubulo neuronal (β -tubulina III) para caracterização da citoarquitetura e polarização neuronal. As culturas foram incubadas a temperatura ambiente por duas horas. As amostras foram lavadas duas vezes com tampão DPBS e adicionado DAPI a 0,01% para marcação nuclear. Imagens das células foram capturadas através de microscópio confocal Zeiss LSM-5 exciter utilizando comprimento de onda de excitação de 488 nm para a marcação do anticorpo e 405 nm para a marcação nuclear por DAPI.

5.10 ANÁLISE MOLECULAR ATRAVÉS DE qRT-PCR

Foi realizada análise molecular de genes relacionados à fosforilação da via PI3K/AKT no tecido cerebral displásico, nos fibroblastos, nas células iPSC, durante diferentes períodos da neurodiferenciação e em células iPSC neurodiferenciadas. O RNA foi extraído utilizando kit RNA SV-Total (Promega). As amostras foram expostas a um tampão de lise, aquecidas a 70° por 3 minutos e centrifugadas a 12000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e adicionado a 200 µL de álcool 95%. O conteúdo foi transferido para uma coluna de sílica e centrifugado a 12000 g por 1 minuto. Foi adicionado 600 µL de tampão e novamente centrifugado a 12000 g por 1 minuto. Foi adicionada enzima DNase diluída em tampão e cloreto de manganês (MgCl₂) e incubado por 15 minutos a temperatura ambiente. Foi adicionado tampão de bloqueio da enzima e as colunas foram novamente centrifugadas a 12000 g por 1 minuto. As colunas foram lavadas com tampão de lavagem e o RNA retido na sílica foi eluído com 100 µL de água livre de RNase através de centrifugação a 12000 g por 2 minutos. O RNA extraído foi quantificado utilizando o fluorômetro Qubit 2.0 (Life Technologies) conforme orientação do fabricante. Alíquotas de 5 µL de cada amostra de RNA extraído foram adicionadas a 195 µL de tampão contendo uma sonda RNA HS Assay (Life Technologies) e realizada a leitura para quantificação.

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

Para análise da expressão gênica, foi realizada técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction*) em tempo real utilizando equipamento SpetOne Plus (Life Technologies). Foram realizadas amplificações a partir de 20 ng de cDNA para cada amostra. Os ensaios foram realizados em placas individuais para cada gene utilizando o gene GAPDH como controle endógeno de expressão. Para análise da fosforilação da via PI3K/AKT, foram utilizados *primers* complementares a sequência dos

mRNAs dos seguintes genes: IGFBP-1, CIAP1, CIAP2, MCL -1, MDR1, β Catenina, 4EBP e PI3KCA. As sequencias de *primers* utilizadas estão descritas na tabela 01.

Tabela 1. Sequencias de *primers* utilizadas na avaliação da expressão de genes relacionados a via PI3K/AKT.

Primer	Sequencia	
CIAP1	F: 5'-GCTCAGTAACTGGGAACCAAA-3'	R: 5'-ATCATTGCGACCCACATAATAA-3'
CIAP2	F: 5'-GATGTTTCAGATCTACCAGTGA-3'	R: 5'-GAAATGTACGAAGTGTACCCTTG-3'
MCL -1	F: 5'-CCAAGAAAGCTGCATCGAACCAT-3'	R: 5'-CAGCACATTCTGTATGCCACC-3'
MDR1	F: 5'-GGAGCCTACTTGGTGGCACATAA=3'	R: 5'-TGGCATAGTCAGGAGCAAATGAAC-3'
β Catenina	F: 5'-AGGAAGCTTCCAGACACGC-3'	R: 5'-CGCACTGCCATTTTAGCTCC-3'
4EBP	F: 5'-TGCAGCCAGACCCCAAG-3'	R: 5'-CCGCTTATCTTCTGGGCTATTG-3'
PI3KA	F: 5'-TGCTAAAGAGGAACACTGTCCA-3'	R: 5'-GGTACTGGCCAAAGATTCAAAG-3'
GAPDH	F: 5'-GAAGGTGAAGTCCGGAGTCAAC-3'	R: 5'-AGAGTTAAAAGCAGCCCTGGT-3'

6 RESULTADOS

6.1 PACIENTES ENVOLVIDOS NO ESTUDO

Foram incluídos no estudo dois pacientes portadores de DCF e dois participantes saudáveis compondo o grupo controle.

Primeiro paciente portador de DCF: C.P.A., masculino, 45 anos (identificado como Pct 01). Apresenta crises epiléticas refratárias ao tratamento medicamentoso. Em monitorização de vídeo EEG prolongada (Figura 16), sob-redução de fármacos antiepiléticos, apresentou atividade de base normal, tanto em sono quanto em vigília e raras ondas agudas na região fronto-temporal direita. Durante o monitoramento, foram registradas cinco crises epiléticas sendo que em duas delas não foi possível ver a zona de início de crises e nas demais se observou atividade rítmica na região frontal direita, no início das crises. No período pós ictal registrou-se paroxismos epileptiformes na região fronto-temporal direita. O paciente foi submetido à cirurgia de Epilepsia com ressecção da zona epileptogênica. O exame de Ressonância magnética do cérebro evidenciou displasia cortical focal na região frontal à direita (Figura 17).

A histopatologia e a imunocitoquímica foram consistentes com DCF do tipo IIb devido a presença de neurônios heterotópicos na substância branca, alteração na arquitetura da camada cortical, presença de neurônios gigantes e presença de células dismórficas, com presença de neurônios abalonados (Figura 18).

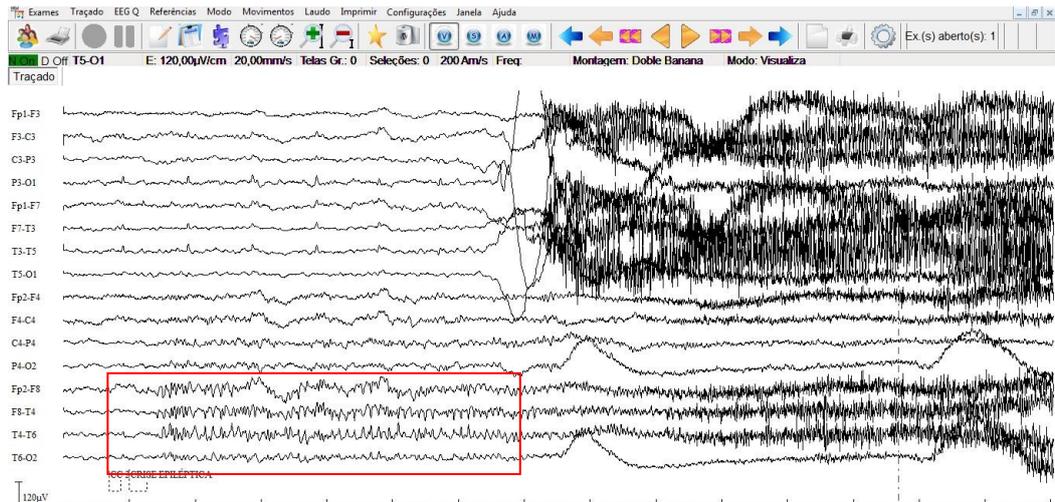


Figura 16. Eletroencefalograma do Pct 01. O EEG apresenta crises convulsivas nas áreas fronto temporal direita (destaque).

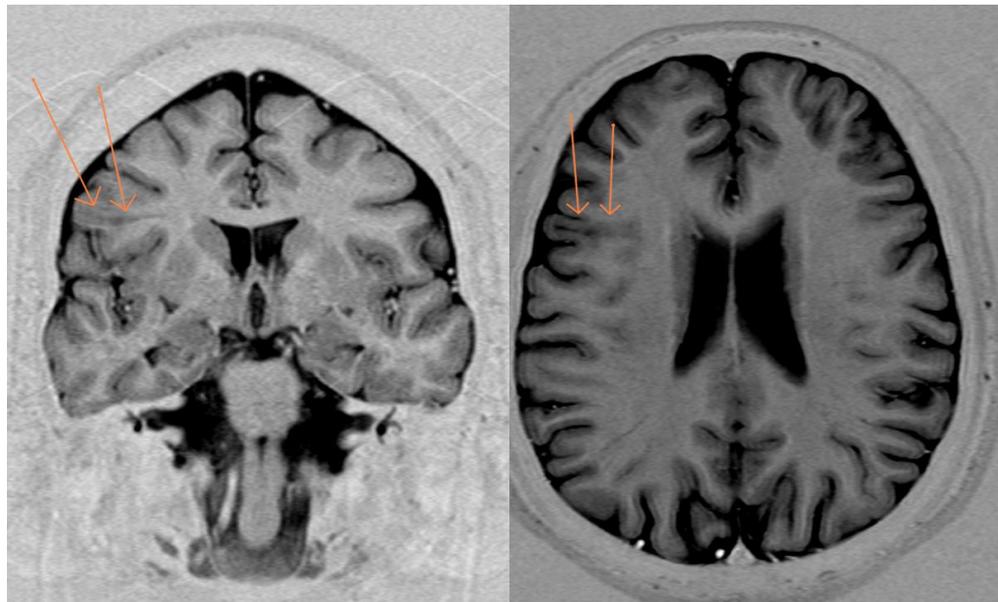


Figura 17. Imagem de RM indicando area de displasia transmantica no lobo frontal direito, com indefinição e borrimento da interface córtico-subcortical.

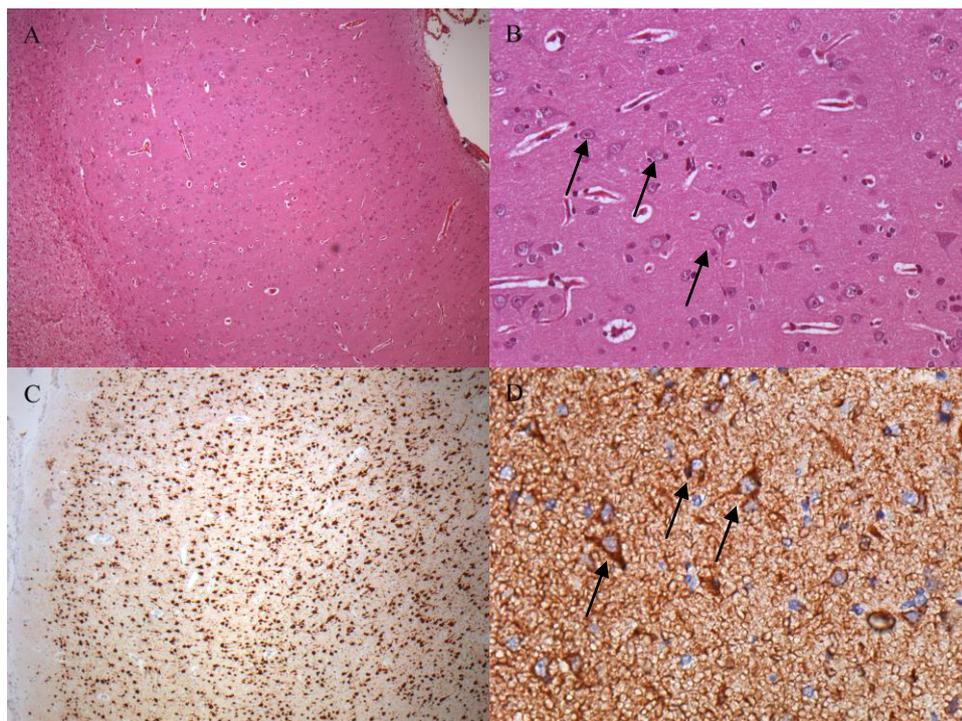


Figura 18. Histopatologia do Pct 01.: A: morfologia do córtex mostrando deslaminação das camadas. B. Área de desorganização cortical com neurônios dismórficos e células abalonadas (seta). C. Reação imunohistoquímica para Neu-N mostrando neurônios com deslaminação das camadas corticais. D. Reação imunohistoquímica para vimentina, marcando neurônios abalonados (seta).

Segundo paciente: V.M.D., feminino, 12 anos (identificado como Pct 02) iniciou com crises epilépticas por volta dos cinco anos de idade, com episódios em que movia bruscamente o braço direito. Suas crises são caracterizadas por extensão súbita do braço direito concomitante à flexão da cabeça para baixo com leve rotação para esquerda. A frequência de crises é variável, embora tenha várias crises agrupadas em alguns dias. Já fez o uso de diversos medicamentos anti-epilépticos sem controle das crises. Como comorbidade apresenta diabetes mellitus tipo I com oscilações importantes da glicemia conforme a frequência das crises. Adicionalmente, tem uma lesão cística com bordas regulares na região parietal direita. Os registros de EEG mostravam alterações epileptiformes e ondas lentas com distribuição multifocal, envolvendo os quadrantes posterior direito e anterior esquerdo, sendo máximo na região frontal esquerda (Figura 19). Ao exame de ressonância magnética do cérebro (RM) evidenciou alteração de sinal pericisto e também uma inequívoca lesão displásica na região órbito-frontal esquerda (Figura 20). O vídeo-EEG pré-cirúrgico capturou quatro crises típicas, todas iniciadas no quadrante anterior esquerdo. A paciente foi submetida à cirurgia de Epilepsia com ressecção da zona epileptogênica frontal esquerda sob monitorização eletrocorticográfica trans-operatória.

A histopatologia e a imunocitoquímica foram consistentes com DCF tipo IIb devido a presença de neurônios heterotrópicos na substância branca, alteração na arquitetura da camada cortical, presença de neurônios gigantes e presença de células dismórficas e neurônios abalonados (Figura 21).

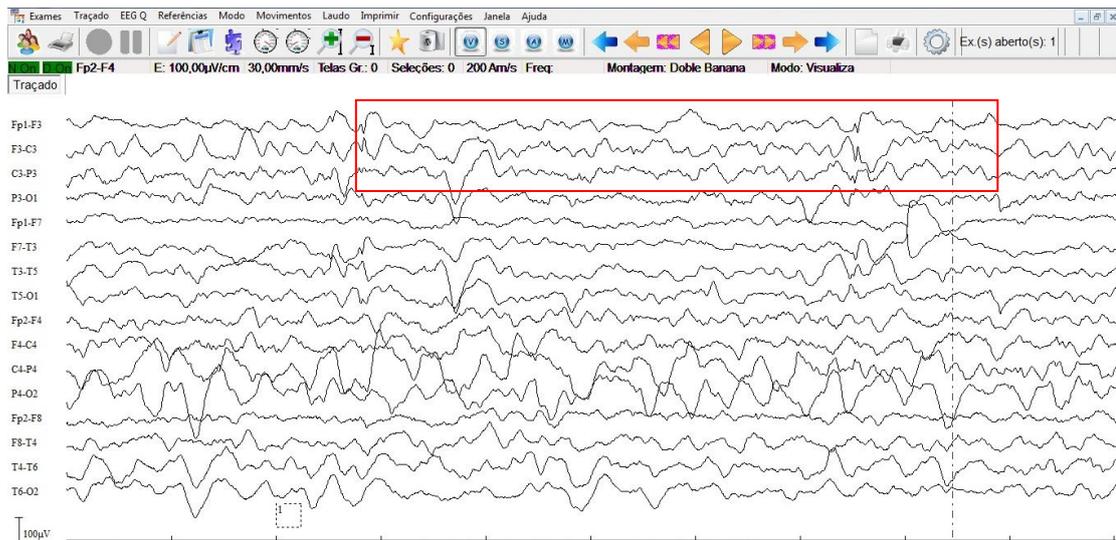


Figura 19. Eletroencefalograma do Pet 02. O EEG apresenta crises convulsivas iniciadas no quadrante anterior esquerdo, com máximo na região frontal esquerda (destaque).

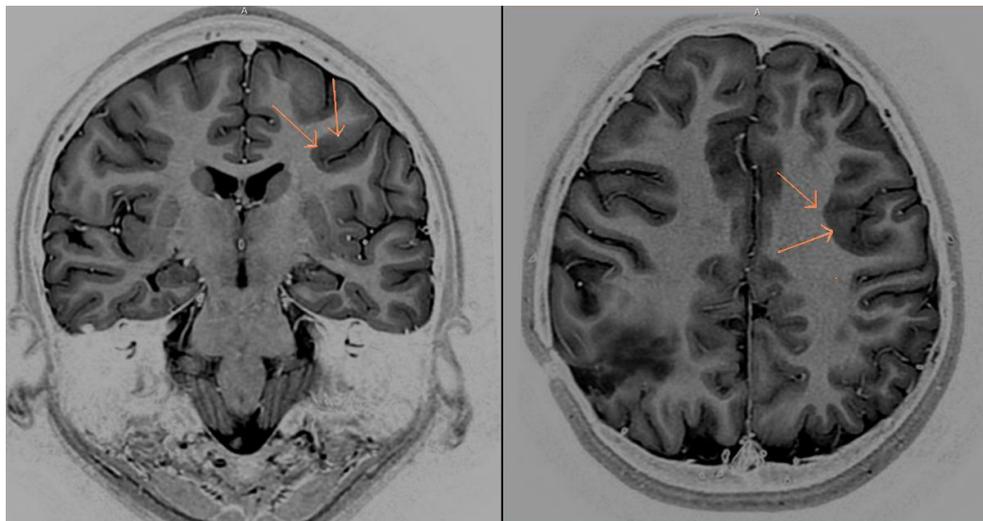


Figura 20. Imagem de RM indicando nódulos de heterotopia subcortical e periventricular no lobo frontal esquerdo, com indefinição e borramento da interface córtico-subcortical.

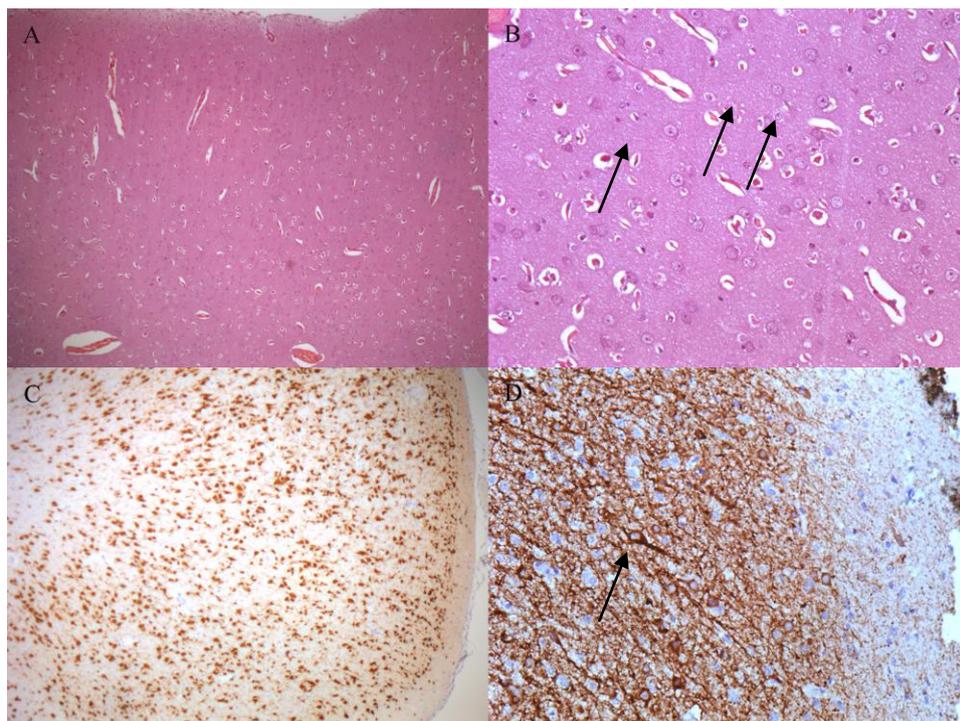


Figura 21. Histopatologia do Pct 02.: A: morfologia do córtex mostrando deslaminação das camadas. B. Área de desorganização cortical com neurônios dismórficos e células abalonadas (seta). C. Reação imunohistoquímica para Neu-N mostrando neurônios com deslaminação das camadas corticais. D. Reação imunohistoquímica para vimentina, marcando neurônios abalonados (seta).

6.2 ANÁLISE VIA AKT/mTOR

A quantificação da área de fluorescência das vias AKT, AKT fosforilada (Phospho-AKT), mTOR e mTOR fosforilada (Phospho-mTOR) foi estimada pela positividade dos marcadores específicos em lâminas histológicas no tecido cerebral displásico (Figura 22). A análise da via AKT no tecido displásico apresentou diferença estatisticamente significativa entre os pacientes analisados. Na via AKT não fosforilada o Pct 01 teve uma área quantificada de $756 \mu\text{m}^2$ e o Pct 02 uma área de $291 \mu\text{m}^2$ ($p=0,006$). Na via AKT fosforilada, o Pct 01 teve área de $974 \mu\text{m}^2$ e o Pct 02 uma área de $408 \mu\text{m}^2$ ($p=0,004$). A análise da via mTOR também apresentou diferença estatisticamente significativa entre os pacientes. Na via mTOR não fosforilada, o Pct 01 apresentou resultado de área de $1210 \mu\text{m}^2$ e o Pct 02 $341 \mu\text{m}^2$ ($p=0,0003$). Na via mTOR fosforilada, o Pct 01 teve área de $1004 \mu\text{m}^2$ e o Pct 02 uma área de $507 \mu\text{m}^2$ ($p=0,004$) (Figura 23).

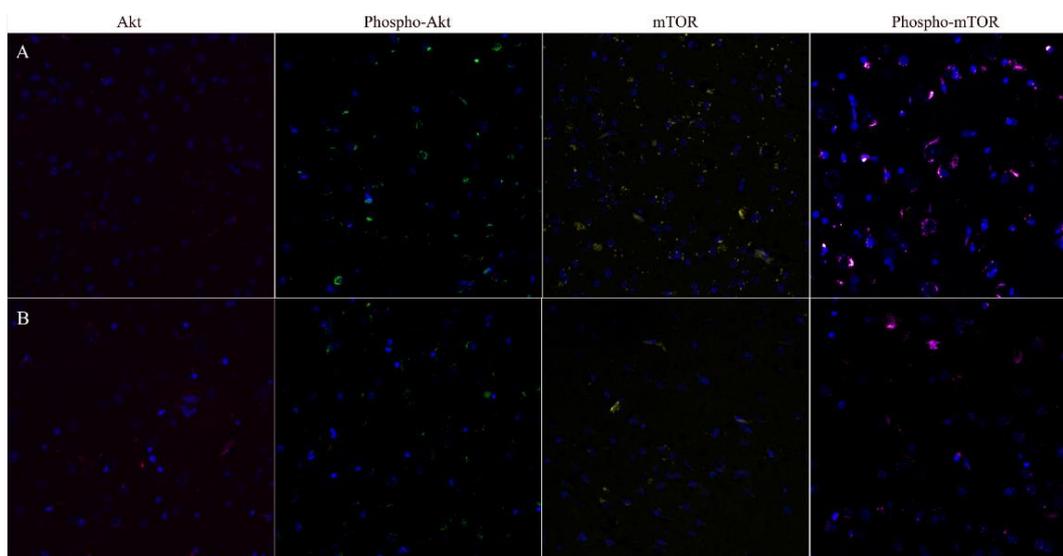


Figura 22. Imunofluorescência do tecido displásico. A: Pct 01. B: Pct 02. Marcação nuclear (DAPI) em azul. Vermelho: Akt, verde: Akt fosforilada, amarelo: mTOR, rosa: mTOR fosforilada.

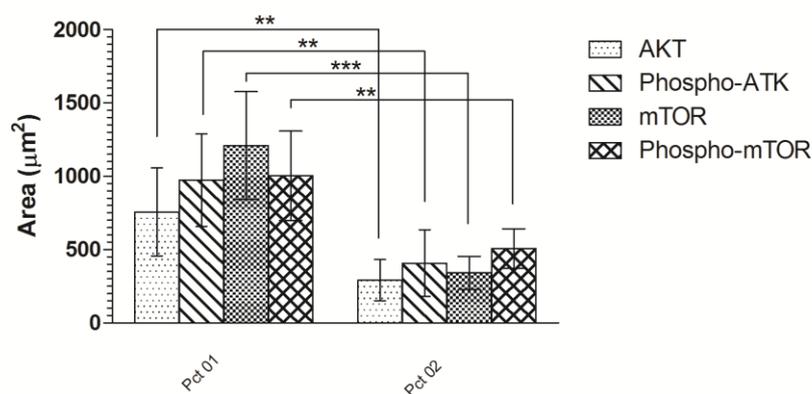


Figura 23. Análise da imunofluorescência das vias Akt e mTOR do tecido displásico. O Pct 01 apresenta maiores valores na área tanto na via não fosforilada quanto na via fosforilada quando comparado ao Pct 02.

6.3 OBTENÇÃO DOS FIBROBLASTOS DE PELE

Após cerca de 20 dias de cultivo após a preparação da placa contendo os fragmentos de pele, os fibroblastos puderam ser tripsinizados e transferidos a uma nova placa de cultura. Antecedendo a primeira passagem das células, foi realizado teste de contaminação para *Mycoplasma* como pré-requisito a sua liberação para o cultivo em escala e congelamento bem

como a reprogramação celular. As duas amostras estavam livres de contaminação por *Mycoplasma*. As células foram cultivadas até a sétima passagem sendo criopreservado cultivos na quarta, quinta, sexta e sétima passagem. Os fibroblastos foram caracterizados pela conforme sua morfologia (Figura 24).

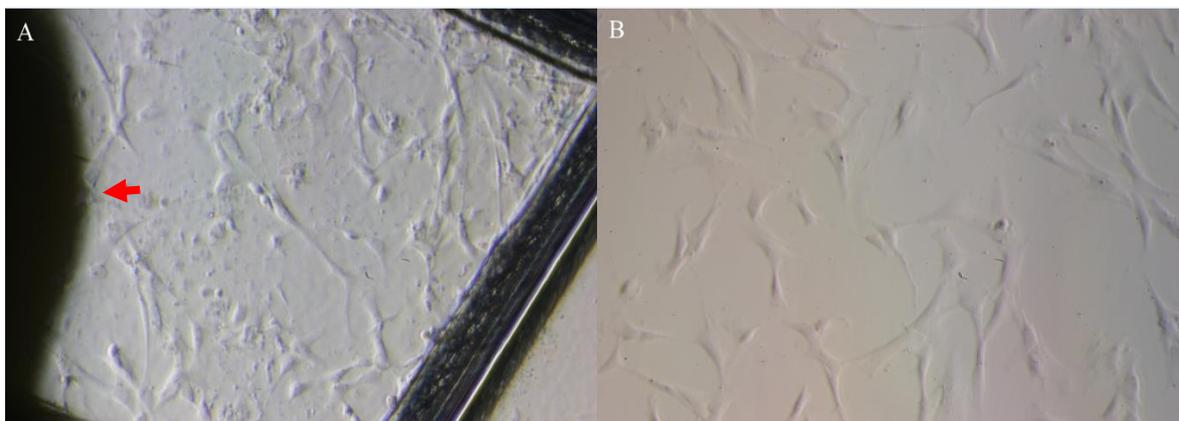


Figura 24. Cultura primária de fibroblasto de pele. A: Células cultivados sobre a placa de cultura contendo o fragmento de pele (seta) antes da primeira passagem. B: Fibroblastos após sexta passagem com confluência adequada para transfecção viral.

6.4 REPROGRAMAÇÃO CELULAR

Após a exposição aos vetores virais, foi observado o crescimento de clones com características morfológicas semelhantes a células embrionárias a partir do 13^o dia de cultivo. Cerca de 25 dias após a exposição aos vetores virais, os clones puderam ser selecionados manualmente e cultivados sobre o Matrigel (Figura 25). Após o terceiro repique dos clones e cultivo sobre Matrigel, foi detectada marcação positiva para os marcadores Nanog, Sox2, Oct4, TRA1-60 e TRA1-81 através de imunofluorescência (Figura 26). A marcação positiva da caracterização das células evidencia o sucesso na geração de células-tronco pluripotentes induzidas dos dois cultivos de fibroblastos.

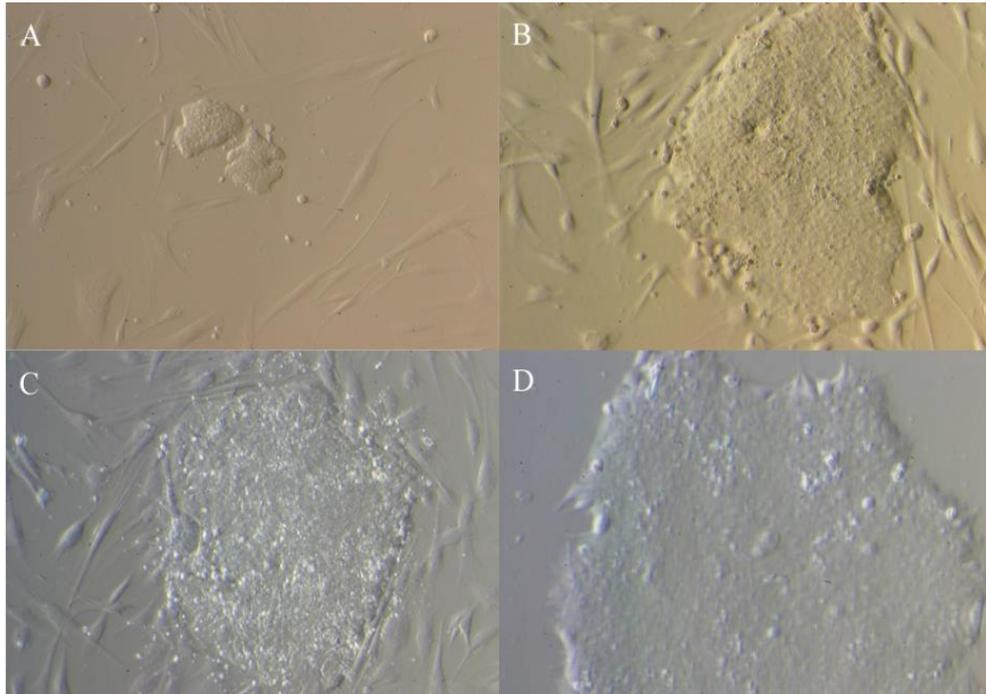


Figura 25. Captura de imagem de cultura das células após a exposição aos vetores virais. A: 13 dias após exposição, B: 20 dias após exposição, C: 25 dias após exposição e D: após a primeira passagem para Matrigel. (Aumento 200X).

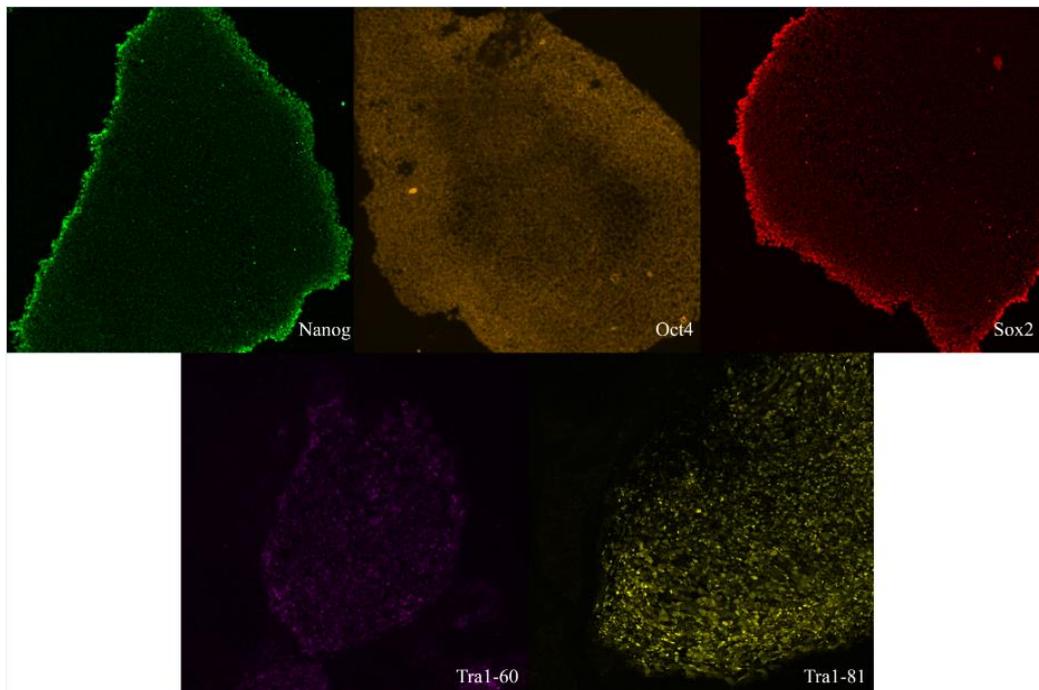


Figura 26. Captura de imagem da caracterização das iPSC através de microscopia confocal. Os clones apresentaram marcação positiva para os cinco marcadores de pluripotência testados. (Aumento 200X).

6.5 NEURODIFERENCIAÇÃO DA iPSC

Após 20 dias de indução a neurodiferenciação, as células iPSC começaram a apresentar características morfológicas de células nervosas (Figura 27). Cultivos de 35 dias de indução a neurodiferenciação apresentaram características morfológicas muito semelhantes a células nervosas, inclusive com possível formação de redes neurais (Figura 28). Em ensaio de imunofluorescência, as iPSC neurodiferenciadas por 35 dias apresentaram marcação positiva para o anticorpo FluoroPan Neuronal Marker (Figura 29).

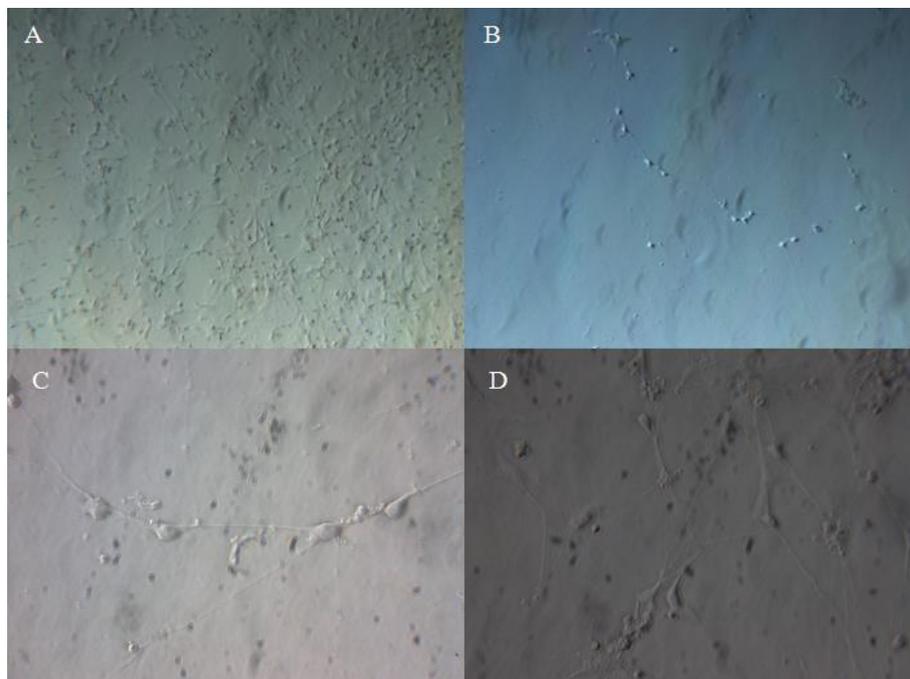


Figura 27. Captura de imagem das células iPSC após 20 dias de indução a neurodiferenciação. A e B: aumento de 40X. C e D: aumento de 200X.

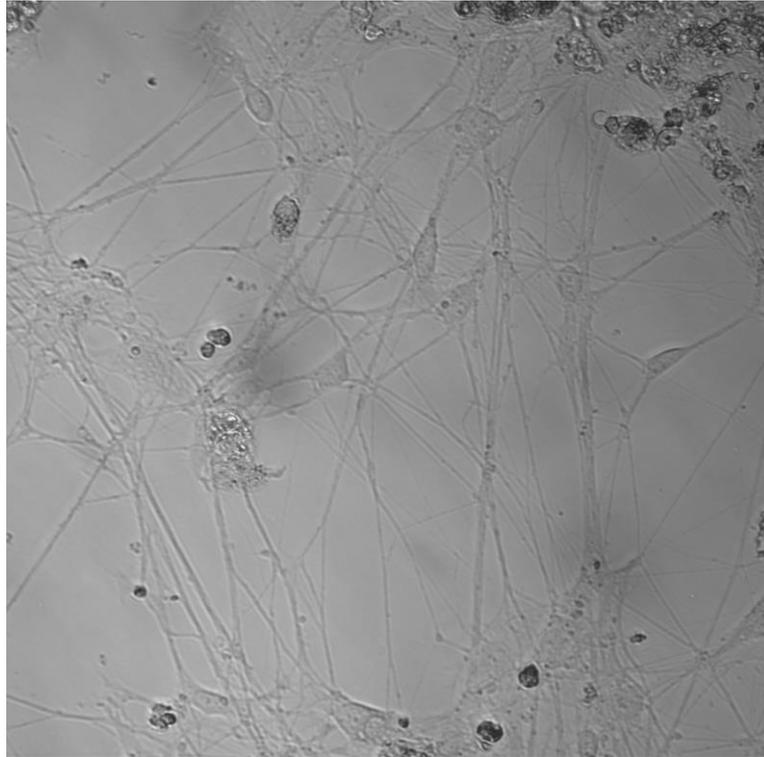


Figura 28. Captura de imagens de células após 35 dias de indução a neurodiferenciação. Observa-se a formação de prolongamentos axonais e formação de redes. (Aumento 200X).

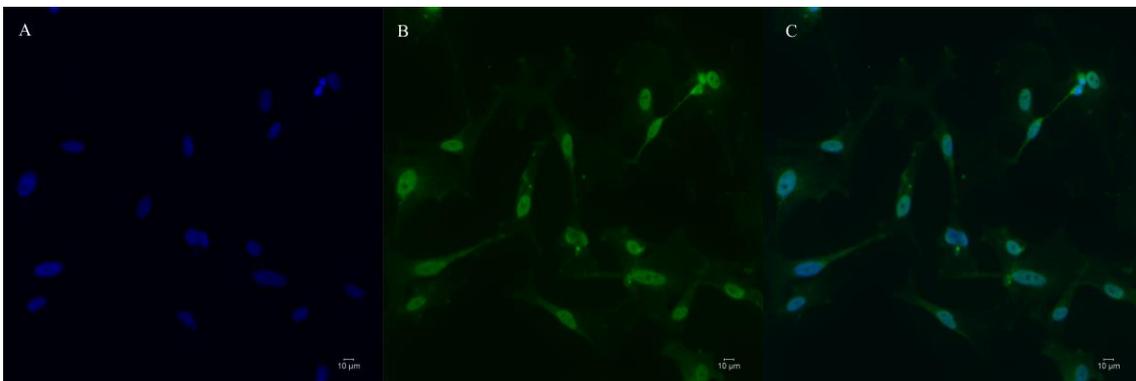


Figura 29. Captura de imagem das células iPSC após protocolo de neurodiferenciação por 35 dias e marcação por imunofluorescência. A: Marcação nuclear (DAPI). B: Marcação do anticorpo FluoroPan Neuronal (FITC). C: Merge (DAPI+FITC). (Aumento 200X).

6.6 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR

Os fibroblastos expostos ao agente quimioatratante (SFB 30%) apresentaram diferença no potencial de migração celular nos dois primeiros períodos de avaliação (Figura 30). Após 24 horas de indução à migração celular, a área de célula ao sítio foi de $33,2 \text{ mm}^2$ (SEM 13,6) para o paciente do grupo controle, contra $154,2 \text{ mm}^2$ (SEM 18,2) para o paciente com displasia ($p < 0,0001$). Na avaliação de 48 horas de indução, a área das células que migraram no paciente controle foi de $65,5 \text{ mm}^2$ (SEM 21,4) contra uma área de $160,2 \text{ mm}^2$ (SEM 41,7) no paciente portador de displasia ($P < 0,001$). Em 72 horas de indução a migração celular, a área marcada pelas células que migraram foi muito semelhante nos dois grupos, sendo $221,8 \text{ mm}^2$ (SEM 61,8) no paciente controle e $202,1 \text{ mm}^2$ (SEM 53,8) no paciente com DCF, e, portanto sem diferença significativa nesse período (Figura 31).

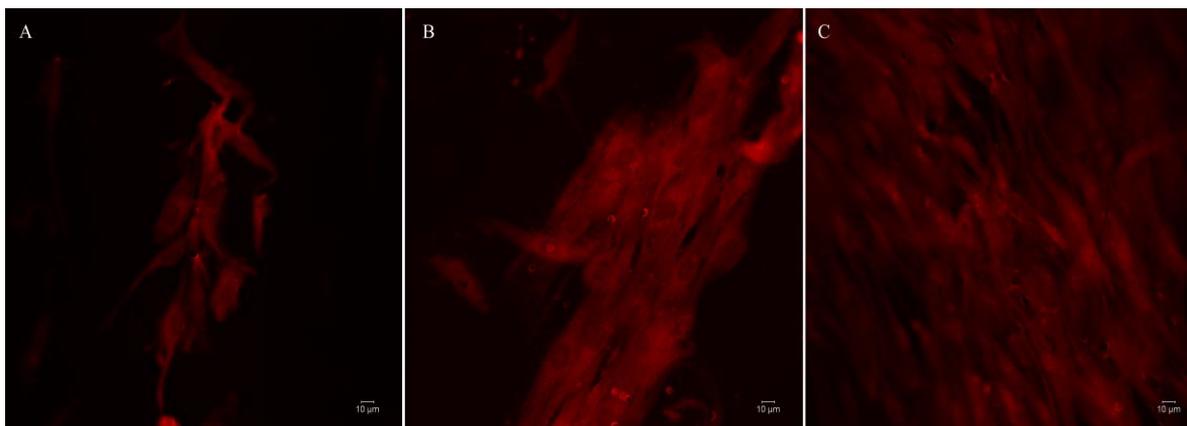


Figura 30. Ensaio de migração celular de fibroblastos marcados com Rodamina. A: 24 horas de indução. B: 48 horas de indução. C: 72 horas de indução. (Aumento 200X).

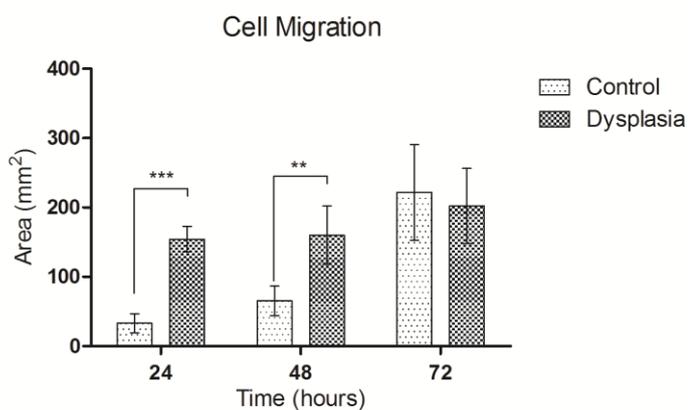


Figura 31. Ensaio de migração celular dos fibroblastos dos pacientes portadores de DCF e pacientes controles.

Foi realizado teste de migração celular nas células iPSC após três e sete dias de indução (Figura 32). As células iPSC dos pacientes portadores de DCF e pacientes controles não apresentaram diferença estatisticamente significativa em ambos os tempos de indução a migração celular. A avaliação no sétimo dia apresentou uma redução na área de células migratórias nos pacientes com DCF quando comparado ao mesmo período dos pacientes controles, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 33).

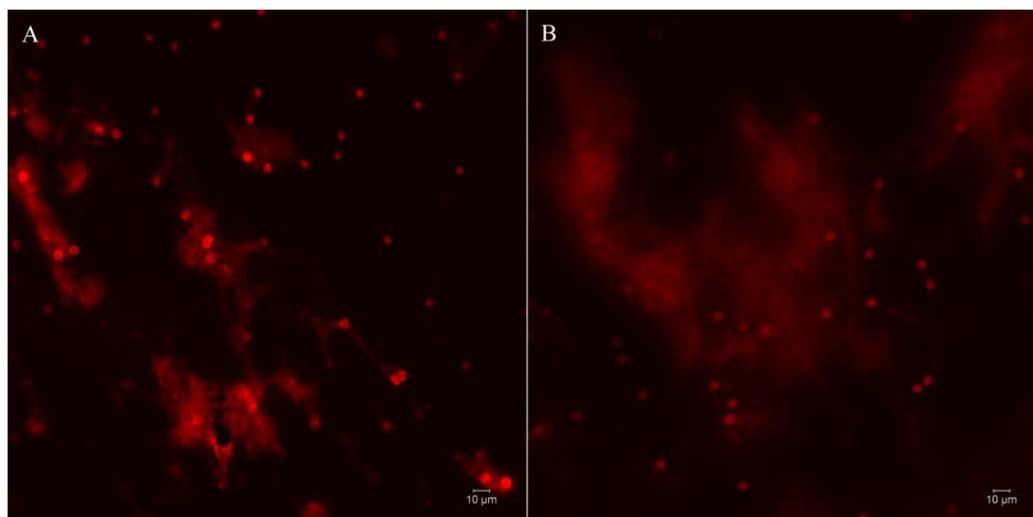


Figura 32. Ensaio de migração celular de células iPSC marcadas com Rodamina. A: Três dias de indução. B: Sete dias de indução. (Aumento 200X).

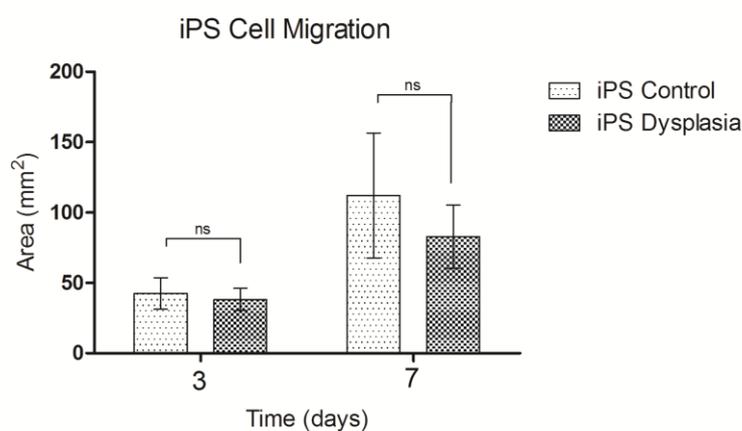


Figura 33. Gráfico representando ensaio de migração celular das iPSC após três e sete dias de indução a migração. No sétimo dia as células iPSC dos pacientes com DCF apresentaram valores menores que os pacientes controles na área de migração celular porém sem diferença estatisticamente significativa.

6.7 ANÁLISE MOLECULAR

A análise do gene 4EBP-1 apresentou valores menores de expressão relativa nos fibroblastos dos pacientes com DCF em comparação aos fibroblastos controles (19,9 vezes menos expresso) (Figura 34). Durante o protocolo de neurodiferenciação, as células iPSC do grupo controle aumentaram em 6,2 vezes a expressão do gene 4EBP-1 no 22º dia de indução a neurodiferenciação. Nos dias 14 e 35, a expressão relativa manteve-se semelhante à expressão das células iPSC não diferenciadas. No grupo displasia, as células neurodiferenciadas por 14 dias apresentaram 14 vezes menos a expressão de 4EBP-1 e 17 vezes menos no 35º dia de diferenciação (Figura 35).

Durante o protocolo de neurodiferenciação das células iPSC do grupo controle, observou-se um aumento de cerca de 5 vezes a expressão do gene β -Catenina (β -Cat) nas análises de 14 dias, 22 dias e 35 dias em comparação a iPSC não diferenciada (Figura 34). Nos pacientes portadores de DCF, observou-se também um aumento na expressão de β -Catenina com o início do protocolo neurodiferenciação, porém a análise em 14 dias de indução apresentou um aumento de apenas 1,48 vezes a expressão de do gene quando comparado com células iPSC não diferenciadas. No 22º dia de indução a neurodiferenciação dos pacientes com DCF, houve um aumento de 3,3 vezes a expressão do gene e uma posterior redução de 2,5 vezes na análise em 35 dias de neurodiferenciação (Figura 36). Os tecidos

cerebrais tanto dos pacientes portadores de DCF quanto controles, apresentaram níveis muito próximos de expressão de β -Catenina (Figura 34).

Os valores de expressão relativa de CIAP-1 no cérebro controle e iPSC dos pacientes controle foram 17,5 e 18,2 vezes menos expressos respectivamente, utilizando fibroblasto como calibrador da reação (Figura 34). O tecido cerebral displásico e as iPSC com DCF apresentaram valores de expressão relativa bastante semelhantes ao fibroblasto controle (Figura 34). Durante o protocolo de neurodiferenciação das iPSC controle, houve um aumento na expressão do gene CIAP-1 de 17,7 vezes em 14 dias de indução, 25,9 vezes em 22 dias e 16,8 vezes em 35 dias de neurodiferenciação quando comparado células iPSC não diferenciada. Nas células iPSC dos pacientes portadores de DCF foram observados pequenos aumentos na expressão do gene CIAP-1 durante todo o protocolo de neurodiferenciação, assim como no tecido cerebral displásico (Figura 37).

Em relação aos fibroblastos controle, as iPSC geradas tanto das células dos pacientes com DCF quanto nas células do grupo controle foi observado um aumento na expressão do gene CIAP-2, sendo 8,9 vezes mais expresso para os controles e 28,4 vezes mais expresso na DCF (Figura 34). Durante o protocolo de neurodiferenciação, ocorreu uma redução na expressão do gene CIAP-2 em todos os períodos analisados quando comparada com as células iPSC não diferenciadas de cada grupo. A redução na expressão do gene CIAP-2 nos pacientes com DCF é maior (23,1 vezes) do que a redução da expressão nos pacientes controles (4,8 vezes) analisando o 14° de indução a neurodiferenciação. Ambos os grupos apresentaram um pequeno aumento na expressão de CIAP-2 no 22° dia e posterior redução na última etapa de análise (Figura 38).

A expressão do gene MCL 1 é aumentada nas células iPSC de pacientes do grupo controle e reduzida na nas iPSC dos pacientes com DCF em comparação aos fibroblastos (Figura 34). Durante o protocolo de neurodiferenciação do grupo controle, ocorreu uma pequena redução na expressão do gene MCL 1, mantendo-se estável nas três etapas analisadas. Essa mesma redução é vista para as células dos pacientes portadores de DCF, porém no 22° dia de neurodiferenciação ocorreu um aumento de 10,7 vezes na expressão do gene MCL 1 em comparação a iPSC não diferenciada (Figura 39).

O tecido cerebral displásico apresenta um aumento de 202 vezes a expressão do gene MDR1 quando comparado ao tecido cerebral controle (Figura 34). Durante a neurodiferenciação, ocorre um aumento de seis vezes na expressão de MDR1 nas iPSC do

grupo controle em comparação aos fibroblastos. Nas iPSC dos pacientes com DCF, a expressão de MDR1 mantém-se estável e em níveis muito próximos aos fibroblastos, porém cerca de seis vezes menos expressa aos 35 dias de neurodiferenciação quando comparado ao mesmo período das iPSC controle (Figura 34).

Em comparação aos fibroblastos, ocorreu uma pequena redução na expressão do gene PI3K nas células iPSC controle e iPSC DCF (Figura 34). O tecido cerebral de pacientes com DCF apresenta um aumento de 3,5 vezes à expressão do gene PI3K em comparação ao tecido cerebral controle (Figura 34). Os níveis de expressão de PI3K se mantêm semelhantes às células iPSC durante a neurodiferenciação dos pacientes controle. Nos pacientes com DCF, pode-se observar uma redução de 3,7 vezes, 2 vezes e 3,5 vezes nos períodos de 14, 22 e 35 dias de indução, respectivamente (Figura 40).

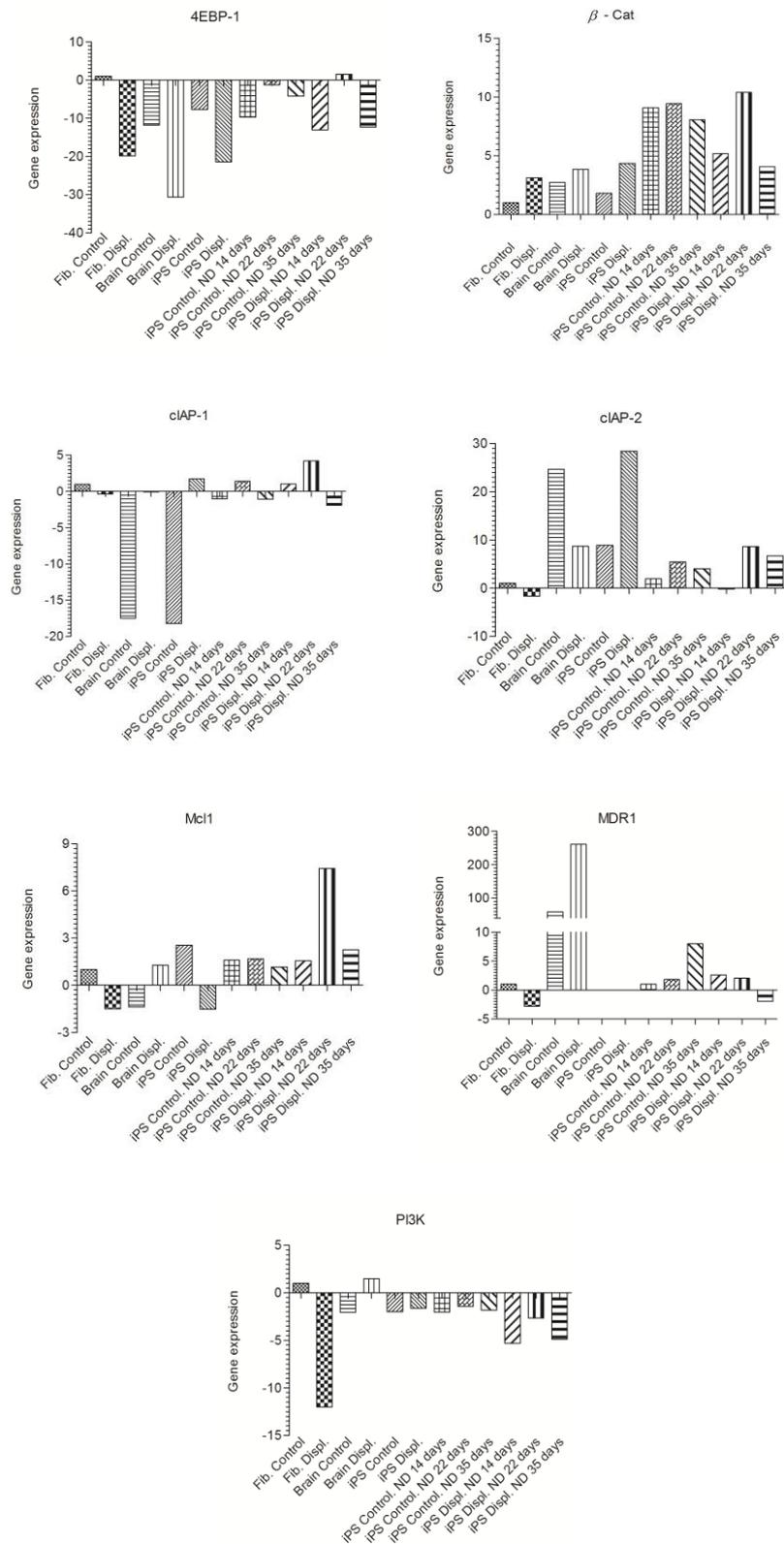


Figura 34. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR de todos os genes analisados e todos os grupos do estudo. Os resultados estão apresentados utilizando como calibrador fibroblastos do grupo controle.

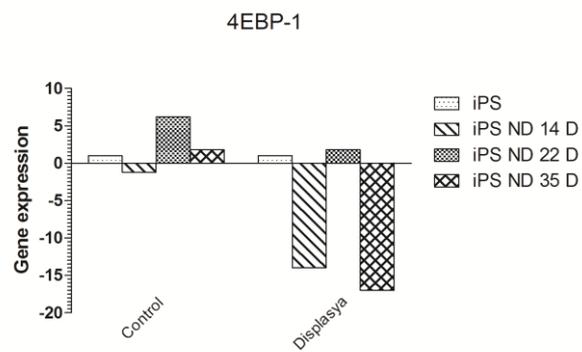


Figura 35. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene 4EBP-1 durante a neurodiferenciação das iPSC.

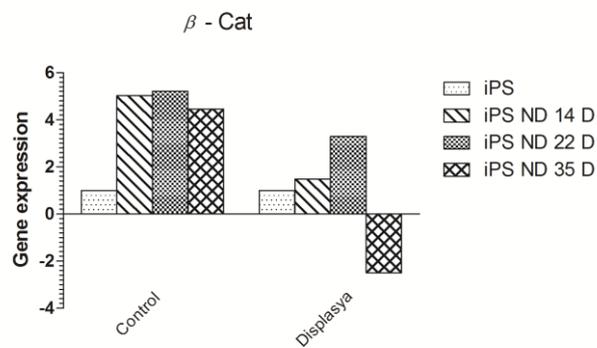


Figura 36. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene β -Catenina durante a neurodiferenciação das iPSC.

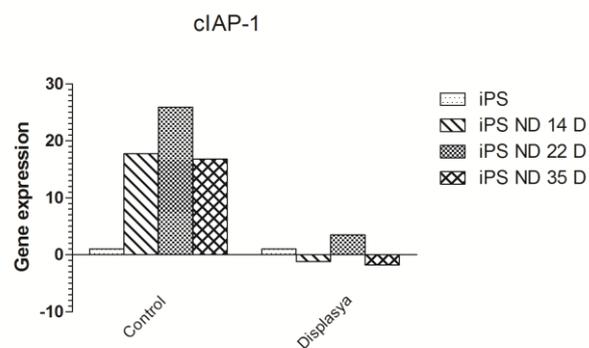


Figura 37. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene CIAP-1 durante a neurodiferenciação das iPSC.

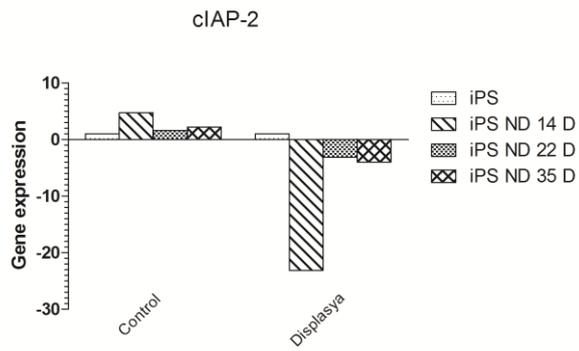


Figura 38. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene CIAP-2 durante a neurodiferenciação das iPSC.

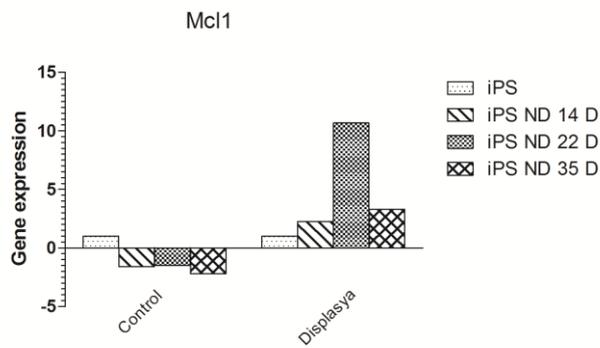


Figura 39. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene MCL 1 durante a neurodiferenciação das iPSC.

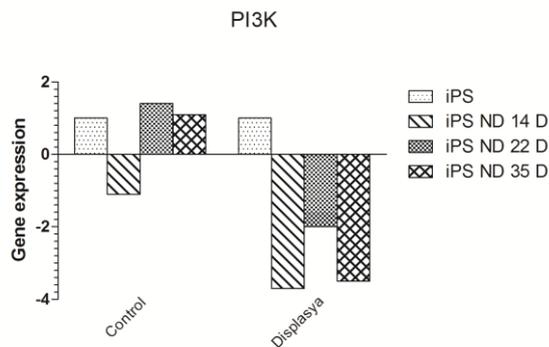


Figura 40. Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene PI3K durante a neurodiferenciação das iPSC.

7 DISCUSSÃO

As doenças do sistema nervoso central em geral determinam importantes repercussões físico e psicossociais e custo elevado para o indivíduo e para a sociedade. Enquanto avanços significativos têm sido alcançados nas últimas décadas em termos de investigação por neuroimagem e genética e no tratamento clínico e/ou cirúrgico em algumas patologias infelizmente os tratamentos clínicos curativos ainda são escassos (ICHIDA; KISKINIS, 2015).

O indiscutível avanço do uso da iPSC e a possibilidade posterior de diferenciação específica para o desenvolvimento de modelos celulares de doenças que acometem o sistema nervoso central, está permitindo uma nova abordagem para o estudo dos mecanismos nos contextos de neurodesenvolvimento embrionário e investigação patológica individualizada para cada paciente, considerando sua personalidade genética única (ICHIDA; KISKINIS, 2015).

Neste trabalho, nós desenvolvemos um modelo celular para o estudo da neurogênese embrionária de pacientes com epilepsia refratária ao tratamento medicamentoso e portadores de displasia cortical focal. Recentemente, alguns estudos têm mostrado relações entre alterações genéticas e diversos tipos de malformações corticais, relacionando de forma individualizada, os principais estágios do desenvolvimento do sistema nervoso central (KUZNIECKY, 2015). Mais de 100 genes já foram associados com diferentes tipos de malformações corticais (GUERRINI; DOBYNS, 2014). Os principais genes e consequentemente algumas vias de sinalização, relacionadas à malformação do córtex cerebral estão envolvidos no controle de apoptose, proliferação celular, estrutura de citoesqueleto, migração celular e neurodiferenciação. Essas alterações podem apresentar um impacto variável não só sob o padrão da malformação cortical como o local onde o córtex pode ser afetado (KUZNIECKY, 2015).

O diagnóstico de algumas malformações corticais, como por exemplo, megaencefalia, polimicrogiria, hemimegaencefalia e displasia cortical, são clinicamente gerados através de

características típicas em exame de imagem. Alterações patológicas nessas patologias incluem uma vasta gama de anomalias, incluindo aquelas tipicamente relacionadas à DCF.

O presente estudo mostrou a geração de células tronco pluripotentes induzidas de dois pacientes portadores de displasia cortical focal do Tipo Iib. Além da diferença de gênero, existe uma grande diferença entre a idade dos pacientes participantes desse trabalho. O Pct 01, sexo masculino tinha 45 anos de idade e o Pct 01, sexo feminino, 12 anos de idade na ocasião da participação no estudo. Ambos os pacientes foram submetidos à ressecção de tecido cerebral displásico.

As crises convulsivas (principal manifestação clínica) na DCF, geralmente iniciam-se na infância, mais especificamente na primeira década de vida (TASSI et al., 2001). A remissão das crises costuma ocorrer somente após o procedimento cirúrgico, porém sugere-se que com o avanço da idade, as crises podem vir a diminuir, uma vez que há perda de tecido epileptogênico, assim como diminuição do número de transportadores relacionados ao desenvolvimento de resistência às drogas (ANDERSON et al., 2011).

Ambos pacientes participantes do estudo apresentavam crises epiléticas refratárias ao tratamento medicamentoso. O sistema de monitoramento de crises por vídeo EEG mostrou alterações epileptiformes em ambos os pacientes, sendo atividade rítmica na região frontal direita, no início das crises para o Pct 01 e alterações epileptiformes e ondas lentas com distribuição multifocal, envolvendo o quadrante posterior direito, mas também o quadrante anterior esquerdo, com máximo na região frontal esquerda para o Pct 02.

Crianças com DCF tipo I são mais propensas a ser retardado mental e apresentam comportamentos desajustados mais frequentemente em comparação a crianças com DCF tipo II (KRSEK; PIEPER; et al., 2009). Além disso, o resultado cirúrgico é significativamente pior em pacientes com DCF tipo I (KRSEK; PIEPER; et al., 2009; LAWSON et al., 2005), provavelmente porque é mais difícil para delimitar a lesão e alcançar uma ressecção cirúrgica completa (HEMB et al., 2010; KRSEK; MATON; et al., 2009; LERNER et al., 2009). Pacientes com DCF tipo II manifestam sintomas mais cedo do que aqueles com o tipo de DCF tipo I. Além disso, aqueles com lesões maiores tendem a apresentar sintomas mais cedo do que pacientes com lesões menores (ABDIJADID et al., 2015).

Em pacientes pediátricos com DCF observa-se um aumento do número de neurônios nas camadas superiores do córtex, especificamente na camada molecular, bem como na substância branca (ANDRES et al., 2005). Em contraste, estudos estereológicos em paciente

adultos com DCF indicam uma redução na densidade neuronal global em comparação a um córtex normal (THOM et al., 2005). O presente estudo incluiu um paciente adulto e um paciente pediátrico com diagnóstico de DCF através de exames de imagem e EEG e confirmação de homogeneidade e do tipo de DCF através da análise histopatológica, classificando ambos os pacientes com displasia cortical focal do tipo I Ib, permitindo o pareamento dos envolvidos.

Um crescente número de alterações gênicas tem sido relacionadas a polimicrogiria e hemimegaencefalia especialmente os casos com fenótipos mais graves. megaencefalias com polimicroginia apresentam mutação em PI3K-CA e PI3K-R2. As hemimegaencefalias isoladas estão associadas a mutações em mosaico das vias PI3K, AKT e mTOR. Diferentemente dessas malformações, as causas da DCF ainda são desconhecidas. Especula-se que mutações somáticas clonais podem ser compartilhadas entre pacientes afetados. Estudos mostraram um aumento na sinalização de mTOR em DCF do tipo I Ib com base em moléculas fosforiladas com proteínas ribossomais S6 (JANSEN et al., 2015).

Cerca de 80% a 90% das células abalonadas presentes no córtex dos pacientes portadores de DCF do tipo I Ib, apresentam aumento na fosforilação na via mTOR. Alguns casos de DCF tipo I Ib também exibem aumento da atividade de PI3K e AKT (HSU, P. P. et al., 2011; KUZNIECKY, 2015; ZHOU et al., 2009). Um aumento na sinalização da via PI3K/AKT/mTOR foi evidenciado nas DCF tipo I Ia e I Ib com ausência de mutação genética, sendo atribuído outras causas associando mecanismos comuns a outras patologias (JANSEN et al., 2015).

O Pct 01 apresentou maior contagem de área de marcada por imunofluorescência com diferenças estatisticamente significativas nas vias AKT e mTOR, tanto fosforilada quanto não fosforilada. A fosforilação da via PI3K/ATK/mTOR em resposta a algum estímulo, está relacionada a um conjunto coordenado de eventos que controlam o crescimento celular, início do ciclo celular, migração e sobrevivência celular (CANTLEY, 2002).

Todos os componentes da via PI3K/AKT/mTOR incluindo a ativação de IGF1-R e IR são expressos em níveis bastante elevados no cérebro. O contexto de função desta via no sistema nervoso central difere entre o cérebro adulto onde as células são pós- mitóticas e o neurodesenvolvimento embrionário, onde as células estão em fase de divisão, proliferação, migração e morte celular. Durante o desenvolvimento embrionário, a sinalização da via PI3K/Akt/mTOR serve como um potente controlador neuronal de sobrevivência e divisão

celular, respondendo a fatores de crescimento e pistas de orientação. Isto contribui para o equilíbrio, sobrevivência e morte celular, formação do arcabouço radial para a migração dos neurônios, estímulo de migração, mielinização e estabelecimento de polaridade neuronal (C, 2013).

O funcionamento normal da via PI3K/AKT integra as respostas fisiológicas fundamentais para o envelhecimento saudável e para longevidade. Alguns estudos mostram que a redução na sinalização da via PI3K/AKT pode estar relacionado à extensão do tempo de vida útil de algumas espécies (JOHNSON, 2008; KENYON, 2010). Alterações nas vias de sinalização de PI3K/AKT/mTOR estão envolvidas em todas as principais doenças relacionadas ao envelhecimento, como doenças cardíacas e neurológicas. Por exemplo, o aumento da ativação dessa via de sinalização pode ser considerado uma característica precoce do aparecimento da doença de Alzheimer, mas também se relaciona com o envelhecimento normal dos indivíduos (C, 2013).

O aumento significativo da área das vias fosforiladas e não fosforiladas de AKT e mTOR do Pct 01 em relação ao Pct 02, pode estar relacionada com a diferença de idade entre os pacientes (Pct 01: 45 anos; Pct 02: 12 anos). Células gigantes e células abalonadas presentes no tecido cerebral de pacientes com DCF expressam marcadores de células neuronais adultas, células neuronais indiferenciadas e células gliais.

Uma comparação valorosa dessas vias analisadas seriam tecidos cerebrais de pacientes pareados pela idade, a fim de estabelecer uma correlação ou não do aumento da atividade de AKT e mTOR com o aumento da idade. A ausência deste grupo controle para essa etapa do experimento está ancorada na dificuldade de obtenção de tecido cerebral saudável passível de análise molecular e bioquímica, uma vez que deveriam ser considerados o tempo entre coleta e processamento da amostra e não poderiam ser originadas de tecido *post mortem*.

Apresentamos aqui uma ferramenta única para o estudo do neurodesenvolvimento na DCF, uma patologia com causas desconhecidas que compartilha um fenótipo e uma possível origem com outras malformações corticais, porém sem nenhum biomarcador molecular ou celular ainda conhecido.

Existem diferentes técnicas e maneiras de gerar células iPSC a partir de células somáticas, como por exemplo, indução química ou transfecção genética. Utilizando como premissa a técnica desenvolvida por Takahasi e Yamanaka em ofertar as células os quatro genes capazes de conferir pluripotência, faz-se necessário uma ferramenta para promover o

influxo desses genes ao interior das células. Os vetores retrovirais requerem a integração dos genes transfectados no genoma do hospedeiro para que possam passar a ser expressos juntamente com os demais genes da célula. Vetores adenovirais, adeno-associados e plasmidiais, não requerem integração, mas podem integrar o genoma hospedeiro de forma não programada causando algum tipo de transtorno. Os vetores virais presentes no CytoTune®-iPSC 2.0 Sendai Reprogramming são não integrativos, não apresentando nenhuma influência sobre o genoma da célula hospedeira (FUSAKI et al., 2009; LI et al., 2000). Este método de reprogramação usa vetores baseados em uma forma modificada, não transmissível do vírus respiratório Sendai (SeV - do inglês *Sendai Virus*) para oferecer as células hospedeiras os genes que conferem a pluripotência com segurança e eficácia e expressar esses fatores genéticos essenciais necessários à reprogramação de células somáticas em células iPSC. Utilizando o CytoTune®-iPSC 2.0 Sendai Reprogramming, foi obtido sucesso nas quatro reprogramações realizadas durante o curso desse trabalho, gerando clones com morfologia e tamanho adequados dentro dos períodos esperados e posteriormente caracterizados com marcadores específicos de pluripotência celular.

Após a geração das células-tronco pluripotentes induzidas, a confirmação do seu êxito foi dada pela caracterização dos clones através da marcação positiva para os marcadores Nanog, Sox2, Oct4, TRA1-60 e TRA1-81. Não existem critérios mínimos de exigência para caracterização de células iPSC, assim como são tratadas as células-tronco mesenquimais, por exemplo (DOMINICI et al., 2006). Entretanto, alguns marcadores são essenciais para que se possa confirmar a pluripotência das células geradas ou então o sucesso na manutenção das culturas em manter os clones de forma indiferenciada (ASPRER; LAKSHMIPATHY, 2015).

A Iniciativa Internacional de Células-tronco (ISCI - do inglês *International Stem Cell Initiative*) sugeriu um conjunto de marcadores para células pluripotentes baseados no que já tenha sido verificado como característica de pluripotência em 59 linhagens de células embrionárias humanas, são eles: NANOG, TDGF, Oct4, GABRB3, GDF3, DNMT3B, TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA3 e SSEA4 (ADEWUMI et al., 2007). Além desses marcadores, células embrionárias também podem ser caracterizadas através da detecção de SOX2, Rex1, expressão da hTERT, bem como a atividade da fosfatase alcalina (ASPRER; LAKSHMIPATHY, 2015).

As células indiferenciadas devem ser analisadas quanto à morfologia e expressão de marcadores de pluripotência e auto renovação, através de análise por imuno-histoquímica ou

por análise molecular (ADEWUMI et al., 2007). As células iPSC também devem diferenciar-se espontaneamente, e quando induzidas, devem gerar células e tecidos dos três folhetos embrionários *in vitro* e teratoma *in vivo* (ITSKOVITZ-ELDOR et al., 2000; MULLER et al., 2010).

O consenso utilizado atualmente para caracterizar células pluripotentes parte inicialmente da observação da morfologia dos clones gerados após a transfecção viral. Clones de iPSC gerados a partir de células humanas apresentam uma morfologia bastante distinta, com núcleos grandes em relação ao citoplasma e formas bem organizadas em colônias com bordas evidentemente definidas (Consensus guidance for banking and supply of human embryonic stem cell lines for research purposes, 2009; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). Os clones podem também ser avaliados pela sua morfologia a ponto de serem distinguidos em bons ou maus clones, com base em áreas de diferenciação, organização e afrouxamento das células. A manutenção dos cultivos dos clones foi baseada na observação da morfologia, mantendo os clones livres de áreas de diferenciação e realizando as devidas passagens quando necessário. Todos os clones que de forma espontânea diferenciaram-se ou apresentaram alguma alteração na sua morfologia capaz de sugerir perda de potencial de pluripotência foram descartados ao logo do trabalho.

As células iPSC geradas durante o presente trabalho, foram mantidas de forma controlada em relação a sua morfologia e zonas de diferenciação espontâneas comumente encontradas durante as fases de expansão e manutenção dos cultivos. Todos os clones foram caracterizados por imuno-histoquímica antes da expansão utilizando um perfil relacionado à pluripotência e auto renovação celular.

O protocolo de neurodiferenciação adotado no presente trabalho, não vislumbrou um tipo específico de neurônio (dopaminérgico, GABAérgico, por exemplo) ou células da glia a ser gerado a partir de células pluripotentes. A indução a neurodiferenciação foi conduzida principalmente pelo estímulo do fator BDNF em cultivo com meio basal para células nervosas.

Após 22 dias de cultivo sob indução da neurodiferenciação, foram observadas alterações morfológicas nas células. Nesse período de tempo analisado, as células apresentaram-se de forma muito semelhante a células nervosas, exibindo prolongamentos que evocavam estruturas como axônios e dendritos neuronais. O acompanhamento desses cultivos até o 35º dia de diferenciação com indução neural, permitiu a geração de células com a

morfologia ainda mais próxima a um cultivo de neurônios, com prolongamentos ainda mais extensos e apresentando uma tendência a interligarem-se, gerando uma espécie de rede intercomunicada das células em cultura.

Durante o protocolo de neurodiferenciação, não foi observada nenhuma diferença no comportamento e na morfologia das células iPSC dos pacientes portadores de DCF em comparação as células iPSC dos pacientes controle. A formação estrutural das células geradas pelo protocolo de neurodiferenciação parece não sofrer nenhuma influência pela presença da patologia no indivíduo adulto. O ensaio *in vitro* mostrou que a capacidade de gerar células neuronais em relação a sua estrutura, polarização e presença de marcadores específicos de neurônios, não é afetada pela DCF, sendo possível pressupor que a DCF não interfere no estado morfológico de um neurônio gerado pois células geradas de pacientes portadores de DCF assemelham-se a células de pacientes não afetados em seu estado morfológico e de polarização.

Existem algumas limitações frente à diferenciação de células, principalmente para linhagens neurais. Os protocolos de diferenciação neural exigem longos períodos de cultivo para obtenção de neurônios ou glias maduros (EIRAKU et al., 2008; NITYANANDAM; BALDWIN, 2015). O longo período de cultura pode promover o aumento da heterogeneidade das células no ambiente de cultivo, aumentando assim a possibilidade obter-se células em diferentes estágios de diferenciação ou de diferentes subclassificações formando um ambiente do tipo mosaico (SANDOE; EGGAN, 2013). Diferenças sutis na proporção dos subtipos distintos de células precursoras nervosas que surgem em diferentes etapas da neurodiferenciação podem se expandir e diferenciarem-se em precursoras com destinos finais restritos ou neurônios pós-mitóticos. Além disso, devido a natureza assíncrona dos ambientes de cultura, células precursoras neurais de diversas etapas e células já comprometidas com a diferenciação coexistem com neurônios já diferenciados e também em diferentes fases de maturação neuronal. Esse tipo de heterogeneidade é um problema, pois aumenta a variabilidade entre repetições técnicas e potencialmente podem mascarar um fenótipo específico para apenas um subconjunto de células em cultura (KIM et al., 2014; SANDOE; EGGAN, 2013).

Nosso protocolo de neurodiferenciação iniciou-se pela dissociação dos clones de iPSC para o cultivo sob indução a diferenciação neural por 35 dias. Não foi realizado nenhum protocolo para a identificação de possíveis subtipos de neurônios ou neurônios em diferentes

fases de neurodiferenciação nos períodos avaliados (14 dias, 22 dias e 35 dias). Nessas diferentes fases, foram realizadas análises moleculares de genes relacionados a vias de sinalização encontradas comumente alteradas nos tecidos cerebrais de pacientes portadores de DCF.

Ao final da neurodiferenciação, foi realizada análise qualitativa e amostral através de imunofluorescência para marcadores específicos de células nervosas. O marcador FluoroPan Neuronal Marker alcança uma completa marcação morfológica das células, reagindo contra proteínas específicas nucleares, dendríticas e axonais distribuídas em toda cito-arquitetura nos neurônios.

A maioria dos protocolos de neurodiferenciação de iPSC tem sido caracterizado por marcadores genéricos, que marcam diferentes subtipos neuronais como por exemplo neurônios dopaminérgicos e GABAérgico. Durante a neurodiferenciação *in vitro*, a expressão de um ou dois marcadores neuronais pode não ser suficiente para estabelecer a verdadeira identidade de um neurônio, uma vez que esses marcadores podem ser expressos por neurônios de diferentes regiões do cérebro ou durante outras fases do neurodesenvolvimento. Protocolos projetados para a conversão de células iPSC em subtipos de neurônios específicos de interesse a determinada doença, também produzem outros tipos de neurônios com frequência variável, dificultando a análise fenotípica e a geração de um modelo celular adequado (HANSEN; RUBENSTEIN; KRIEGSTEIN, 2011).

Uma das principais especulações frente das displasias corticais está relacionada, de uma forma ainda não bem esclarecida, a possíveis alterações no processo de migração celular durante o neurodesenvolvimento embrionário.

Podemos considerar que o neurodesenvolvimento está firmado em três principais etapas, proliferação de células precursoras, migração celular para a um local específico e diferenciação neuronal local. A fase de proliferação das células precursoras neurais acontece na zona ventricular. Nesse período ocorre a chamada coreografia da proliferação celular, onde o ainda neuroblasto estende um prolongamento em direção à zona cortical, chamada nessa fase de superfície da pia, para que seu núcleo alcance tal região e ocorra a duplicação do seu DNA. Após, esse núcleo retorna a superfície ventricular onde passa por uma divisão mitótica podendo gerar uma célula precursora idêntica ou então uma nova célula com potencial de migração. O que confere essa diferença entre permanecer uma célula precursora ou então tornar-se uma célula migratória está relacionado com divisões chamadas simétricas ou

assimétricas ou também chamadas de clivagem vertical ou horizontal, alterando assim as concentrações de NOTCH e NUMB no interior da célula, estimulando-a a tornar-se madura para migração ou então manter-se como uma célula precursora. A migração ocorrerá principalmente ao longo das finas fibras das glia radiais que irradiam da zona ventricular para zona cortical. O destino das células migratórias dependerá de fatores como a idade da célula precursora, a posição dessa célula na zona ventricular e o ambiente que está emergido (BEAR, 2008).

A migração de células pluripotentes de pacientes portadores de DCF e pacientes não afetados após três e sete dias de indução, não apresentou diferença na área quantificada de células que migraram através da membrana porosa para o sítio de atração.

Se existe alguma alteração referente à migração celular durante o neurodesenvolvimento embrionário dos pacientes portadores de DCF, essa alteração possivelmente não afeta as células embrionárias e sim ocorre em outras etapas durante o início da corticogênese. A possível alteração do potencial de migração celular na DCF parece não ser inerente às células uma vez que nas células embrionárias geradas não há diferença na capacidade de migração em comparação ao controle.

A comparação do potencial de migração das células iPSC pode atribuir que as células embrionárias providas dos pacientes portadores de DCF não apresentam diferença na capacidade migratória através da barreira, mas também podem não apresentarem diferença na percepção do estímulo dado para que as células possam migrar. O fato de haver atribuição na falha do processo de migração celular durante a corticogênese de pacientes afetados com DCF, não necessariamente está associado a alterações nos mecanismos migratórios, como por exemplo, falta de proteínas de adesão a glia radial, e sim pode ser relacionado a uma dificuldade ou até mesmo uma hipersensibilidade aos estímulos migratórios o que poderia ocasionar um retardo no início do processo de migração ou então uma antecipação do processo de migração das células afetadas permitindo com que a migração ocorra antes da formação completa dos arcos radiais alterando assim a chegada dessas células na região cortical correta. Outra hipótese seria uma falha na percepção da sinalização para o destino da célula migratória, fazendo com que a mesma não encontre seu destino final, ficando retida em regiões inespecíficas e alterando assim a formação do córtex cerebral.

Em contrapartida, o ensaio de migração celular dos fibroblastos mostrou uma capacidade de migração celular mais elevada nos pacientes portadores de DCF nas duas primeiras etapas (24 horas e 48 horas) em comparação ao controle.

Os fibroblastos são encontrados no estroma de diferentes tecidos, eles desempenham um papel fundamental na manutenção da integridade e homeostase do tecido conjuntivo, sendo as principais células envolvidas no processo de reparo tecidual (CLEARY; GIBSON, 1983). Características de células indiferenciadas já foram atribuídas aos fibroblastos maduros, como por exemplo, em resposta a ferimentos, mecanismos de estresse tecidual, inflamações, alguns fibroblastos atuam no local de ferimentos através de migração, proliferando para restabelecer a homeostasia dos tecidos reduzindo a inflamação local (ARIEL; SERHAN, 2007; SERHAN et al., 2007). Observamos aqui que as células adultas (fibroblastos) dos pacientes portadores de DCF apresentam maior potencial de migração celular, o que não ocorre nas células pluripotentes. Essa observação pode indicar que uma possível alteração no processo de migração celular realmente ocorra após a diferenciação dos tecidos, mantendo-se alterada mesmo após a maturação final a uma determinada linha tecidual. Interessante salientar o aumento da potencialidade de migração das células dos pacientes portadores de DCF uma vez que conceitualmente, a presença de células dismórficas e fora da posição final correta no córtex cerebral adulto dos pacientes com DCF tende a pactuar com um retardo durante a fase de migração das células no desenvolvimento cortical. Esse achado um tanto paradoxal, pode apontar que, durante a neurogênese cortical os neuroblastos de portadores de DCF iniciam sua fase de migração antes do período fisiologicamente típico, podendo essas células não estar aptas à migração ou ainda a estrutura do arca-bouço radial ainda não esteja plenamente formada para o processo, dificultando a chegada dessas células ao seu preciso destino.

Existe um subconjunto de anomalias classicamente consideradas como alteração na migração celular durante o desenvolvimento cortical, são as chamadas anomalias migratórias. Essa categoria inclui as lisencefalias, polimicrogiria e DCF. Dados recentes confirmam a hipótese de alterações na migração celular para algumas malformações, mas indicam que pode haver patogêneses distintas envolvidas (RORKE, 1994).

O crescimento e a proliferação celular requerem uma orquestrada coordenação entre sinais estimuladores decorrentes de nutrientes e fatores de crescimento e inibidores de derivam de respostas e estresse intracelular e extracelular (LIU et al., 2007). A via de

sinalização PI3K/AKT/mTOR, pode ser considerada a principal via relacionada a sinalização de fatores de crescimento e proliferação, promovendo o controle da resistência a apoptose, proliferação celular, sobrevivência e migração (KEITH; SCHREIBER, 1995).

4EBP-1 é um alvo celular da atividade de mTOR quinase e conhecido por mediar a função de mTOR no controle de tradução de células de mamíferos. O preciso mecanismo molecular de mTOR associado a 4EBP-1 ainda não é completamente conhecido (LIU et al., 2007). É considerado um dos mais importantes controladores dos níveis de tradução das células, e sua atividade é controlada por mTOR. O papel biológico de 4EBP-1 não está claro até o momento em organismos em desenvolvimento. Desde que mTOR demonstrou influência no crescimento dos tecidos durante o desenvolvimento, também foi atribuído a 4EBP-1 o papel de regulador de crescimento celular principalmente durante o desenvolvimento dos tecidos (TELEMAN; CHEN; COHEN, 2005).

Quando 4EBP-1 está ativada, os níveis de tradução de forma geral nas células estão diminuídos. Sua atividade é regulada através da fosforilação de mTOR (HAY; SONENBERG, 2004). Como se trata de um fator de inibição de síntese proteica, seu declínio simboliza um incremento geral na síntese proteica celular (LIU et al., 2007).

Os fibroblastos dos pacientes portadores de DCF apresentaram níveis de expressão de 4EBP-1 bastante menores quando comparado com pacientes controle. O declínio da expressão de 4EBP-1 nos fibroblastos indica um aumento global na síntese proteica desses fibroblastos analisados. Possivelmente as os fibroblastos dos pacientes com DCF possuem uma taxa metabólica mais elevada ou estavam biologicamente mais ativos visto que todos os fibroblastos estavam no mesmo estágio fisiológico e no mesmo número de passagem.

O protocolo de neurodiferenciação alterou de os níveis de expressão de 4EBP-1 de forma diferente para as células iPSC dos pacientes com DCF e para as células iPSC do grupo controle. Novamente as células dos pacientes portadores de DCF reduziram a expressão gênica principalmente nos dias 14 e 35 do protocolo de neurodiferenciação, indicando um aumento na síntese proteica dessas células durante a indução a neurodiferenciação, o que não ocorreu com os pacientes controles. Os fibroblastos e as células iPSC neurodiferenciadas dos pacientes portadores de DCF parecem ter níveis de síntese proteica mais elevados do que os controles analisados devido a redução da expressão de 4EBP-1. Esse achado pode ser relacionado com um possível aumento metabólico das células tanto os fibroblastos de

pacientes com DCF quanto as células iPSC dos pacientes ao serem conduzidas a diferenciação neuronal.

Uma possível correlação entre a malformação cortical de pacientes portadores de DCF pode estar atinente a um aumento excessivo nos níveis de divisão celular, aumentando excessivamente a população de neuroblasto no início da neurodiferenciação embrionária e impedindo o curso normal de migração e diferenciação. Pode-se até mesmo relacionar a um possível mecanismo de potencial de migração acentuado, como visto no ensaio de migração dos fibroblastos, que poderia desencadear uma migração mais rápida ou então antes do tempo exato de maturação da célula migratória ou da formação radial fundamental ao sucesso da migração.

A β -Catenina é uma proteína com função na regulação da adesão célula a célula. Ela é uma subunidade da proteína Caderina que atua também no sinal intracelular em uma via bastante conhecida no neurodesenvolvimento, a via WNT. As proteínas WNT são de uma família de moléculas de sinalização que participam de vários eventos de desenvolvimento durante a embriogênese e homeostase dos tecidos (LOGAN; NUSSE, 2004). Quando seus níveis são desregulados, podem levar a diversas doenças e malformações. Em nível celular, a via WNT regula mecanismos de apoptose, autorrenovação e motilidade das células-tronco residentes nos diferentes tecidos (WILLERT; NUSSE, 2012).

A adesão célula a célula é essencial para a formação de tecidos complexos e organizados. A β -Catenina é uma das proteínas do complexo que formam as junções aderentes das células. A β -Catenina pode além de regular a adesão das células, o crescimento celular. Ela também pode ser responsável pela transmissão de sinal de indução de contato que faz com que as células parem de se dividir uma vez formado um tecido (BREMBECK; ROSARIO; BIRCHMEIER, 2006).

A expressão de β -Catenina desempenha um papel crítico durante o desenvolvimento embrionário, pois atua no direcionamento da formação dos diferentes tecidos para formação do embrião. Hofsteen e colaboradores em 2015 descreveram que a inibição da sinalização de WNT/ β -Catenina pelo regulador do desenvolvimento cardíaco (DAB2) é essencial para estabelecer o correto número de cardiomiócitos do tecido cardíaco em desenvolvimento (HOFSTEEN et al., 2016). Embriões de camundongos knock-out para β -Catenina apresentaram falha no desenvolvimento mesodérmico e falha no início do processo de

grastulação e também o desenvolvimento ectodérmico, o qual foi afetado a partir do sétimo dia da embriogênese (HAEGEL et al., 1995).

Durante o protocolo de neurodiferenciação, houve um aumento na expressão de β -Catenina e mantiveram-se estáveis durante todo o intervalo analisado para os pacientes não afetados. Nos pacientes com DCF, também ocorreu um aumento na expressão de β -Catenina nos dois primeiros intervalos de tempo (14 e 22 dias) porém muito menos expressivo se comparado ao aumento que ocorreu no grupo controle. Além disso, para os pacientes com DCF, no 35º dia de indução a diferenciação houve uma redução de 2,5 vezes a expressão de β -Catenina com comparação a células iPSC com DCF não diferenciadas. Durante o desenvolvimento embrionário, níveis adequados de β -Catenina são essenciais para a formação de todo o embrião, em especial o desenvolvimento do sistema nervoso central. Quando comparado ao grupo controle, os níveis de β -Catenina expressos durante a neurodiferenciação das iPSC de portadores de DCF são bastante inferiores aos níveis detectados nos pacientes controle, podendo ser relacionado com possíveis quantidades insuficientes de β -Catenina durante a corticogênese. Essas quantidades insuficientes de β -Catenina nas diferentes fases do neurodesenvolvimento do cérebro dos pacientes podem estar relacionadas com o comprometimento de mecanismos fundamentais para o neurodesenvolvimento normal. Os neuroblastos dos pacientes com DCF podem assim não realizarem a migração via arcação radial de forma apropriada devido à dificuldade de adesão dos neurônios migratórios as glias radiais, alterando o curso migratório ou dificultando a chegada à placa cortical ou gerando neurônios retardatários que não alcançam seu local de destino formando o córtex aberrante com presença de células gigantes ou abalonadas na substância branca.

A falta de laminação presente nas DCF's do tipo II pode ser também atribuída pela deficiência de β -Catenina durante a formação do sistema nervoso central. Os neurônios que chegam ao córtex para formar as diferentes camadas corticais necessitam de contato célula a célula, pois a formação dessas camadas depende da disposição temporal dos neurônios migratórios, que formam as laminações nos sentido ventrículo-cortical, sendo que as células que chegam para formação das camadas mais corticais necessitam transpassar os neurônios já presentes nas camadas mais ventriculares.

Além disso, pela interação de β -Catenina com a via WNT, níveis alterados de β -Catenina podem comprometer de forma global da o desenvolvimento dos três folhetos embrionários, podendo resultar em distintas malformações, inclusive as displasias corticais.

As famílias dos inibidores de apoptose (IAP do inglês - *Inhibitor of Apoptosis*), são reguladores chave da morte celular programada. A família IAP é composta por oito membros distintos que participam em diversos processos celulares incluindo o ciclo celular (ECKELMAN; SALVESEN; SCOTT, 2006).

CIAP-1 e CIAP-2 foram identificados através de uma interação com o receptor de TNF, complexo de proteínas TRAF1 e TRAF2 e com a regulação do NF- κ B. Apesar de CIAP1 e CIAP2 desempenharem funções semelhantes dentro a célula, a sua expressão é regulada de forma diferente. A expressão de CIAP2 é principalmente controlada ao nível da transcrição de forma a NF- κ B-dependente (WANG, C. Y. et al., 1998). Em contraste, os níveis de CIAP-1 são controlados ao nível de síntese de proteínas. Essa rede complexa de regulação reflete dos diferentes estados temporais e espaciais para proteínas CIAP-1 e CIAP-2 em resposta a várias condições fisiológicas (ZHAO et al., 2009).

O preciso papel biológico de CIAP-1 e CIAP-2 ainda não são bem esclarecidos. Alguns dados bioquímicos indicam que agem como inibidores de caspases, podendo ligar-se as caspases fazendo a inibição, porém podem também não as inibir (CHU et al., 1997; SAMUEL et al., 2006).

Durante o protocolo de neurodiferenciação, houve um aumento de cerca de 20 vezes na expressão do gene CIAP-1, sendo que no período de 22 dias de diferenciação o aumento da expressão alcançou os valores mais altos de toda a análise. Isso ocorreu apenas no grupo de pacientes controle. Na diferenciação das iPSC dos pacientes portadores de DCF os níveis de expressão relativas de CIAP -1 mantiveram-se estáveis muito semelhantes aos níveis encontrados nas células iPSC de DCF não diferenciadas, não esboçando nenhum aumento. O resultado sugere que durante a neurodiferenciação das iPSC controles, foi promovido efeito anti-apoptótico pelo aumento da expressão de CIAP-1 e conseqüentemente uma inibição das caspases nas células do grupo controle. Durante a neurodiferenciação, os níveis de CIAP-2 no grupo controle mantiveram-se muito próximos aos níveis expressos pelas células iPSC não diferenciadas e 23 vezes menos expressa nas no 14^o dia de indução a neurodiferenciação das células iPSC dos pacientes com DCF. A inibição da morte celular programada durante a neurodiferenciação pode ter um papel na regulação da quantidade de células precursoras durante a fase de proliferação celular assim como nas demais etapas da formação do cérebro.

A apoptose ocorre extensivamente durante o desenvolvimento normal do sistema nervoso de mamíferos, e tem sido observada em distintas populações, como por exemplo

células precursoras neurais, neurônios diferenciados pós mitóticos e também células da glia (BUSS; SUN; OPPENHEIM, 2006; JACOBSON; WEIL; RAFF, 1997; OPPENHEIM, 1991). Essas mortes celulares programadas são importantes para o estabelecimento de populações neuronais e gliais com proporções corretas. Durante o desenvolvimento normal dos mamíferos, cerca de um terço das células normalmente morrem por apoptose durante as duas primeiras semanas após o nascimento (KRISTIANSEN; HAM, 2014).

MCL 1 é uma proteína anti-apoptótica relacionada com a Bcl-2 e foi originalmente isolado a partir de células de leucemia mielóide humana. MCL 1 é amplamente expresso em neurônios e sua transcrição é rapidamente induzida (MORI et al., 2004).

O papel do gene MCL 1 é promover a sobrevivência das células sob condições que possam promover a morte celular programada (HSU, S. Y.; HSUEH, 2000; KOZOPAS et al., 1993). No ano de 2004, Mori e colaboradores identificaram inesperadamente uma expressão fortemente aumentada de MCL 1 em hipocampus de ratos após períodos de crises convulsivas (MORI et al., 2004).

Diversos trabalhos apresentaram evidências que sugerem que o gene MCL 1 contribui diretamente na neuroproteção. Até o presente momento, observou-se apenas uma forma de *splice* chamada de longa sendo expressa no tecido cerebral. A proteína humana MCL 1 possui formas de *splices* longos e curtos, com contraste entre anti-apoptose e pró-apoptose, respectivamente (BAE et al., 2000; BINGLE et al., 2000).

No grupo controle, os níveis de expressão de MCL 1 durante a neurodiferenciação mantiveram-se muito semelhantes ao calibrador (iPSC não diferenciada). Em contraste, no 22º dia de diferenciação das iPSC dos pacientes com DCF houve um aumento de 10,7 vezes a expressão do gene.

Em análise temporal, a ativação de MCL 1 inicia em um intervalo precedente ao aparecimento de apoptose (MORI et al., 2004). Insultos como hipóxia ou crises convulsivas podem gerar ambientes propensos a apoptose das células afetadas, porém não mortas pelo insulto, com o objetivo de eliminar possíveis células com algum tipo de dano. O aumento na expressão de MCL 1 no 22º dia do protocolo de neurodiferenciação pode ser associado a uma antecipação ao processo de apoptose desencadeado por um insulto durante o cultivo celular. Pode ainda nesse período ser essencial para o neurodesenvolvimento normal, uma quantidade programada de células a serem eliminadas pelo processo de morte celular programada. Foi identificado que a ativação de MCL 1 como mediador da apoptose relaciona-se com insultos

citotóxicos no tecido cerebral (MORI et al., 2004). Portanto pode-se presumir que as células iPSC do grupo displasia cortical foram sensíveis e possivelmente responderam a uma ação citotóxica antes do 22º dia de neurodiferenciação, ou que as células do grupo controle não bloqueiam uma possível apoptose fisiológica necessária para o curso normal das demais etapas da corticogênese. Devido ao compartilhamento do mesmo ambiente de cultura, pode se pressupor que as células iPSC dos pacientes com DCF possuem maior suscetibilidade a um possível insulto causado por algum mecanismo durante a indução a neurodiferenciação, podendo aludir a uma fragilidade durante a neurogênese embrionária capaz de comprometer a formação normal do córtex cerebral ou a permanência de células que deveriam ser eliminadas por apoptose durante uma determinada fase da neurogênese.

A resistência a múltiplos fármacos para uma grande categoria de agentes foi encontrado a partir da verificação da diminuição do acúmulo de drogas no ambiente intracelular e o aumento da expressão de um gene altamente conservado chamado de gene de resistência a múltiplos fármacos (MDR - do inglês: *Multidrug Resistance*) (BECK, 1987).

MDR1 é uma proteína que confere a resistência a múltiplas drogas. Está bastante presente nas células do intestino e em diversos tecidos tumorais. Os níveis de expressão de MDR1 é uma preocupação para a efetividade de tratamentos quimioterápicos (MATSUDA et al., 2013).

A multirresistência dos cânceres, apresentam níveis de super expressão do gene MDR1. Dados recentes indicam a possibilidade do envolvimento do gene MDR1 na resistência a fármacos para o tratamento de epilepsia. Foi demonstrado expressão de MDR1 nas células endoteliais da barreira sangue-cérebro e também do tecido cerebral de pacientes com epilepsia refratária a medicação (WANG, L. et al., 2014).

O tecido cerebral dos pacientes portadores de DCF (também refratários a medicação) apresentaram nível extremamente elevados de expressão de MDR1 quando comparado a fibroblastos e cerca de 200 vezes mais elevados quando comparado ao tecido cerebral saudável. Esses níveis elevados de expressão de MDR1 podem estar relacionados ao um mecanismo de resistência ao tratamento medicamentoso desses pacientes. Por outro lado, células iPSC de pacientes controle e pacientes com DCF possuem níveis de expressão bastante semelhantes aos fibroblastos, o que parece indicar que o desenvolvimento da possível refratariedade mediada pelo aumento da expressão de MDR1 não ocorre nos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário ou não está constantemente sendo expresso por

outros tipos celulares dos pacientes com DCF a não ser o tecido cerebral adulto. Durante a neurodiferenciação das células iPSC, os níveis de expressão de MDR1 mantiveram-se estáveis em muito próximos aos níveis expressos pelos fibroblastos, apenas com um aumento na expressão de MDR1 na última etapa da neurodiferenciação das iPSC dos pacientes controles.

Esses resultados podem apontar que o possível mecanismo de resistência ao tratamento medicamentoso associado a MDR1 não ocorre durante o neurodesenvolvimento do córtex dos pacientes portadores de DCF e sim, possivelmente venha a ocorrer de forma gradual ao longo do desenvolvimento do indivíduo e seu cérebro já formado. Os altos níveis de expressão de MDR1 no cérebro dos pacientes com DCF podem também ser associados a um mecanismo de contato a diferentes fármacos e a então resistência adquirida, não sendo alterado nas células embrionárias e também durante a neurodiferenciação.

A sinalização através de PI3K possui diferentes papéis nas diversificadas atribuições do corpo humano, regulando funções essenciais como crescimento celular, migração celular, diferenciação e sobrevivência (GROSS; BASSELL, 2014). Além de ser relacionada com essas funções vitais de sobrevivência celular, a atividade da via PI3K é também a chave de regulação das funções neuronais. A via PI3K transmite sinais de receptores de superfície celular a via AKT/mTOR, sendo essencial para a sinapse, para o desenvolvimento de espinhas dendríticas e para forma durável de plasticidade sináptica subjacente a memória e aprendizado (CUESTO et al., 2011; JAWORSKI et al., 2005; LEE, C. C.; HUANG; HSU, 2011). Portanto, no que se diz respeito ao desenvolvimento do cérebro, a via de sinalização PI3K/AKT/mTOR tem se mostrado centralmente importante para a edificação normal do cérebro, bem como alterações nessa via podem desencadear diversas doenças neurológicas em seres humanos (JANSEN et al., 2015).

Os distúrbios de crescimento e desenvolvimento do cérebro são as causas mais significantes da epilepsia, comprometimento cognitivo, autismo e outros complexos problemas de ordem neurológica, sendo responsável por cerca de 100 diferentes descritas (HEVNER, 2015; OLNEY, 2007). PI3K/AKT/mTOR é um grupo de proteínas multifuncionais que controlam diversas atividades celulares, incluindo a apoptose, a migração celular, a transformação, o tráfego, a transcrição gênica e o metabolismo (CHAN; YE, 2012; RONG et al., 2003; SHIBA et al., 2010; TANG et al., 2008). No sistema nervoso central estas proteínas participam de uma grande variedade de funções, incluindo a sobrevivência

celular, o controle de apoptose, a migração neuronal, o desenvolvimento morfológico dos neurônios e o processo de neurotransmissão (KATSO et al., 2001; WAITE; EICKHOLT, 2010; YAMAZAKI; ZAWALICH; ZAWALICH, 2010).

Uma isoforma de PI3K por *splicing* alternativo, chamada de PIKE é um componente importante na sinalização de Netrina-1, que é responsável pela quimioatração das células migratórias e para formação dos prolongamentos axonais durante a neurogênese. A Netrina-1 também controle a arborização do axônio e a formação das sinapses durante o desenvolvimento neural (CHAN; YE, 2012; TANG et al., 2008).

O protocolo de neurodiferenciação das células iPSC mostrou uma notável redução na expressão do gene PI3K nas células dos pacientes afetados em relação a células iPSC não diferenciadas. Nos pacientes do grupo controle, os níveis de expressão de PI3K durante as diferentes fases da neurodiferenciação foram muito semelhantes aqueles das células iPSC não diferenciadas. Deficiências na expressão de PI3K podem promover alterações de diversas ordens durante a formação dos tecidos embrionários. Particularmente no SNC, funções substanciais para o acurado processo de desenvolvimento do cérebro podem ser afetadas pelas consequências desencadeadas por alterações na via PI3K, sendo englobados todos os processos essenciais para a formação cortical e as especuladas disfunções de cada um desses processos que podem estar envolvidos do desenvolvimento de diversas doenças cerebrais, especialmente as displasias corticais.

A deficiência nos níveis de PI3K nas células iPSC dos pacientes portadores de DCF pode ser responsável em promover alterações na formação do cérebro através de modificação qualquer uma das etapas cruciais do neurodesenvolvimento, podendo influenciar na fase de proliferação das células precursoras, na fase de migração dos neuroblastos, implementação dos neuroblastos no córtex em formação, na diferenciação em neurônios específicos, no crescimento de prolongamentos axonais e formação de dendritos e no controle de morte celular programada.

Os alicerces da displasia cortical focal então de certa forma baseados no funcionamento da via PI3K/AKT/mTOR. Possíveis alterações nessa via certamente influenciam etapas da neurogênese e principalmente da corticogênese.

As etapas desse complexo processo de formação do cérebro humano são regidas por uma infinidade de rotas e sinalizações celulares, sendo cada etapa de extrema importância para a que a procede.

O entendimento global do neurodesenvolvimento e do funcionamento normal do sistema cerebral, depende do conhecimento amplo da formação do cérebro, do padrão das conexões entre os neurônios, e entre as regiões cerebrais, bem como das comunicações sinápticas que constituem essas devidas conexões.

Estudos com células iPSC de pacientes portadores de DCF permitirá uma investigação, em todas as fases do neurodesenvolvimento, das evidências clínicas e moleculares encontradas no tecido afetado adulto, devido a oportunidade que a metodologia das iPSC oferece.

Além disso, as iPSC geradas permitirão simular *in vitro* os processos envolvidos na neurogênese embrionária e possíveis alterações que podem estar relacionadas com o desenvolvimento anormal do córtex cerebral que os pacientes com DCF apresentam. Alterações no potencial de migração celular, nos estímulos e nos potenciais de neurodiferenciação, nas vias de sinalização específicas são os alguns dos principais candidatos para as alterações encontradas no córtex de pacientes com DCF. Poderemos agora elucidar questões relacionadas a essas lacunas, gerando resultados únicos sobre a neurogênese embrionária e todos os processos envolvidos durante a formação cortical de indivíduos com DCF e relacionar as novas descobertas a fisiopatologia dessa doença esperando contribuir no futuro para aprimoramento do tratamento clínico deste distúrbio do desenvolvimento cortical.

8 CONCLUSÃO

Apresentamos aqui talvez o início da solução de uma grande especulação em relação ao entendimento do neurodesenvolvimento embrionário relacionado à displasia cortical focal, uma doença com gênese ainda não bem definida. A geração de células iPSC a partir de fibroblastos de pele foi estabelecida com êxito, possibilitando o direcionamento de novos estudos utilizando as células geradas, bem como a viabilidade de reprogramação de células de interesse de pacientes acometidos por outras doenças do sistema nervoso central.

Nossos resultados apresentam diferenças no potencial de migração de células adultas e na expressão de genes relacionados a processos fundamentais do desenvolvimento normal do cérebro em de células iPSC e durante o processo de neurodiferenciação.

Esses resultados sugerem que durante a neurogênese embrionária, neuroblastos de portadores de DCF podem ser mais sensíveis a estímulos migratórios, iniciando sua fase de migração antes do período fisiologicamente típico. Alterações em processos como de proliferação celular acentuada, deficiência de proteína de adesão celular, alteração na expressão de genes responsáveis pelo controle de apoptose e alteração na via PI3K responsável no sistema nervoso central pela sobrevivência celular, controle de apoptose, migração neuronal, desenvolvimento morfológico dos neurônios e processo de neurotransmissão sináptica puderam ser evidenciadas nas células dos pacientes com DCF em relação aos pacientes controle e podem estar relacionadas com a formação do cérebro com displasia.

Baseado nesses resultados, a investigação isolada de cada um dos possíveis mecanismos envolvidos na formação do cérebro e potencialmente alterados nos pacientes com displasia cortical focal permitirá contribuir de forma relevante e considerável para o entendimento da neuroembriologia das displasias, especialmente da displasia cortical focal do tipo IIb.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDIJADID, S. et al. Basic mechanisms of epileptogenesis in pediatric cortical dysplasia. **CNS Neurosci Ther**, v. 21, n. 2, p. 92-103, Feb 2015.

ADEWUMI, O. et al. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. **Nat Biotechnol**, v. 25, n. 7, p. 803-16, Jul 2007.

ANDERSON, J.; HARDER, P.; DUNCAN, J. S. Seizure freedom following 49 years of refractory epilepsy due to focal cortical dysplasia. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 82, n. 6, p. 706-7, Jun 2011.

ANDRES, M. et al. Human cortical dysplasia and epilepsy: an ontogenetic hypothesis based on volumetric MRI and NeuN neuronal density and size measurements. **Cereb Cortex**, v. 15, n. 2, p. 194-210, Feb 2005.

ARAI, A. et al. Abnormal maturation and differentiation of neocortical neurons in epileptogenic cortical malformation: unique distribution of layer-specific marker cells of focal cortical dysplasia and hemimegalencephaly. **Brain Res**, v. 1470, p. 89-97, Aug 27 2012.

ARIEL, A.; SERHAN, C. N. Resolvins and protectins in the termination program of acute inflammation. **Trends Immunol**, v. 28, n. 4, p. 176-83, Apr 2007.

ASPRER, J. S.; LAKSHMIPATHY, U. Current methods and challenges in the comprehensive characterization of human pluripotent stem cells. **Stem Cell Rev**, v. 11, n. 2, p. 357-72, Apr 2015.

BAE, J. et al. MCL -1S, a splicing variant of the antiapoptotic BCL-2 family member MCL -1, encodes a proapoptotic protein possessing only the BH3 domain. **J Biol Chem**, v. 275, n. 33, p. 25255-61, Aug 18 2000.

BEAR, M. F. C., B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. Artmed, 2008. 896 ISBN 978-85-363-1333-7.

BECK, W. T. The cell biology of multiple drug resistance. **Biochem Pharmacol**, v. 36, n. 18, p. 2879-87, Sep 15 1987.

BINGLE, C. D. et al. Exon skipping in MCL -1 results in a bcl-2 homology domain 3 only gene product that promotes cell death. **J Biol Chem**, v. 275, n. 29, p. 22136-46, Jul 21 2000.

BLUMCKE, I. et al. Evidence for developmental precursor lesions in epilepsy-associated glioneuronal tumors. **Microsc Res Tech**, v. 46, n. 1, p. 53-8, Jul 1 1999.

BLUMCKE, I. et al. The clinicopathologic spectrum of focal cortical dysplasias: a consensus classification proposed by an ad hoc Task Force of the ILAE Diagnostic Methods Commission. **Epilepsia**, v. 52, n. 1, p. 158-74, Jan 2011.

BREMBECK, F. H.; ROSARIO, M.; BIRCHMEIER, W. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. **Curr Opin Genet Dev**, v. 16, n. 1, p. 51-9, Feb 2006.

BUSS, R. R.; SUN, W.; OPPENHEIM, R. W. Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development. **Annu Rev Neurosci**, v. 29, p. 1-35, 2006.

C, O. N. PI3-kinase/Akt/mTOR signaling: impaired on/off switches in aging, cognitive decline and Alzheimer's disease. **Exp Gerontol**, v. 48, n. 7, p. 647-53, Jul 2013.

CAMPBELL, K. H. et al. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. **Nature**, v. 380, n. 6569, p. 64-6, Mar 7 1996.

CANTLEY, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science**, v. 296, n. 5573, p. 1655-7, May 31 2002.

CHAN, C. B.; YE, K. Phosphoinositide 3-kinase enhancer (PIKE) in the brain: is it simply a phosphoinositide 3-kinase/Akt enhancer? **Rev Neurosci**, v. 23, n. 2, p. 153-61, 2012.

CHESNE, P. et al. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nat Biotechnol**, v. 20, n. 4, p. 366-9, Apr 2002.

CHU, Z. L. et al. Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 19, p. 10057-62, Sep 16 1997.

CHUNG, C. Y. et al. Identification and rescue of alpha-synuclein toxicity in Parkinson patient-derived neurons. **Science**, v. 342, n. 6161, p. 983-7, Nov 22 2013.

CHUNG, Y. G. et al. Human somatic cell nuclear transfer using adult cells. **Cell Stem Cell**, v. 14, n. 6, p. 777-80, Jun 5 2014.

CLEARY, E. G.; GIBSON, M. A. Elastin-associated microfibrils and microfibrillar proteins. **Int Rev Connect Tissue Res**, v. 10, p. 97-209, 1983.

COLOMBO, N. et al. Focal cortical dysplasias: MR imaging, histopathologic, and clinical correlations in surgically treated patients with epilepsy. **AJNR Am J Neuroradiol**, v. 24, n. 4, p. 724-33, Apr 2003.

Consensus guidance for banking and supply of human embryonic stem cell lines for research purposes. **Stem Cell Rev**, v. 5, n. 4, p. 301-14, Dec 2009.

CUESTO, G. et al. Phosphoinositide-3-kinase activation controls synaptogenesis and spinogenesis in hippocampal neurons. **J Neurosci**, v. 31, n. 8, p. 2721-33, Feb 23 2011.

-
- DEVLIN, A. C. et al. Human iPSCC-derived motoneurons harbouring TARDBP or C9ORF72 ALS mutations are dysfunctional despite maintaining viability. **Nat Commun**, v. 6, p. 5999, 2015.
- DJURIC, U. et al. MECP2e1 isoform mutation affects the form and function of neurons derived from Rett syndrome patient iPSC cells. **Neurobiol Dis**, v. 76, p. 37-45, Apr 2015.
- DOERS, M. E. et al. iPSCC-derived forebrain neurons from FXS individuals show defects in initial neurite outgrowth. **Stem Cells Dev**, v. 23, n. 15, p. 1777-87, Aug 1 2014.
- DOLMETSCH, R.; GESCHWIND, D. H. The human brain in a dish: the promise of iPSCC-derived neurons. **Cell**, v. 145, n. 6, p. 831-4, Jun 10 2011.
- DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-7, 2006.
- DRAGUNOW, M. The adult human brain in preclinical drug development. **Nat Rev Drug Discov**, v. 7, n. 8, p. 659-66, Aug 2008.
- DUAN, L. et al. Stem cell derived basal forebrain cholinergic neurons from Alzheimer's disease patients are more susceptible to cell death. **Mol Neurodegener**, v. 9, p. 3, 2014.
- ECKELMAN, B. P.; SALVESEN, G. S.; SCOTT, F. L. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. **EMBO Rep**, v. 7, n. 10, p. 988-94, Oct 2006.
- EIRAKU, M. et al. Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 5, p. 519-32, Nov 6 2008.
- FRIES, K. M. et al. Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 72, n. 3, p. 283-92, Sep 1994.
- FUSAKI, N. et al. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci**, v. 85, n. 8, p. 348-62, 2009.
- GOLDEN, J. A. Cell migration and cerebral cortical development. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 27, n. 1, p. 22-8, Feb 2001.
- GREIG, L. C. et al. Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. **Nat Rev Neurosci**, v. 14, n. 11, p. 755-69, Nov 2013.
- GROSS, C.; BASSELL, G. J. Neuron-specific regulation of class I PI3K catalytic subunits and their dysfunction in brain disorders. **Front Mol Neurosci**, v. 7, p. 12, 2014.
- GUERRINI, R.; DOBYNS, W. B. Malformations of cortical development: clinical features and genetic causes. **Lancet Neurol**, v. 13, n. 7, p. 710-26, Jul 2014.
-

GUO, X. et al. Inhibition of mitochondrial fragmentation diminishes Huntington's disease-associated neurodegeneration. **J Clin Invest**, v. 123, n. 12, p. 5371-88, Dec 2013.

HAEGEL, H. et al. Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. **Development**, v. 121, n. 11, p. 3529-37, Nov 1995.

HANNA, J. et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPSC cells generated from autologous skin. **Science**, v. 318, n. 5858, p. 1920-3, Dec 21 2007.

HANSEN, D. V.; RUBENSTEIN, J. L.; KRIEGSTEIN, A. R. Deriving excitatory neurons of the neocortex from pluripotent stem cells. **Neuron**, v. 70, n. 4, p. 645-60, May 26 2011.

HAY, N.; SONENBERG, N. Upstream and downstream of mTOR. **Genes Dev**, v. 18, n. 16, p. 1926-45, Aug 15 2004.

HEMB, M. et al. Improved outcomes in pediatric epilepsy surgery: the UCLA experience, 1986-2008. **Neurology**, v. 74, n. 22, p. 1768-75, Jun 1 2010.

HEVNER, R. F. Brain overgrowth in disorders of RTK-PI3K-AKT signaling: a mosaic of malformations. **Semin Perinatol**, v. 39, n. 1, p. 36-43, Feb 2015.

HOFSTEEN, P. et al. Quantitative proteomics identify DAB2 as a cardiac developmental regulator that inhibits WNT/beta-catenin signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 113, n. 4, p. 1002-7, Jan 26 2016.

HOSSINI, A. M. et al. Induced pluripotent stem cell-derived neuronal cells from a sporadic Alzheimer's disease donor as a model for investigating AD-associated gene regulatory networks. **BMC Genomics**, v. 16, p. 84, 2015.

HSU, P. P. et al. The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. **Science**, v. 332, n. 6035, p. 1317-22, Jun 10 2011.

HSU, S. Y.; HSUEH, A. J. Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: An ovarian paradigm. **Physiol Rev**, v. 80, n. 2, p. 593-614, Apr 2000.

ICHIDA, J. K.; KISKINIS, E. Probing disorders of the nervous system using reprogramming approaches. **EMBO J**, v. 34, n. 11, p. 1456-77, Jun 3 2015.

ISRAEL, M. A. et al. Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. **Nature**, v. 482, n. 7384, p. 216-20, Feb 9 2012.

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

JACOBSON, M. D.; WEIL, M.; RAFF, M. C. Programmed cell death in animal development. **Cell**, v. 88, n. 3, p. 347-54, Feb 7 1997.

-
- JANSEN, L. A. et al. PI3K/AKT pathway mutations cause a spectrum of brain malformations from megalencephaly to focal cortical dysplasia. **Brain**, v. 138, n. Pt 6, p. 1613-28, Jun 2015.
- JAWORSKI, J. et al. Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. **J Neurosci**, v. 25, n. 49, p. 11300-12, Dec 7 2005.
- JIAO, J. et al. Modeling Dravet syndrome using induced pluripotent stem cells (iPSCs) and directly converted neurons. **Hum Mol Genet**, v. 22, n. 21, p. 4241-52, Nov 1 2013.
- JOHNSON, T. E. *Caenorhabditis elegans* 2007: the premier model for the study of aging. **Exp Gerontol**, v. 43, n. 1, p. 1-4, Jan 2008.
- KABAT, J.; KROL, P. Focal cortical dysplasia - review. **Pol J Radiol**, v. 77, n. 2, p. 35-43, Apr 2012.
- KATSO, R. et al. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 17, p. 615-75, 2001.
- KEITH, C. T.; SCHREIBER, S. L. PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints. **Science**, v. 270, n. 5233, p. 50-1, Oct 6 1995.
- KENYON, C. J. The genetics of ageing. **Nature**, v. 464, n. 7288, p. 504-12, Mar 25 2010.
- KIM, D. S. et al. Optimizing neuronal differentiation from induced pluripotent stem cells to model ASD. **Front Cell Neurosci**, v. 8, p. 109, 2014.
- KISKINIS, E. et al. Pathways disrupted in human ALS motor neurons identified through genetic correction of mutant SOD1. **Cell Stem Cell**, v. 14, n. 6, p. 781-95, Jun 5 2014.
- KOZOPAS, K. M. et al. MCL 1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 8, p. 3516-20, Apr 15 1993.
- KRISTIANSEN, M.; HAM, J. Programmed cell death during neuronal development: the sympathetic neuron model. **Cell Death Differ**, v. 21, n. 7, p. 1025-35, Jul 2014.
- KRSEK, P. et al. Incomplete resection of focal cortical dysplasia is the main predictor of poor postsurgical outcome. **Neurology**, v. 72, n. 3, p. 217-23, Jan 20 2009.
- KRSEK, P. et al. Different presurgical characteristics and seizure outcomes in children with focal cortical dysplasia type I or II. **Epilepsia**, v. 50, n. 1, p. 125-37, Jan 2009.
- KUZNIECKY, R. Epilepsy and malformations of cortical development: new developments. **Curr Opin Neurol**, v. 28, n. 2, p. 151-7, Apr 2015.
- LANCASTER, M. A. et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. **Nature**, v. 501, n. 7467, p. 373-9, Sep 19 2013.
-

- LAWSON, J. A. et al. Distinct clinicopathologic subtypes of cortical dysplasia of Taylor. **Neurology**, v. 64, n. 1, p. 55-61, Jan 11 2005.
- LEE, C. C.; HUANG, C. C.; HSU, K. S. Insulin promotes dendritic spine and synapse formation by the PI3K/Akt/mTOR and Rac1 signaling pathways. **Neuropharmacology**, v. 61, n. 4, p. 867-79, Sep 2011.
- LEE, G. et al. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. **Nature**, v. 461, n. 7262, p. 402-6, Sep 17 2009.
- LEE, P. et al. SMRT compounds abrogate cellular phenotypes of ataxia telangiectasia in neural derivatives of patient-specific hiPSCs. **Nat Commun**, v. 4, p. 1824, 2013.
- LERNER, J. T. et al. Assessment and surgical outcomes for mild type I and severe type II cortical dysplasia: a critical review and the UCLA experience. **Epilepsia**, v. 50, n. 6, p. 1310-35, Jun 2009.
- LI, H. O. et al. A cytoplasmic RNA vector derived from nontransmissible Sendai virus with efficient gene transfer and expression. **J Virol**, v. 74, n. 14, p. 6564-9, Jul 2000.
- LIU, Y. et al. Expression and activity of mTOR and its substrates in different cell cycle phases and in oral squamous cell carcinomas of different malignant grade. **Cell Biochem Funct**, v. 25, n. 1, p. 45-53, Jan-Feb 2007.
- LIVIDE, G. et al. GluD1 is a common altered player in neuronal differentiation from both MECP2-mutated and CDKL5-mutated iPSC cells. **Eur J Hum Genet**, v. 23, n. 2, p. 195-201, Feb 2015.
- LOGAN, C. Y.; NUSSE, R. The Wnt signaling pathway in development and disease. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 20, p. 781-810, 2004.
- LUO, Y. et al. Generation of induced pluripotent stem cells from skin fibroblasts of a patient with olivopontocerebellar atrophy. **Tohoku J Exp Med**, v. 226, n. 2, p. 151-9, 2012.
- MARCHETTO, M. C. et al. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. **Cell**, v. 143, n. 4, p. 527-39, Nov 12 2010.
- MATSUDA, Y. et al. In vivo assessment of the impact of efflux transporter on oral drug absorption using portal vein-cannulated rats. **Drug Metab Dispos**, v. 41, n. 8, p. 1514-21, Aug 2013.
- MEKHOUBAD, S. et al. Erosion of dosage compensation impacts human iPSC disease modeling. **Cell Stem Cell**, v. 10, n. 5, p. 595-609, May 4 2012.
- MORI, M. et al. Expression of apoptosis inhibitor protein MCL 1 linked to neuroprotection in CNS neurons. **Cell Death Differ**, v. 11, n. 11, p. 1223-33, Nov 2004.
- MULLER, F. J. et al. A call to standardize teratoma assays used to define human pluripotent cell lines. **Cell Stem Cell**, v. 6, n. 5, p. 412-4, May 7 2010.
-

NITYANANDAM, A.; BALDWIN, K. K. Advances in reprogramming-based study of neurologic disorders. **Stem Cells Dev**, v. 24, n. 11, p. 1265-83, Jun 1 2015.

NORDBORG, C. et al. Microdysgenesis in surgical specimens from patients with epilepsy: occurrence and clinical correlations. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 67, n. 4, p. 521-4, Oct 1999.

OLNEY, A. H. Macrocephaly syndromes. **Semin Pediatr Neurol**, v. 14, n. 3, p. 128-35, Sep 2007.

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

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

PARENT, J. M.; ANDERSON, S. A. Reprogramming patient-derived cells to study the epilepsies. **Nat Neurosci**, v. 18, n. 3, p. 360-6, Mar 2015.

PARNAVELAS, J. G. The origin and migration of cortical neurones: new vistas. **Trends Neurosci**, v. 23, n. 3, p. 126-31, Mar 2000.

PASCUAL-CASTROVIEJO, I. et al. Focal cortical dysplasia. Clinical-radiological-pathological associations. **Neurologia**, v. 27, n. 8, p. 472-80, Oct 2012.

PAULSEN BDA, S. et al. Altered oxygen metabolism associated to neurogenesis of induced pluripotent stem cells derived from a schizophrenic patient. **Cell Transplant**, v. 21, n. 7, p. 1547-59, 2012.

PRAYSON, R. A.; SPREAFICO, R.; VINTERS, H. V. Pathologic characteristics of the cortical dysplasias. **Neurosurg Clin N Am**, v. 13, n. 1, p. 17-25, vii, Jan 2002.

RAKIC, P. Neuronal migration and contact guidance in the primate telencephalon. **Postgrad Med J**, v. 54 Suppl 1, p. 25-40, 1978.

REINHARDT, P. et al. Genetic correction of a LRRK2 mutation in human iPSCs links parkinsonian neurodegeneration to ERK-dependent changes in gene expression. **Cell Stem Cell**, v. 12, n. 3, p. 354-67, Mar 7 2013.

ROBICSEK, O. et al. Abnormal neuronal differentiation and mitochondrial dysfunction in hair follicle-derived induced pluripotent stem cells of schizophrenia patients. **Mol Psychiatry**, v. 18, n. 10, p. 1067-76, Oct 2013.

RONG, R. et al. PI3 kinase enhancer-Homer complex couples mGluRI to PI3 kinase, preventing neuronal apoptosis. **Nat Neurosci**, v. 6, n. 11, p. 1153-61, Nov 2003.

RORKE, L. B. A perspective: the role of disordered genetic control of neurogenesis in the pathogenesis of migration disorders. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 53, n. 2, p. 105-17, Mar 1994.

SAMUEL, T. et al. Distinct BIR domains of CIAP1 mediate binding to and ubiquitination of tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 and second mitochondrial activator of caspases. **J Biol Chem**, v. 281, n. 2, p. 1080-90, Jan 13 2006.

SANDERS, L. H. et al. LRRK2 mutations cause mitochondrial DNA damage in iPSC-derived neural cells from Parkinson's disease patients: reversal by gene correction. **Neurobiol Dis**, v. 62, p. 381-6, Feb 2014.

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

SAREEN, D. et al. Targeting RNA foci in iPSC-derived motor neurons from ALS patients with a C9ORF72 repeat expansion. **Sci Transl Med**, v. 5, n. 208, p. 208ra149, Oct 23 2013.

SERHAN, C. N. et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. **FASEB J**, v. 21, n. 2, p. 325-32, Feb 2007.

SHIBA, Y. et al. AGAP2 regulates retrograde transport between early endosomes and the TGN. **J Cell Sci**, v. 123, n. Pt 14, p. 2381-90, Jul 15 2010.

SONG, B. et al. Neural differentiation of patient specific iPSC cells as a novel approach to study the pathophysiology of multiple sclerosis. **Stem Cell Res**, v. 8, n. 2, p. 259-73, Mar 2012.

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

TACHIBANA, M. et al. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. **Cell**, v. 153, n. 6, p. 1228-38, Jun 6 2013.

TAKAHASHI, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861-72, Nov 30 2007.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663-76, Aug 25 2006.

TANG, X. et al. Netrin-1 mediates neuronal survival through PIKE-L interaction with the dependence receptor UNC5B. **Nat Cell Biol**, v. 10, n. 6, p. 698-706, Jun 2008.

TASSI, L. et al. Cortical dysplasia: electroclinical, imaging, and neuropathologic study of 13 patients. **Epilepsia**, v. 42, n. 9, p. 1112-23, Sep 2001.

TAYLOR, D. C. et al. Focal dysplasia of the cerebral cortex in epilepsy. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 34, n. 4, p. 369-87, Aug 1971.

TELEMAN, A. A.; CHEN, Y. W.; COHEN, S. M. 4E-BP functions as a metabolic brake used under stress conditions but not during normal growth. **Genes Dev**, v. 19, n. 16, p. 1844-8, Aug 15 2005.

THOM, M. et al. Cortical neuronal densities and lamination in focal cortical dysplasia. **Acta Neuropathol**, v. 110, n. 4, p. 383-92, Oct 2005.

TISCORNIA, G. et al. Neuronopathic Gaucher's disease: induced pluripotent stem cells for disease modelling and testing chaperone activity of small compounds. **Hum Mol Genet**, v. 22, n. 4, p. 633-45, Feb 15 2013.

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

WAGNER, J. et al. Focal cortical dysplasia type IIb: completeness of cortical, not subcortical, resection is necessary for seizure freedom. **Epilepsia**, v. 52, n. 8, p. 1418-24, Aug 2011.

WAINGER, B. J. et al. Intrinsic membrane hyperexcitability of amyotrophic lateral sclerosis patient-derived motor neurons. **Cell Rep**, v. 7, n. 1, p. 1-11, Apr 10 2014.

WAITE, K.; EICKHOLT, B. J. The neurodevelopmental implications of PI3K signaling. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 346, p. 245-65, 2010.

WANG, C. Y. et al. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. **Science**, v. 281, n. 5383, p. 1680-3, Sep 11 1998.

WANG, L. et al. Dioscin enhances methotrexate absorption by down-regulating MDR1 in vitro and in vivo. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 277, n. 2, p. 146-54, Jun 1 2014.

WERNIG, M. et al. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 15, p. 5856-61, Apr 15 2008.

WICHTERLE, H. et al. In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. **Development**, v. 128, n. 19, p. 3759-71, Oct 2001.

WILLERT, K.; NUSSE, R. Wnt proteins. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 4, n. 9, p. a007864, Sep 2012.

WILLIAMS, E. C. et al. Mutant astrocytes differentiated from Rett syndrome patients-specific iPSCs have adverse effects on wild-type neurons. **Hum Mol Genet**, v. 23, n. 11, p. 2968-80, Jun 1 2014.

WOOSLEY, R. L.; COSSMAN, J. Drug development and the FDA's Critical Path Initiative. **Clin Pharmacol Ther**, v. 81, n. 1, p. 129-33, Jan 2007.

YAGI, T. et al. Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. **Hum Mol Genet**, v. 20, n. 23, p. 4530-9, Dec 1 2011.

YAMAZAKI, H.; ZAWALICH, K. C.; ZAWALICH, W. S. Physiologic implications of phosphoinositides and phospholipase C in the regulation of insulin secretion. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**, v. 56, n. 1, p. 1-8, 2010.

YAO, Y. et al. A striatal-enriched intronic GPCR modulates huntingtin levels and toxicity. **Elife**, v. 4, 2015.

YOON, K. J. et al. Modeling a genetic risk for schizophrenia in iPSCs and mice reveals neural stem cell deficits associated with adherens junctions and polarity. **Cell Stem Cell**, v. 15, n. 1, p. 79-91, Jul 3 2014.

ZHANG, R.; ZHANG, L. H.; XIE, X. iPSCs and small molecules: a reciprocal effort towards better approaches for drug discovery. **Acta Pharmacol Sin**, v. 34, n. 6, p. 765-76, Jun 2013.

ZHAO, T. T. et al. hnRNP A1 regulates UV-induced NF-kappaB signalling through destabilization of CIAP1 mRNA. **Cell Death Differ**, v. 16, n. 2, p. 244-52, Feb 2009.

ZHOU, J. et al. Pharmacological inhibition of mTORC1 suppresses anatomical, cellular, and behavioral abnormalities in neural-specific Pten knock-out mice. **J Neurosci**, v. 29, n. 6, p. 1773-83, Feb 11 2009.

ANEXOS

ANEXO 1 - ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO EM REVISTA INDEXADA

The expression of pluripotency genes and neuronal markers after neurodifferentiation in fibroblasts co-cultured with human umbilical cord blood mononuclear cells

D. R. Marinowic · M. F. Domingues · D. C. Machado · J. C. DaCosta

Received: 30 April 2014 / Accepted: 23 July 2014 / Editor: T. Okamoto
© The Society for In Vitro Biology 2014

Abstract Human umbilical cord blood is an attractive source of stem cells; however, it has a heterogeneous cell population with few mesenchymal stem cells. Cell reprogramming induced by different methodologies can confer pluripotency to differentiated adult cells. The objective of this study was to evaluate the reprogramming of fibroblasts and their subsequent neural differentiation after co-culture with umbilical cord blood mononuclear cells. Cells were obtained from four human umbilical cords. The mononuclear cells were cultured for 7 d and subsequently co-cultured with mouse fibroblast NIH-3T3 cells for 6 d. The pluripotency of the cells was evaluated by RT-PCR using primers specific for pluripotency marker genes. The pluripotency was also confirmed by adipogenic and osteogenic differentiation. Neural differentiation of the reprogrammed cells was evaluated by immunofluorescence. All co-cultured cells showed adipogenic and osteogenic differentiation capacity. After co-cultivation, cells expressed the pluripotency gene *KLF4*. Statistically significant differences in cell area, diameter, optical density, and fractal dimension were observed by confocal microscopy in the neurally differentiated cells. Contact in the form of co-

cultivation of fibroblasts with umbilical cord blood mononuclear fraction for 6 d promoted the reprogramming of these cells, allowing the later induction of neural differentiation.

Keywords Umbilical cord blood · Fibroblast · Co-cultivation · Neurodifferentiation · Redifferentiation

Introduction

Cellular therapies represent a new frontier for the treatment of various diseases, including diseases related to the central nervous system. Human mesenchymal stem cells (hMSCs) can be isolated from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord, muscle, skin, and other tissues, and they possess various properties that make them suitable for the treatment of these diseases (Momin *et al.* 2010; Al-Nbaheen *et al.* 2012). Human umbilical cord blood is an attractive source of stem cells for transplantation; these cells are easy to collect and can be cryopreserved for many years. However, umbilical cord blood contains a heterogeneous population of stem cells, progenitor cells, and mature blood cell populations in the process of maturation, which, when cultured, produces a multicellular population (Kobylka *et al.* 1998; Mareschi *et al.* 2001). Mesenchymal stem cells have generated high expectations for their utility in therapeutic strategies because of their capacity for self-renewal and differentiation into various functional tissues. These cells have a demonstrated efficacy in treating diseases such as osteogenesis imperfecta, hematopoietic recovery, and the regeneration of bone tissue (Wagner *et al.* 2009). Although MSCs have been studied extensively, their therapeutic use, mechanisms of self-renewal, differentiation, and paracrine effects are not well understood and are the subjects of active investigation (Baksh *et al.* 2004). Embryonic stem cells (ESCs) are derived from the inner cell mass of mammalian blastocysts. These cells can grow indefinitely

D. R. Marinowic · M. F. Domingues · D. C. Machado
Biomedical Research Institute, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brazil, Porto Alegre 90610-000, Brazil

D. R. Marinowic
e-mail: dmarinowic@gmail.com

M. F. Domingues
e-mail: michidomingues@hotmail.com

D. C. Machado
e-mail: dcm@puers.br

D. R. Marinowic · M. F. Domingues · J. C. DaCosta (✉)
Brain Institute and Cellular Therapy Center, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brazil, Porto Alegre 90610-000, Brazil
e-mail: jcc@puers.br

while maintaining their pluripotency, and they can differentiate into tissues from all three germ layers. ESCs are currently used in the treatment of various diseases such as Parkinson's disease, spinal cord injury, and diabetes (Evans and Kaufman 1981; Martin 1981; Thomson *et al.* 1998; Takahashi and Yamanaka 2006). However, the ethics of the use of human ESCs remains controversial, and the generation of pluripotent cells from autologous somatic cells has been proposed as one solution to this problem. Somatic cells can be reprogrammed by nuclear transfer into enucleated oocytes or by cell fusion between somatic cells and embryonic cells, indicating that enucleated oocytes and embryonic cells can confer totipotency or pluripotency in somatic cells (Takahashi and Yamanaka 2006).

Materials and Methods

Ethical issues. This study was approved by the Scientific and Ethical Committee of Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CEP-PUCRS 11/05504). The human umbilical cord blood mononuclear cells were obtained from four parturients that gave birth at the obstetric center of Hospital São Lucas da PUCRS after the patients signed an informed consent form.

Separation of mononuclear cells. The umbilical cord blood was collected by arterial and venous puncture of the umbilical cord and placenta using a 20-mL syringe containing heparin (5.000 IU). The blood was diluted (1:1) in RPMI 1640 medium (Gibco, Grand Island, NY). The suspensions were fractionated over a Histopaque 1.077 g/mL (sigma-aldrich, Saint Louis, MO) density gradient by centrifugation at 400×g for 30 min. The mononuclear fraction, located at the interface with the Histopaque, was collected and washed twice with sterile saline solution at 0.9% (baxter, São Paulo, Brazil) by centrifugation (harrier 16/80-MSE, London, UK) at 400×g for 5 min. Cell viability was evaluated using the trypan blue (Gibco) exclusion method. The mononuclear fraction was cultured with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco), 10% fetal bovine serum (Gibco), 100 IU/mL penicillin (Gibco), 100 IU/mL of streptomycin (Gibco), and 100 mg/mL of gentamicin (Gibco) at a density of 10⁷ cells per 75-cm² flask. All cultures were maintained in incubators (sanyo, San Diego, CA) at 37°C with 5% CO₂ for 6 d.

Co-cultivation. After 6 d in culture, the umbilical cord blood mononuclear cells were combined with 10⁵ mouse fibroblasts NIH-3T3 cell line (ATCC, Manassas, VA) per 75-cm² flask. After 6 d of culture, cells reached more than 80% confluence and were removed by trypsinization (Gibco). This stage was referred to as phase I.

Mesodermal differentiation. DMEM (Gibco) containing 10⁻⁸ mol/L dexamethasone and 5 mg/mL insulin (sigma-aldrich) was used for adipogenic differentiation, and DMEM supplemented with 10⁻⁸ mol/L dexamethasone (sigma-aldrich), 5 mg/mL ascorbic acid 2-phosphate (sigma-aldrich), and 10 mmol/L of β-glycerophosphate (sigma-aldrich) was used for osteogenic differentiation. Cells were cultivated for 4 wk.

Neurodifferentiation. Neurodifferentiation was induced as described by Song *et al.* (2008) (Song and Sanchez-Ramos 2008), with some modifications. Cells were cultivated in DMEM (sigma-aldrich) supplemented with 0.001% β-mercaptoethanol (Gibco), 10% fetal bovine serum, (Gibco) 100 IU/mL penicillin (Gibco), 100 IU/mL streptomycin (Gibco) and 100 mg/mL gentamicin (Gibco). After 3 d, cells were considered to be in phase II. The culture medium was replaced with DMEM/F12 (Gibco) containing fetal bovine serum, penicillin, streptomycin, and gentamycin for a further 3 d, after which the cells were considered to be in phase III. The cells were then transferred to six-well plates and cultivated with Neurobasal Medium N5 (Gibco) supplemented with 20 ng/mL brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (sigma-aldrich), 20 ng/mL granulocyte colony-stimulating factor (GCSF) (BERGAMO, São Paulo, Brazil), fetal bovine serum (Gibco), penicillin, streptomycin, and gentamicin. The cells were cultured for a period of 7 d, establishing phase IV.

Histological staining for mesodermal differentiation. To confirm the cell differentiation, cells were washed with Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) and fixed with 4% paraformaldehyde at room temperature, followed by Oil Red O staining (sigma-aldrich) to label adipocytes and Alizarin Red S (merck, Darmstadt, Germany) staining to detect calcium deposits characteristic of the osteogenic lineage. Staining was performed in 3T3 fibroblasts co-cultured with cord blood without being differentiated.

Evaluation of cell type abundance after co-cultivation. The relative abundance of each cell type (fibroblasts and/or the umbilical cord blood mononuclear cells) was evaluated using PCR with primers for mouse IL-2 (forward 5'-CTAGGCCA CAGAATTGAAAGATCT-3'/reverse 5'-GTAGGTGGAAAT TCTAGCATCATC-3') and human β-actin (forward 5'-TCCC TGACGCCTCTGGXCATA-3'/reverse 5'-CCTTCTGCAT CCTGTTGGTGATGCTA-3') genes.

RNA extraction and RT-PCR. RNA extraction was performed using the SV-Total RNA kit (promega, San Luis Obispo, CA) as directed by the manufacturer. The complementary DNA (cDNA) synthesis was performed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription (applied biosystems, Foster

PLURIPOTENCY GENES AND NEURONAL MARKERS IN FIBROBLASTS

City, CA) kit as directed by the manufacturer. To evaluate the pluripotency of the cells, reverse transcriptase (RT)-PCR was performed using primers for the mouse KFL4 (forward 5'-CCGTTGGCGTGAGGAACTCT-3'/reverse: 5'-ATACTGGTCCAACCTCCGGC-3'), SOX2 (forward 5'-AGACCGAGAAGCGGCCGTTCA-3'/reverse 5'-ATGCGCTGGTTCACGCCGC-3'), and OCT3/4 (forward 5'-TACGAGTTCTGCGGAGGGAT-3'/reverse 5'-TCATTGTTGTCGGCTTCC TC-3') genes.

Immunocytochemistry for neural markers. When cells reached phase IV, the culture medium was discarded, and the cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min. After a wash with DPBS (Gibco), 1 mL per well of blocking solution (fetal bovine serum and bovine serum albumin) was added, and the cells were incubated for 1 h at room temperature. The cells were incubated at room temperature for 2 h with the FluoroPan Neuronal Marker (chemicon, Temecula, CA), which contains FITC-conjugated anti-neuronal nuclei (NeuN), anti-neuronal cytoskeleton (NFL), anti-neuronal microtubule (MAP2), and anti-neuronal microtubule (β -tubulin III) antibodies, diluted (1:100) in blocking solution to characterize the cytoarchitecture and neuronal polarization of the cells. Then, 0.01% 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (sigma-aldrich) was added for nuclear staining. The cultures were washed twice with DPBS buffer and analyzed using a LSM-5 Exciter confocal microscope (carl zeiss, Oberkochen, Germany). For quantitative analysis, ten visual fields were randomly selected under a $\times 20$ objective lens, each containing at least 20 cells marked with DAPI (sigma-aldrich).

Cell proliferation assay. To evaluate cell proliferation during all phases of neurodifferentiation, 2×10^4 cells per well were cultivated, and at the end of each phase of neurodifferentiation (phase I to IV), cells were removed and the density was

estimated using the trypan blue exclusion method in a Neubauer chamber.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA (prism software, inc., Irvine, CA) for the Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparison post-test. The results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Results

The results of the co-cultivation of mouse fibroblasts with mononuclear cells derived from umbilical cord blood were evaluated by comparing several cell populations: mouse fibroblasts NIH-3T3 (ATCC) alone (3T3), NIH-3T3 cells that were co-cultured with mononuclear cells from umbilical cord blood but not submitted to neurodifferentiation (CC-ND), NIH-3T3 cells subjected to neurodifferentiation but not co-culture (3T3D), and NIH-3T3 cells that were co-cultured with mononuclear cells from umbilical cord blood (one culture for each patient, 1 to 4) and submitted to neurodifferentiation (PCT1, 2, 3, and 4 F4).

Cell type domain on co-cultures. Co-cultures of fibroblasts with mononuclear cells purified from umbilical cord blood reached more than 80% confluence after 6 d, and fibroblast cells were much more abundant than mononuclear cells in these co-cultures, as confirmed by the presence of the mouse IL-2 gene and the absence of human β -actin gene, as shown in Fig. 1.

Mesodermal differentiation. Adipogenic and osteogenic differentiation was induced as described by Phinney *et al.* (1999) to confirm the differentiation of the mesodermal cell lineage by Oil Red O (Gibco) and Alizarin Red (Gibco) staining (Fig. 2). All cells cultured with adipogenic media exhibited characteristic

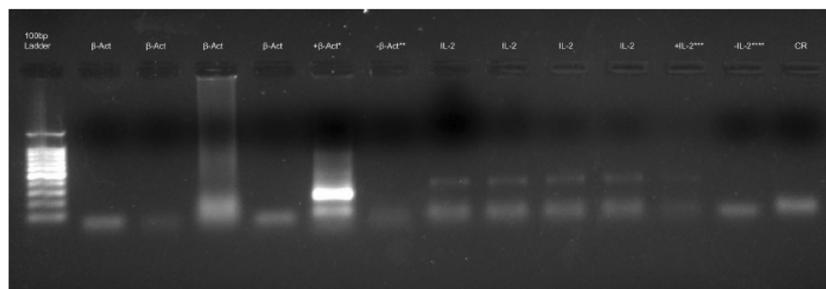


Figure 1. Mouse IL-2 and human β -actin PCR products after electrophoresis on a 2% agarose gel. Molecular weight marker 100 bp (100bp ladder); human β -actin gene (β -act); positive control for human β -actin gene (*); negative control for human β -actin gene using mouse tissue (**);

mouse IL-2 gene (IL-2); positive control for mouse IL-2 gene (***); negative control for mouse IL-2 using human tissue (****). CR control reaction without DNA.

MARINOWIC ET AL.

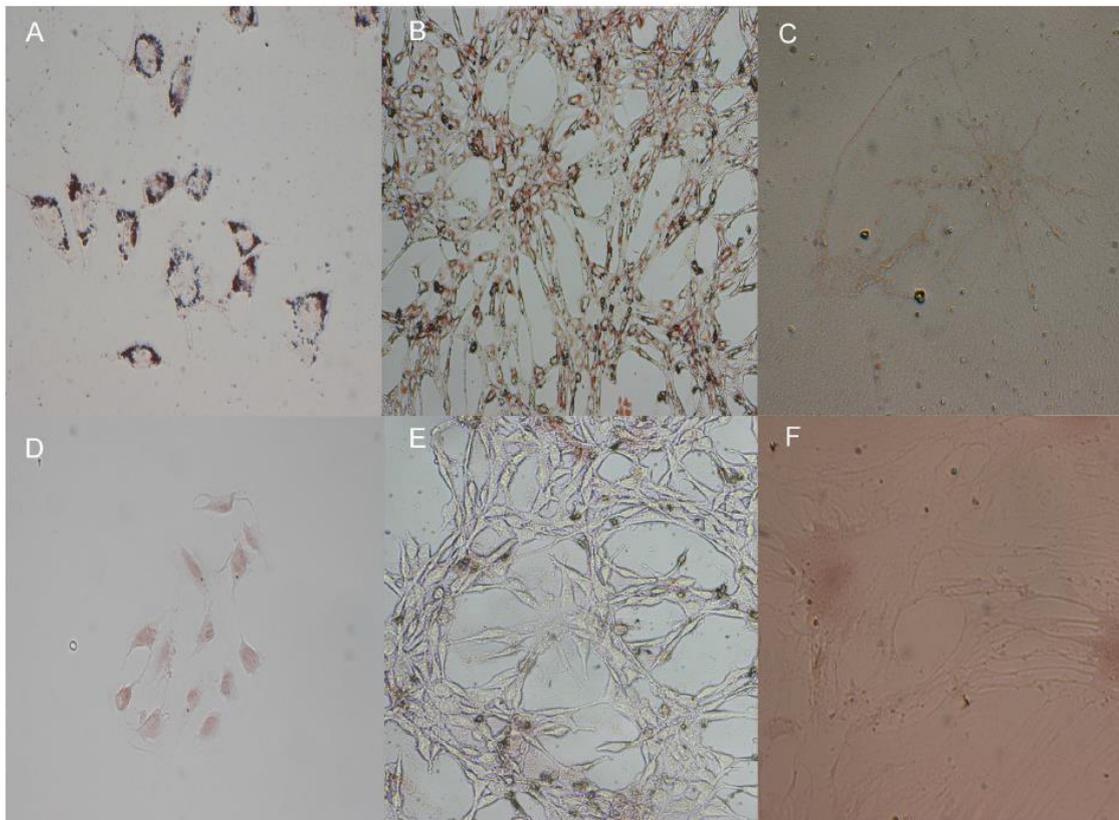


Figure 2. Image capture of mesodermal differentiation. **A** Adipogenic differentiation characterized by Oil Red O staining after induction. **B** Oil Red O staining in 3T3 co-cultured with mononuclear fractions of umbilical cord blood without adipogenic induction. **C** Negative staining by Oil

Red O in 3T3 cells. **D** Osteogenic differentiation characterized by Alizarin Red staining after induction. **E** Alizarin Red staining in 3T3 co-cultured with mononuclear fractions of umbilical cord blood without osteogenic induction. **F** Negative staining by Alizarin Red in 3T3 cells.

cytoplasmic Oil Red O positive staining, indicating successful adipogenic differentiation. Additionally, cells cultivated with osteogenic differentiation media stained with Alizarin Red, indicating the presence of calcium deposits. The 3T3 cells co-cultured and non-differentiated exhibited characteristic cytoplasmic Oil Red O positive staining and not stained with Alizarin Red.

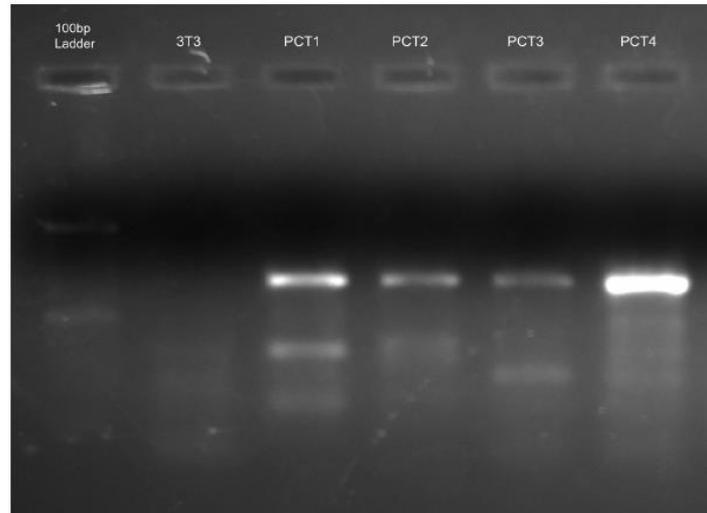
Pluripotency of co-cultured cells. The expression of the KLF4 gene was detected after NIH-3T3 mouse fibroblasts were co-cultured with umbilical cord blood mononuclear cells (Fig. 3) from all four patients (PCT1, 2, 3, and 4) for 7 d before co-culture. However, Oct3/4 and Sox2 gene transcripts were not detected by RT-PCR. When NIH-3T3 cells were in cultured alone, only the expression of the endogenous IL-2 gene was detected.

Fluorescence immunocytochemistry. Very little antibody labeling with Fluoropan Neuronal Marquer (chemicon) was observed in the fibroblast cells that were not subjected to co-culture (3T3), cells that were subjected to co-culture but not the neurodifferentiation protocol (CC-ND), or cells that were subjected to the neurodifferentiation protocol but were not co-cultured (3T3D) (Fig. 4). The staining in the co-cultured and neurodifferentiated group (PCT1, 2, 3, and 4 F4) was distributed throughout the cells, indicating that the different antibodies used in the study label the same cell type(s) (Fig. 5). Nuclear staining and staining along the cellular extensions were observed, indicating that the fibroblasts began to express markers of differentiated neural structures when co-cultured with umbilical cord blood mononuclear cells and subjected to the neurodifferentiation protocol.

For quantitative evaluation, we measured the cell area, diameter, fractal dimension, and optical density (Fig. 6).

PLURIPOTENCY GENES AND NEURONAL MARKERS IN FIBROBLASTS

Figure 3. *KLF4* PCR products after electrophoresis on 2% agarose gel. *Marc* molecular weight marker, 100 bp; *KLF4* amplicon in non-co-cultured fibroblasts (3T3); *KLF4* amplicon in fibroblasts co-cultured with the mononuclear fractions of umbilical cord blood from each of four patients (*PCT1*, *PCT2*, *PCT3*, and *PCT4*).



When analyzing the cell area, which represents the spatial and two-dimensional surface of the cultures, the 3T3, CC-ND, and

3T3D groups were statistically different from the groups of cells that were co-cultured and subjected to the

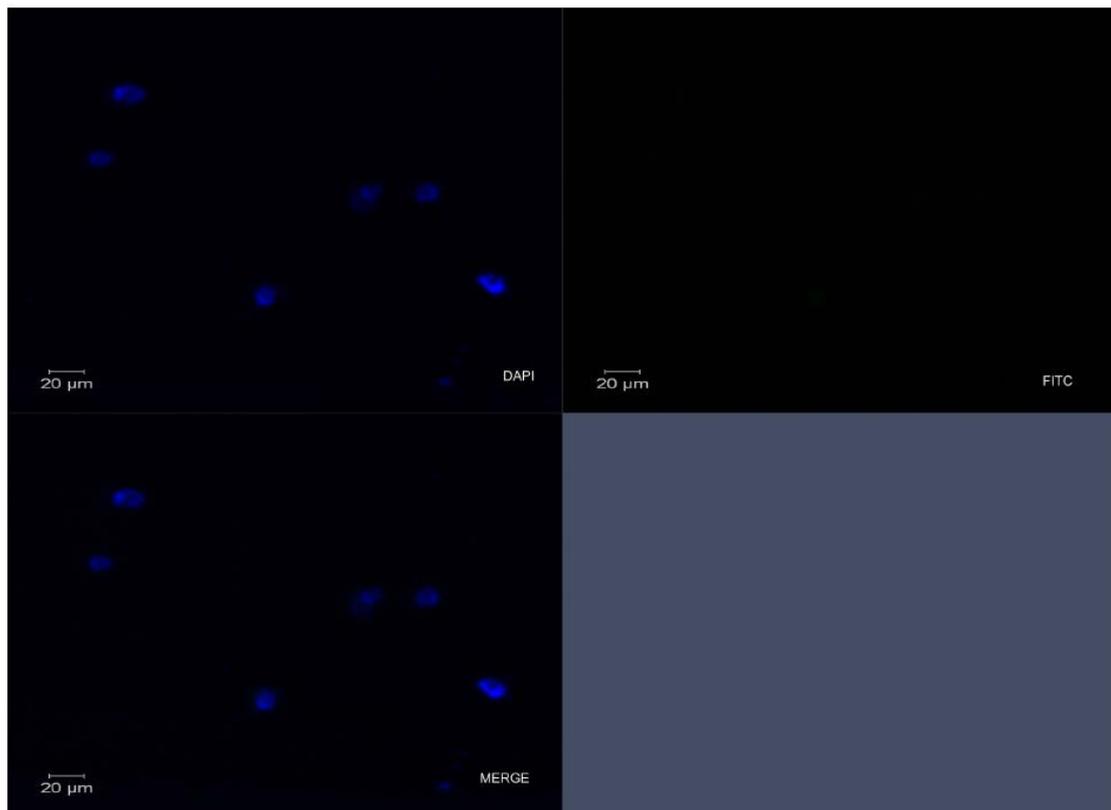


Figure 4. Image capture of 3T3D group by confocal microscopy. Nuclear staining (*DAPI*); FluoroPan Neuronal (*FITC*); *DAPI/FITC* (*MERGE*).

MARINOWIC ET AL.

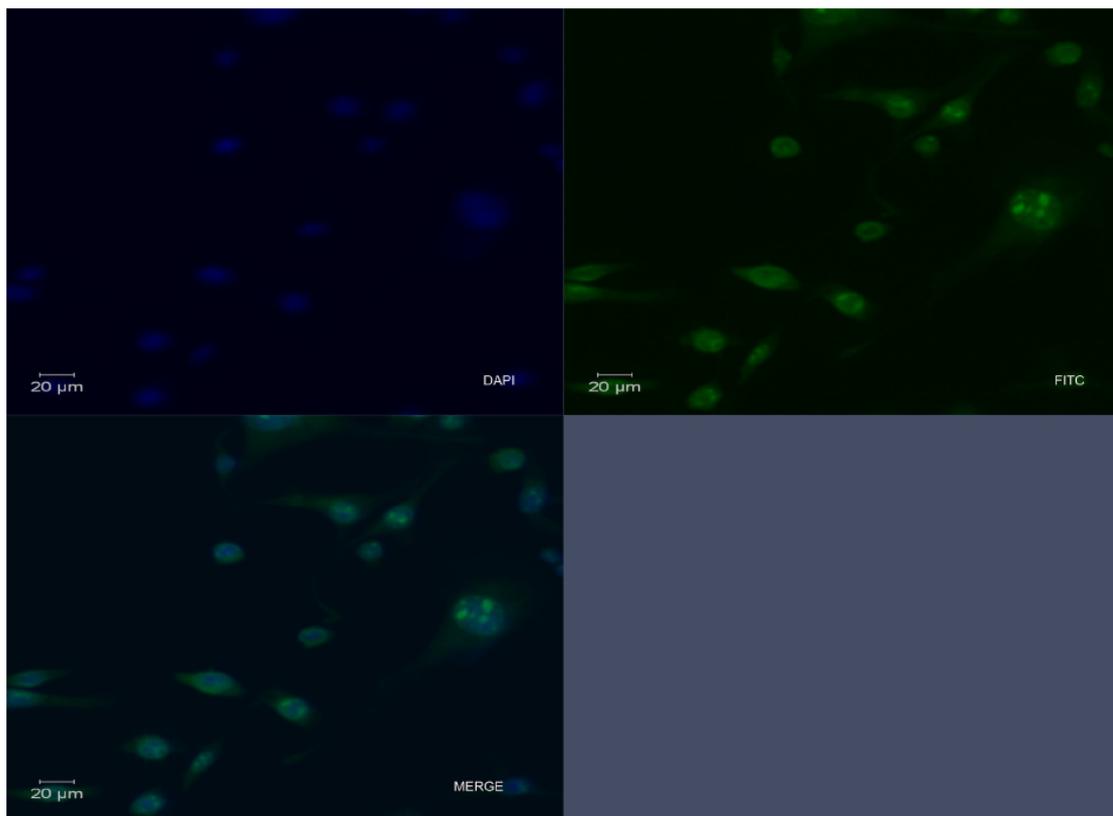


Figure 5. Image capture of PCT3F4 group by confocal microscopy. Nuclear staining (*DAPI*); FluoroPan Neuronal (*FITC*); *DAPI/FITC* (*MERGE*).

neurodifferentiation protocol (PCT1, 2, 3, and 4 F4) ($p < 0.05$). Similar results were observed for the cell diameter measurement ($p < 0.05$). There was no statistically significant difference between the CC-ND and PCT1F4 groups because there was an increase in the diameter of the CC-ND group. The fractal dimension parameter which reflects the level of irregularity in the cell shape, was significantly different in three of the co-cultured and neurodifferentiated groups relative to the three controls ($p < 0.05$); the PCT1F4 group was the only group that was not significantly different than the control.

In assessing the optical density which indicates the degree of marker intensity, the 3T3D group was significantly different ($p < 0.05$) than the four PCT1, 2, 3, and 4 F4 groups, the CC group and 3T3-DL only did not show statistically significant results when compared to group PCT1F4.

Cell proliferation assay. Fibroblasts that were initially co-cultured for 7 d with the cord blood mononuclear cells were subsequently cultured in DMEM (Gibco) for 3 d (3T3) and exhibited population growth from 2×10^4 to 5.8×10^4 . In the

neurodifferentiation protocol used, cells cultured for 3 d in medium supplemented with β -mercaptoethanol (merck) (FII) grew from 2×10^4 to 7.4×10^4 . These cells were re-cultivated for 3 d in DMEM/F12 medium (Gibco) (FIII) and grew from 2×10^4 to 7.3×10^4 , and when grown for 7 d in N5 medium (Gibco) supplemented with growth factors and neurotrophins (FIV), the cell number decreased from 2×10^4 to 1.8×10^4 (Fig. 7).

Discussion

Cell reprogramming can be achieved using several methods, including nuclear transfer, cell fusion between embryonic and somatic cells and reprogramming by gene transfection (Wilmut *et al.* 1997; Tada *et al.* 2001; Cowan *et al.* 2005; Takahashi and Yamanaka 2006). The co-culture of fibroblasts with umbilical cord blood mononuclear cells for 7 d can modulate fibroblast plasticity. This culture period was sufficient for the fibroblasts to dominate the culture. The relative prevalence of fibroblasts compared to umbilical cord blood

PLURIPOTENCY GENES AND NEURONAL MARKERS IN FIBROBLASTS

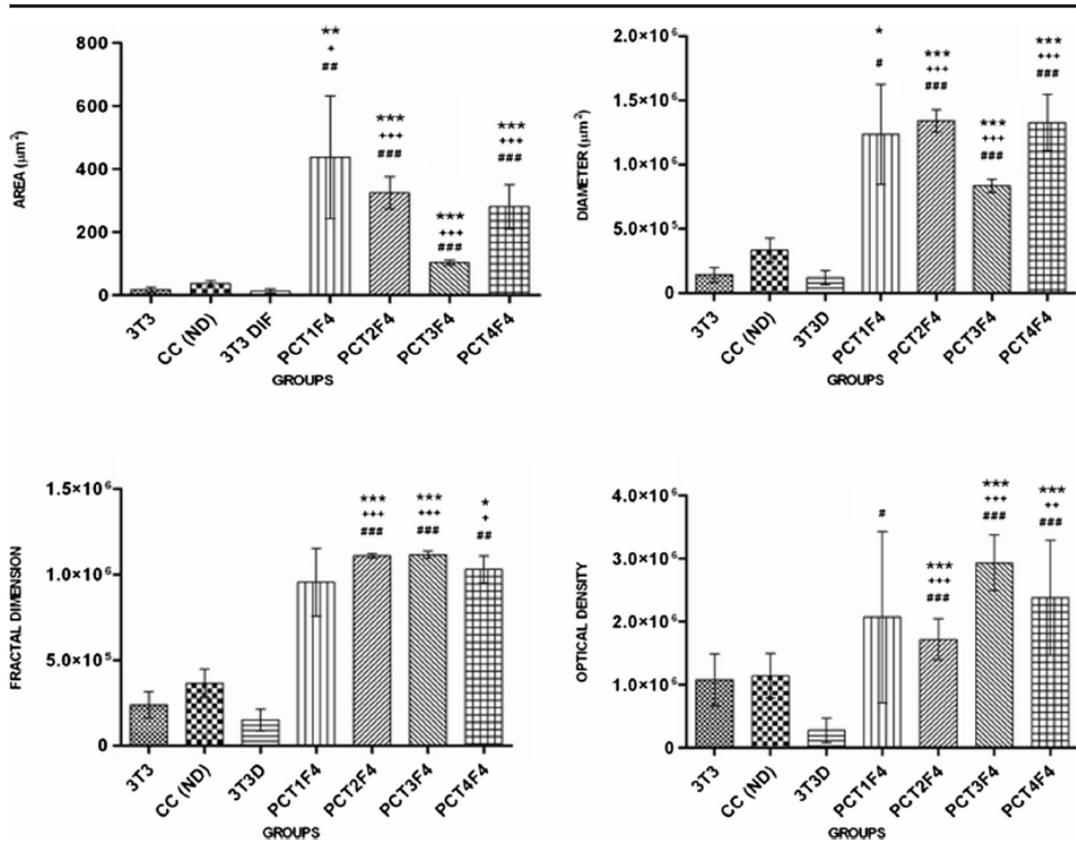
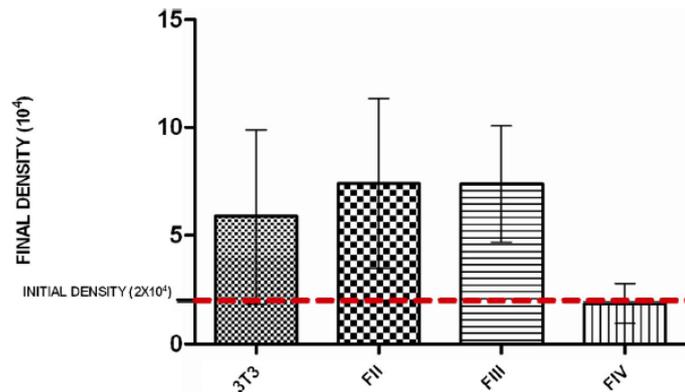


Figure 6. Histogram representing the area, diameter, fractal dimension, and optical density values. *3T3 vs. PCT1, 2, 3, and 4 F4; #CC-ND vs. PCT1, 2, 3, and 4 F4; #3T3D vs. PCT1, 2, 3, and 4 F4.

mononuclear cells observed in this study may be associated with the poor adherence and small number of mesenchymal cells in umbilical cord blood; these cells are extremely rare, representing only one every 10⁸ mononuclear cells in the

umbilical cord blood (Bieback and Brinkmann 2010). Moreover, the population of mouse NIH-3T3 fibroblasts doubles roughly once every 22.5±2.5 h (Carrino and Gershman 1977). Therefore, co-culture to reprogram fibroblasts is a highly

Figure 7. Histogram of cell growth during neurodifferentiation. Fibroblasts cultured for 3 d in DMEM (3T3); previously co-cultured fibroblasts in the different phases of neurodifferentiation (FII, FIII, and FIV).



promising strategy. The cell reprogramming and neurodifferentiation observed in this investigation were most likely due to direct effects on the fibroblasts and not a consequence of cell fusion or the mesenchymal cells present in the umbilical cord blood. Considering that PCR is a highly sensitive technique and can detect as little as 1% contamination in co-cultivated cells, the data obtained are very reliable (Eldering *et al.* 2004; Wang *et al.* 2004; Steinberg *et al.* 2005; Volokhov *et al.* 2008).

The presence of *KLF4* gene transcripts suggests that the co-culture promotes a cell reprogramming, although *Sox2* and *Oct3/4* gene transcripts were not detected. Indeed, *KLF4* and several other genes (*KLF2*, *KLF5*, *Oct4*, *Sox2*, and *Nanog*) belong to the molecular circuit that is essential to pluripotent cell self-renewal. The data in the literature have shown that different members of the *KLF* gene family may play different roles in maintaining the pluripotency of mice embryonic cells (Bourillot and Savatier 2010). The *KLF* gene family has received a great deal attention since it was demonstrated that somatic cells can be reprogrammed into induced pluripotent cells, called iPS, through the transfection of a cocktail of pluripotency genes, including *KLF4*. Takahashi and Yamanaka (2006) showed that a subset of 24 candidate genes promote pluripotency due to their important roles in the maintenance and identity of embryonic stem cells. The *Oct3/4*, *Sox2*, *cMyc*, and *KLF4* genes are essential and sufficient to promote pluripotency in adult fibroblasts. The *KLFs* and the *Oct4*, *Sox2*, and *Nanog* genes are strongly interconnected. *KLF2*, *KLF4*, and *KLF5* promote *Nanog* expression, and *Oct4* and *Sox2* activate *KLF2*, *KLF4*, and *KLF5*, closing the transcriptional network. Moreover, *Oct4*, *Nanog*, and *Sox3* are regulated by the same transcription factor (Jiang *et al.* 2008; Bourillot *et al.* 2009; Bourillot and Savatier 2010). The presence of *KLF4* transcripts after 6 d of co-culture could indicate that fibroblasts were undergoing pluripotent transformation.

Mesodermal differentiation is defined by the three minimum criteria established by International Society for Cellular Therapy (ISCT) to characterize mesenchymal lineages derived from any tissue (Dominici *et al.* 2006). The mesodermal character of mesenchymal stem cells, along with their specific immunophenotype and adherence to plastic, allows these cells to be distinguished from other cell types. This characterization has been supported by the large body of research involving mesenchymal stem cells in the last two decades and the great clinical interest in using these cells to establish a standard description for mesenchymal lineage cells (Dominici *et al.* 2006). Mesodermal differentiation can be considered to be an indication of pluripotency; the cells obtained in the present study meet this criterion. Moreover, the levels of plasticity of the cells in our cultures were reflected by their capacity for both adipogenic and osteogenic differentiation after co-cultivation, indicating that the fibroblasts acquired mesenchymal stem cell characteristics. Even without inducing

differentiation after co-culture with cord blood cells were positive for 3T3 adipocyte marker, which may be associated with a possible dedifferentiation with different characteristics. Indeed, mesenchymal stem cells and mature fibroblasts share several morphological and functional characteristics, even the unique characteristics of adherence to plastic, immunophenotype (CD73-positive and CD75-positive and CD14-negative, CD34-negative, and CD45-negative), and the capacity to differentiate into osteogenic and adipogenic lineages, according to the classification established by ISCT (Haniffa *et al.* 2007; Haniffa *et al.* 2009). Several similarities between fibroblasts and mesenchymal stem cells have been described to date, including the presence of these cells in every organ of the body, the endothelial and epithelial origins of the cells, and their capacity to synthesize and remodel the extracellular matrix (Fries *et al.* 1994; Serhan *et al.* 2007).

The expression of pluripotency genes in and the neurodifferentiation capacity of mouse fibroblast NIH-3T3 cells has not been described in the literature. Several characteristics of undifferentiated cells have been ascribed to mature fibroblasts; for example, in response to injury, tissue stress, or inflammation, some fibroblasts are recruited to the wound site, where they proliferate to restore tissue homeostasis and reduce inflammation in damaged tissues (Ariel and Serhan 2007; Serhan *et al.* 2007). However, repair by fibroblasts during continuing injuries can cause chronic inflammation and fibrosis (Desmouliere *et al.* 2003), while this effect is not observed for mesenchymal stem cells in injured tissues (Caplan and Dennis 2006). Adult fibroblasts may secrete factors such as FGF, KGF, and LIF to promote cell survival, as well as immunomodulatory cytokines that are able to suppress inflammation; these activities are also associated with mesenchymal stem cells (Korn 1981; Le and Vilcek 1987; Sarkhosh *et al.* 2003; Jones *et al.* 2007; Haniffa *et al.* 2009; Meirelles Lda *et al.* 2009). A recent comparison between fibroblasts and other adult cell types, including mesenchymal stem cells, demonstrated the similar immunosuppressive potential of both cell lines in vitro (Bocelli-Tyndall *et al.* 2006; Haniffa *et al.* 2007; Jones *et al.* 2007).

After application of the neurodifferentiation protocol, immunofluorescent staining was observed in the cells that had been subjected to co-cultivation before neurodifferentiation. The results indicate that the co-culture promoted the reprogramming of differentiated fibroblast cells that are able to express specific neuronal markers after the application of a neurodifferentiation protocol.

The present study highlighted the requirement for co-cultivation prior to the neurodifferentiation of fibroblasts. Cultures belonging to the 3T3D group (i.e., not co-cultured with mononuclear cells) showed a weaker labeling profile, indicating that co-culture is required for the expression of neural markers after neurodifferentiation. The results observed in the CC-ND group indicate that co-culture alone is not

PLURIPOTENCY GENES AND NEURONAL MARKERS IN FIBROBLASTS

sufficient to promote neurodifferentiation and that other specific factors are also required.

The analysis of immunofluorescence labeling parameters such as cell area, diameter, optical density, and fractal dimension in the four different umbilical cord cultures showed that the PCT1F4 group had a unique outcome. This fact may be related to the heterogeneity of the mononuclear cell pool, gestational age (Erices *et al.* 2000), and other intrinsic and extrinsic factors that can influence the maintenance of these cells, such as maternal age and use of chemicals (Hardy *et al.* 2004; Rossi *et al.* 2005).

Fibroblasts co-cultured with umbilical cord blood mononuclear cells exhibited normal population growth. The cells showed the same population doubling times at all stages of neurodifferentiation, except during the last phase, when key factors were used to promote neurodifferentiation. Cells that reached the last phase of the neurodifferentiation begin to behave like neural cells, which have low rates of cell division. Thus, the reprogrammed fibroblasts apparently attenuate the rate of cell division according to the direction of differentiation, in this case along the neural lineage, leading to cell-type-specific behavior (i.e., nerve cell).

The paracrine mechanisms associated with stem cell therapy are well known; injuries can be attenuated through different endogenous factors associated with the local or systemic application of stem cells. Several paracrine factors with the potential to improve the general state of a specific injury or tissue recovery in different lesions associated with stem cells have been described to date. These factors include immunomodulatory, anti-apoptotic, pro-angiogenic, chemoattractant, and anti-fibrotic molecules, as well as factors that support the growth and differentiation of endogenous progenitor cells (Caplan and Dennis 2006; Meirelles Lda *et al.* 2009). The mesenchymal stem cells can also secrete factors that promote tissue regeneration and protecting the tissues targeted. The mesenchymal stem cells can secrete BDNF in the brain injured, promoting of neuroprotection and activation the mechanisms of neurodifferentiation (Wilkins *et al.* 2009). These effects have been described based on in vitro experiments.

Conclusion

Here, the differentiation of co-cultured fibroblasts induced by soluble factors to the neuronal lineage was confirmed by immunofluorescence, demonstrating the differentiation potential of cells co-cultured with the mononuclear fraction of umbilical cord blood. A new mechanism of action for stem cells may be suggested by these findings because the undifferentiated cells were reprogrammed to a higher level of plasticity and subsequently differentiated into a distinct lineage. In a lesion site, the administered stem cells could promote the reprogramming of resident adult cells, with the potential

for subsequent tissue regeneration. That is, these cells could promote tissue repair not only by recruiting local progenitor cells but also by promoting the redifferentiation of adult cells in the peripheral zone of the lesion. This mechanism could be linked to those that have already been described as another possible function of stem cells in tissue regeneration and the treatment of various diseases. The findings in our experiments and further investigations will be valuable to confirm a novel cell reprogramming mechanism that could play a role in the therapeutic effects associated with adult stem cells. Therefore, we postulate a new hypothesis for a mechanism that may underlie some of the tissue repair effects mediated by stem cells.

Financial support CNPQ—Counsel of Technological and Scientific Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), Brazil

CCB—Cryogenesis Brazil Center (Centro de Criogenia Brasil), Brazil.

References

- Al-Nbaheen M, Vishnubalaji R, Ali D, Bouslimi A, Al-Jassir F, Megges M, Prigione A, Adjaye J, Kassem M and Aldahmash A (2012). Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential. *Stem Cell Rev.*
- Ariel A, Serhan CN (2007) Resolvins and protectins in the termination program of acute inflammation. *Trends Immunol* 28:176–183
- Baksh D, Song L, Tuan RS (2004) Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 8:301–316
- Bieback K, Brinkmann I (2010) Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: From biology to cell therapy. *World J Stem Cells* 2: 81–92
- Bocelli-Tyndall C, Barbero A, Candrian C, Ceredig R, Tyndall A, Martin I (2006) Human articular chondrocytes suppress in vitro proliferation of anti-CD3 activated peripheral blood mononuclear cells. *J Cell Physiol* 209:732–734
- Bourillot PY, Aksoy I, Schreiber V, Wianny F, Schulz H, Hummel O, Hubner N, Savatier P (2009) Novel STAT3 target genes exert distinct roles in the inhibition of mesoderm and endoderm differentiation in cooperation with Nanog. *Stem Cells* 27:1760–1771
- Bourillot PY, Savatier P (2010) Kruppel-like transcription factors and control of pluripotency. *BMC Biol* 8:125
- Caplan AI, Dennis JE (2006) Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 98:1076–1084
- Carrino D, Gershman H (1977) Division of BALB/c mouse 3T3 and simian virus 40-transformed 3T3 cells in cellular aggregates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:3874–3878
- Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K (2005) Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* 309:1369–1373
- Desmouliere A, Darby IA, Gabbiani G (2003) Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Lab Invest* 83:1689–1707
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal

- cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315–317
- Eldering JA, Felten C, Veilleux CA, Potts BJ (2004) Development of a PCR method for mycoplasma testing of Chinese hamster ovary cell cultures used in the manufacture of recombinant therapeutic proteins. *Biologicals* 32:183–193
- Erices A, Conget P, Minguell JJ (2000) Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 109:235–242
- Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154–156
- Fries KM, Blieden T, Looney RJ, Sempowski GD, Silvera MR, Willis RA, Phipps RP (1994) Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. *Clin Immunol Immunopathol* 72:283–292
- Haniffa MA, Collin MP, Buckley CD, Dazzi F (2009) Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica* 94:258–263
- Haniffa MA, Wang XN, Holtick U, Rae M, Isaacs JD, Dickinson AM, Hilkens CM, Collin MP (2007) Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. *J Immunol* 179:1595–1604
- Hardy RR, Wei CJ, Hayakawa K (2004) Selection during development of VH11+B cells: a model for natural autoantibody-producing CD5+ B cells. *Immunol Rev* 197:60–74
- Jiang J, Chan YS, Loh YH, Cai J, Tong GQ, Lim CA, Robson P, Zhong S, Ng HH (2008) A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 10:353–360
- Jones S, Horwood N, Cope A, Dazzi F (2007) The antiproliferative effect of mesenchymal stem cells is a fundamental property shared by all stromal cells. *J Immunol* 179:2824–2831
- Kobylka P, Ivanyi P, Breur-Vriesendorp BS (1998) Preservation of immunological and colony-forming capacities of long-term (15 years) cryopreserved cord blood cells. *Transplantation* 65:1275–1278
- Korn JH (1981) Modulation of lymphocyte mitogen responses by cocultured fibroblasts. *Cell Immunol* 63:374–384
- Le JM, Vilecek J (1987) Accessory function of human fibroblasts in mitogen-stimulated interferon-gamma production by T lymphocytes. Inhibition by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Immunol* 139:3330–3337
- Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E, Fagioli F (2001) Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica* 86:1099–1100
- Martin GR (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:7634–7638
- Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI (2009) Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 20:419–427
- Momin EN, Mohyeldin A, Zaidi HA, Vela G, Quinones-Hinojosa A (2010) Mesenchymal stem cells: new approaches for the treatment of neurological diseases. *Curr Stem Cell Res Ther* 5:326–344
- Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ (1999) Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem* 72:570–585
- Rossi DJ, Bryder D, Zahn JM, Ahlenius H, Sonu R, Wagers AJ, Weissman IL (2005) Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9194–9199
- Sarkhosh K, Tredget EE, Li Y, Kilani RT, Uludag H, Ghahary A (2003) Proliferation of peripheral blood mononuclear cells is suppressed by the indoleamine 2,3-dioxygenase expression of interferon-gamma-treated skin cells in a co-culture system. *Wound Repair Regen* 11:337–345
- Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LA, Perretti M, Rossi AG, Wallace JL (2007) Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J* 21:325–332
- Song S, Sanchez-Ramos J (2008) Preparation of neural progenitors from bone marrow and umbilical cord blood. *Methods Mol Biol* 438:123–134
- Steinberg S, Katsanis S, Moser A, Cutting G (2005) Biochemical analysis of cultured chorionic villi for the prenatal diagnosis of peroxisomal disorders: biochemical thresholds and molecular sensitivity for maternal cell contamination detection. *J Med Genet* 42:38–44
- Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T (2001) Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol* 11:1553–1558
- Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663–676
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145–1147
- Volokhov DV, Kong H, George J, Anderson C, Chizhikov VE (2008) Biological enrichment of Mycoplasma agents by co-cultivation with permissive cell cultures. *Appl Environ Microbiol* 74:5383–5391
- Wagner J, Kean T, Young R, Dennis JE, Caplan AI (2009) Optimizing mesenchymal stem cell-based therapeutics. *Curr Opin Biotechnol* 20:531–536
- Wang H, Kong F, Jelfs P, James G, Gilbert GL (2004) Simultaneous detection and identification of common cell culture contaminant and pathogenic mollicutes strains by reverse line blot hybridization. *Appl Environ Microbiol* 70:1483–1486
- Wilkins A, Kemp K, Ginty M, Hares K, Mallam E, Scolding N (2009) Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells secrete brain-derived neurotrophic factor which promotes neuronal survival in vitro. *Stem Cell Res* 3:63–70
- Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810–813

ANEXO 2 - ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO EM REVISTA
INDEXADA

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of
Neuroscience Methods
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Induced Pluripotent Stem Cells (iPS) from Patients with Focal
Cortical Dysplasia and Refractory Epilepsy

Article Type: Research Article

Section/Category: Basic Neuroscience

Keywords: Focal cortical dysplasia; epilepsy; drug refractory; cortical
malformation; Induced Pluripotent Stem Cell (iPS).

Corresponding Author: Dr. Jaderson C daCosta, Dr.

Corresponding Author's Institution: PUCRS

First Author: Daniel Marinowic, PhD

Order of Authors: Daniel Marinowic, PhD; Fernanda Majolo, Msc.;
Alessandra Sebben, Dr.; Vinicius D da Silva, Dr.; Tiago G Lopez, Bsc.;
Eliseu Paglioli, Dr.; André Palmmini, Dr.; Denise C Machado, Dr.; Jaderson
C daCosta, Dr.

Abstract: Background: The focal cortical dysplasia (FCD) includes
multiple alterations that can be divided into abnormalities of cortical
architecture and cytological variations. The exact etiology of FCD are
still unknown. The generation of Induced Pluripotent Stem Cells (iPS)
cells and tissue specific differentiation of cells of patients with
neurological disease can a value invaluable for testing and provide an
additional capacity for study the initial development and the progression
of diseases associated with center nervous system.

New Method: Two patients were enrolled in this study with seizures
refractory to drug treatment and characterized with FCD type IIb.
Fibroblasts were obtained from residual skin fragments from surgical
treatment and brain samples from surgical resection. Induced pluripotent
stem cells (iPS) were generated through exposure of fibroblasts to viral
vectors containing the genes OCT4, SOX2, KLF4 and c-MYC and characterized
by anti-Nanog, anti-Sox2, anti-Oct4, anti-TRA1-60, and anti-TRA1-81. The
brain samples were tested by antibodies anti-AKT, anti-AKT
phosphorylated, anti-mTOR e anti-mTOR phosphorylated.

Results: The analyses of AKT/mTOR pathway in the cerebral dysplastic
tissue show a statistically significant difference between cerebral
tissues. Clones with morphological features of embryonic cells could be
detected in the 13th and characterized after three subcultures. The
positive staining characteristics of the embryonic cells confirm the
success of pluripotent stem cells derived from fibroblasts from patients.
Comparison with Existing Method: Until this moment, don't exist other
embryonic model with autologous human cells.

Conclusions: We present a useful tool that can help to understand the
embryonic brain development related to focal cortical dysplasia.

Suggested Reviewers: Acsady Laszlo

acsady@koki.hu

Herbert Geller
gellerh@nhlbi.nih.gov

Jane Bottenstein

Frank Sengpiel
sengpiel@cardiff.ac.uk

Frank Sengpiel

Opposed Reviewers:

Ethical Standards Agreement

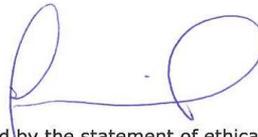
[Click here to download Ethical Standards Agreement: Ethical Standards.pdf](#)

All submissions to the Journal of Neuroscience Methods must contain experiments that conform to the ethical standards printed below.

To confirm your agreement with this, you are required to include the following statement in your cover letter indicating your agreement with these standards: "I have read and have abided by the statement of ethical standards for manuscripts submitted to the Journal of Neuroscience Methods"

ETHICAL STANDARDS:

- The authors declare that all experiments on human subjects were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki <http://www.wma.net> and that all procedures were carried out with the adequate understanding and written consent of the subjects.
- The authors also certify that formal approval to conduct the experiments described has been obtained from the human subjects review board of their institution and could be provided upon request.
- If the studies deal with animal experiments, the authors certify that they were carried out in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23) revised 1996 or the UK Animals (Scientific Procedures) Act 1986 and associated guidelines, or the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).
- The authors also certify that formal approval to conduct the experiments described has been obtained from the animal subjects review board of their institution and could be provided upon request.
- The authors further attest that all efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.
- If the ethical standard governing the reported research is different from those guidelines indicated above, the authors must provide information in the submission cover letter about which guidelines and oversight procedures were followed.
- The Editors reserve the right to return manuscripts in which there is any question as to the appropriate and ethical use of human or animal subjects.



I have read and have abided by the statement of ethical standards for manuscripts submitted to the Journal of Neuroscience Methods

*Title page-incl. type of article and authors name and affiliation

[Click here to download Title page-incl. type of article and authors name and affiliation: Title page_Marinowic.docx](#)

Induced Pluripotent Stem Cells (iPS) from Patients with Focal Cortical Dysplasia and Refractory Epilepsy

Marinowic, D.R.^{a,b} (dmarinowic@gmail.com); Majolo, F.^b (fernandamajolo@hotmail.com); Sebben, A.D.^{a,b} (adsebben@gmail.com); da Silva, V. D.^{c,d} (vinicius.duval@pucrs.br); Lopes, T.G.^c (tgiulianni@yahoo.com.br); Paglioli, E.^c (epaglioli@hotmail.com); Palmimi, A.^{e,d} (apalmimi@uol.com.br); Machado, D.C.^{a,b,d} (dcm@pucrs.br); DaCosta, J.C.^{a,d} (jcc@pucrs.br)*.

(a) Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul (InsCer),

(b) Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS),

(c) Laboratório de Anatomia Patológica da PUCRS,

(d) Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da PUCRS,

(e) Programa de Cirurgia da Epilepsia da PUCRS.

Address: Av. Ipiranga, 6690, building 63, Zip Code: 90610000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

* Corresponding author: Jaderson Costa DaCosta. Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul (InsCer). Av. Ipiranga, 6690, building 63, Jardim Botânico, Porto Alegre Rio Grande do Sul, Brazil. Zip code: 90610.000. Phone: 5551 33203485. Email address: jcc@pucrs.br

***Manuscript (With Page Numbers)**

[Click here to download Manuscript \(With Page Numbers\): Manuscript_Marinowic_JNM_FINAL.pdf](#) [Click here to view linked References](#)

Induced Pluripotent Stem Cells (iPS) from Patients with Focal Cortical Dysplasia and Refractory Epilepsy

1. ABSTRACT

Background: The focal cortical dysplasia (FCD) includes multiple alterations that can be divided into abnormalities of cortical architecture and cytological variations. The exact etiology of FCD are still unknown. The generation of Induced Pluripotent Stem Cells (iPS) cells and tissue specific differentiation of cells of patients with neurological disease can a value invaluable for testing and provide an additional capacity for study the initial development and the progression of diseases associated with center nervous system.

New Method: Two patients were enrolled in this study with seizures refractory to drug treatment and characterized with FCD type IIb. Fibroblasts were obtained from residual skin fragments from surgical treatment and brain samples from surgical resection. Induced pluripotent stem cells (iPS) were generated through exposure of fibroblasts to viral vectors containing the genes OCT4, SOX2, KLF4 and c-MYC and characterized by anti-Nanog, anti-Sox2, anti-Oct4, anti-TRA1-60, and anti-TRA1-81. The brain samples were tested by antibodies anti-AKT, anti-AKT phosphorylated, anti-mTOR e anti-mTOR phosphorylated.

Results: The analyses of AKT/mTOR pathway in the cerebral dysplastic tissue show a statistically significant difference between cerebral tissues. Clones with morphological features of embryonic cells could be detected in the 13th and characterized after three subcultures. The positive staining characteristics of the embryonic cells confirm the success of pluripotent stem cells derived from fibroblasts from patients.

Comparison with Existing Method: Until this moment, don't exist other embryonic model with autologous human cells.

Conclusions: We present a useful tool that can help to understand the embryonic brain development related to focal cortical dysplasia.

2. KEY WORDS

Focal cortical dysplasia; epilepsy; drug refractory; cortical malformation; Induced Pluripotent Stem Cell (iPS).

3. ABBREVIATIONS

FCD - Focal Cortical Dysplasia

iPS - Induced Pluripotent Stem Cells

CNS - Center Nervous System

EEG - Electroencephalography

4. INTRODUCTION

5.1 Focal Cortical Displasia

Focal cortical dysplasia (FCD) is the most frequent malformation of cortical development, leading to drug refractory epilepsy (Palmini et al., 2004). The frequency of FCD in patients submitted to surgery for refractory epilepsy varies between 12% and 40% (Arai et al., 2012; Prayson et al., 2002). The definitive diagnosis of FCD is performed after surgical treatment for refractory epilepsy based on neuropathological findings in cortical tissue resection (Guerrini et al., 2008). The FCD includes multiple alterations that can be divided into two major groups. The first group is characterized by abnormalities of cortical architecture through the columnar disorganization and a laminar interruption by changes on the sixth tangential layer composition. The second group has cytological abnormalities with hypertrophic neuronal cells outside the normal anatomic location at layer V, and/or balloons cells. The balloon cells possess a poorly defined membrane with single or multiple nuclei and eosinophilic cytoplasm, characteristics of neuronal and glial cells known as Taylor's FCD (Kabat and Krol, 2012; Taylor et al., 1971).

In 2004, Palmini and colleagues (Palmini et al., 2004) classified the FCD according to the white matter and cortical layer architecture as follows: Type I, presence of heterotrophic neurons in the white matter, cortical layer architecture alterations, and giant neurons; Type IIa, presence of heterotrophic neurons in the white matter, cortical layer architecture alterations, giant neurons, and dysmorphic cells; Type IIb, presence of heterotrophic neurons in the white matter, cortical layer architecture alterations, giant neurons, dysmorphic cells, and of balloons cells. Blumcke *et al* in 2001 (Blumcke et al., 2011) changed the Palmini's classification, showing three types of focal cortical

dysplasia and Type I, II e III. The mechanisms involved in the pathogenesis of focal cortical dysplasia are still poorly investigated, mainly by the limited number of cases and the lack of suitable experimental models (Kabat and Krol, 2012).

The exact etiology of FCD are still unknown, but they are probably related to clonal somatic mutations that, in some patients, affect the same signaling pathways (Kuzniecky, 2015). Some studies have shown an increase in the mTOR signaling in patients with FCD based on phosphorylated molecules, such as S6 ribosomal proteins. These changes are found in FCD type IIb were 80% to 90% of balloons cells and giant neurons in cerebral cortex (Hsu et al., 2011). Some cases of FCD show activation related molecules phosphorylation of the phosphoinositide-3-dependent kinase (PI3K) pathway and protein kinase B (AKT or PKB) in the dysplasia tissue (Zhou et al., 2009). The phosphorylation of PI3K pathway in response to some stimulus is related to a coordinated set of events that control cell growth, cell cycle, cell migration, and cell survival (Cantley, 2002).

5.2 Induced Pluripotent Stem Cells (iPS)

The study of neurological and neuropsychiatric disorders has been a wide challenge for researchers. Despite significant investments in the area, pre-clinical models that can be used to study the pathophysiology, mechanisms, therapeutic target, and test of new drugs are scarce (Dolmetsch and Geschwind, 2011). Although animal are valuable models to elucidate disease, develop specific markers, and to identify genes associated with certain diseases, they have a poor record when it comes to translate the therapeutic discovery for human use (Dragunow, 2008). The importance of the use of human cells for the study of diseases is evident for the number of drugs that showed

efficacy and safety when tested in animal models, but, fail in clinical trials, it is assigned to the differences between the species (Ichida and Kiskinis, 2015).

Studies using *post mortem* tissue can to offer a large window of cerebral structural alteration in molecular and cellular level. Considering these surveys and limitations, comes up the need of study of cerebral development starting of cells originated of himself patient. (Dolmetsch and Geschwind, 2011).

The reprogramming of adult somatic cells in embryonic level is an attractive and promising approach for regenerative medicine, also enabling the *in vitro* complex genetic disease studies not understood yet. Somatic cells can be reprogrammed by nuclear transfer into enucleated oocytes or by cell fusion between somatic cells and embryonic cells, co-culture of undifferentiated cells with somatic cell and adding genes that active selectively transcriptions factors (Marinowic et al., 2015; Takahashi et al., 2007a). In 2006, the Japanese researchers Takahashi and Yamanaka (Takahashi and Yamanaka, 2006), showed the technical for producer of pluripotent cells by reprogramming of mouse fibroblast, and in 2007, in human cells (Takahashi et al., 2007b). The cells were reprogramming for addition of four genes: Oct4, SOX-2, KLF-4 and c-Myc, for viral vectors. This reprogramming can be done in differences cellular types. The cells generated by this method are called *Induced Pluripotent Stem Cells* – iPS, and they are very similar to embryonic stem cells, with the same characteristics of self-renewal and differentiation potential for strains of the three germ layers. (Fries et al., 1994; Takahashi and Yamanaka, 2006).

The iPS cells differentiated into specific tissues are used for translational studies of testing drugs in cells of difficult to obtain, for example cardiomyocytes, neurons, and liver cells. The generation of iPS cells and tissue specific differentiation of cells of patients with neurological disease can a value invaluable for testing and provide an

additional capacity for study the initial development and the progression of diseases associated with center nervous system (CNS) (Parent and Anderson, 2015). Cellular models show high relevance for study of human disease, providing excellent conditions for understanding mechanisms and constituting an accomplished tool for high-throughput experiments, even allowing for the construction of platforms for screening new drugs in many human diseases (Dolmetsch and Geschwind, 2011).

Currently, the iPS cells are the increasing the studies neurological diseases presenting cell designs of various orders, for example Multiple Sclerosis (Song et al., 2012), Atrophy Cerebellar (Luo et al., 2012), Alzheimer's Disease (Duan et al., 2014; Hossini et al., 2015; Israel et al., 2012; Yagi et al., 2011), Rett Syndrome (Djuric et al., 2015; Livide et al., 2015; Marchetto et al., 2010; Williams et al., 2014), Amyotrophic Lateral Sclerosis (Devlin et al., 2015; Kiskinis et al., 2014; Sareen et al., 2013; Wainger et al., 2014), Ataxia Telangiectasia (Lee et al., 2013), Dravet Syndrome (Jiao et al., 2013), Familial Dysautonomia (Lee et al., 2009), Fragile X Syndrome (Doers et al., 2014), Gaucher's Disease (Tiscornia et al., 2013), Huntington's Disease (Guo et al., 2013; Yao et al., 2015), Lesch–Nyhan Syndrome (Mekhoubad et al., 2012), Microcephaly (Lancaster et al., 2013), Parkinson's Disease (Chung et al., 2013; Reinhardt et al., 2013; Sanders et al., 2014), Schizophrenia (Paulsen Bda et al., 2012; Robicsek et al., 2013; Yoon et al., 2014), among others. The technology of cellular reprogramming brought the reality of clinical heterogeneity observed in patients from lab bench to the bedside (Ichida and Kiskinis, 2015). The use of iPS derived from specific neural diseases can help to shed light about the embryonic neurogenesis, cortical formation, and the pathophysiology. Therefore, we aim to establish a cellular model of refractory epilepsy from fibroblasts obtained from patients with Focal Cortical Dysplasia by generating of Induced Pluripotent Stem Cells (iPS).

5. METHODS

6.1 Patients enrolled

Two patients were enrolled in this study after their signed the Ethical Consent according the guidance of institutional Research Ethical Committee.

Patient #1 is a 45 year-old man with medically refractory seizures whose EEG monitoring showed sharp waves in the right frontal region and 3 seizures with onset in the same region (Figure 1). MRI showed a small right frontal lesion with increased signal and blurring of the cortico-subcortical white matter (Figure 2), which was resected under acute electrocorticography. Histopathology and IHC (Figure 3) had cortical dyslamination and large, dysplastic neurons, but no balloon cells, compatible with Focal Cortical Dysplasia type IIa (ILAE) (Blumcke et al., 2011).

Patient #2 is a 12-year old girl who started seizures around age five, . characterized by sudden extension of right arm and head drop. She often had many seizures a day, despite attempts with many antiepileptic drug regimens. She also had a cystic lesion with regular borders in the right parietal region, which intermittently led to moderate intracranial hypertension and was surgically targeted in several occasions. However, this approach did not significantly modify seizure control, which led to presurgical evaluation. The latter showed maximal interictal and ictal epileptic activity in the left frontal region (Figure 4), where an orbitofrontal dysplastic lesion was clearly seen on MRI (Figure 5). She had resective surgery under acute electrocorticography and histopathology and IHC (Figure 6) showed a typical pattern of Focal Cortical Dysplasia type IIa (ILAE) (Blumcke et al., 2011).

6.2 Production of fibroblasts from skin biopsies

The human fibroblasts were obtained from residual skin fragments from two patients undergoing surgical treatment for medically refractory epilepsy at the Epilepsy Surgery Program of the Hospital São Lucas. The skin biopsies were cut into pieces of approximately 5 mm² and the skin fragments placed in a 60 mm Petri dish with the dermis facing the plate. DMEM culture medium supplemented with 20% of fetal bovine serum (Gibco), 100 U/mL penicillin (Gibco), 100 U/mL streptomycin (Gibco), 100 µg/mL gentamicin (Gibco), and 20 ng/mL of Fibroblast Growth Factor (FGF) (Life Technologies) was used. The skin fragments were maintained at 37°C with 5% CO₂ until confluence greater than 80% when a mycoplasma test (MycoAlert Plus, Lonza) was performed. After a mycoplasma free test, cells were kept under the same conditions up to the seventh passage.

6.3 Histologic analysis of dysplastic tissue

Brain samples obtained from surgical resection, were immediately fixed in 10% buffered formaldehyde for 24 hours, and the surgical specimens were processed and paraffin-embedded. All specimens were cut at 5 µm slices with microtome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), stained with H&E and additional slides were submitted to automated immunohistochemistry staining (Dako Autostainer Link 48 (Agilent Technologies, Glostrup, Denmark) for anti-NeuN (A60, EMD Millipore, Merck, Darmstadt, Germany), anti-Vimentin (Dako). All reactions had positive and negative external control samples on the same slide. The slides were reviewed under a Zeiss Axiokop 40 microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). All images were documented in TIFF uncompressed format with a Retiga 2000R color videocamera (QImaging, Surrey, Canada).

6.4 Generation of iPS cells

Induced pluripotent stem cells (iPS) were generated through exposure of fibroblasts to viral vectors containing the genes OCT4, SOX2, KLF4 and c-MYC using KIT CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming (Life Technologies) according to manufacturer's guidance. Fibroblasts were cultured in six-well culture plates and transfected wells were selected which showed confluence of approximately 70% cropping surface. The used amount of viral particles was calculated using the MOI equation. The particular amount of virus was diluted in 1 ml of culture medium DMEM/F12 supplemented with 20% de Knockout™ Serum Replacement (KSR) (Life Technologies), Not Essential Amino Acids of DMEM (1X) (Life Technologies), Glutamax (1X) (Life Technologies) and antibiotics. The fibroblasts were exposed to medium containing the virus is incubated at 37 °C 5% CO₂ for 24 hours. The cells were washed with PBS, and cultured under the same conditions for six days. On the seventh day after the transfection, the cultures were treated with Trypsin/EDTA, and transferred to a culture dish containing BD Matrigel hESC-qualified Matrix (BD Biosciences). After 24 hours, the culture medium was replaced by embryonic cells mTeSR medium (Stem Cell Technologies). After about 20 days, cell clones were manually removed and transferred to new plates containing BD Matrigel hESC-qualified Matrix . After three subcultures, the clones were characterized by anti-Nanog, anti-Sox2, anti-Oct4, anti-TRA1-60, and anti-TRA1-81 conjugated antibodies after 4% PFA. Conjugated antibody diluted 1:100 in blocking buffer was incubated with cells for 2 hours at room temperature. After twos PBS washes, cells were stained with 4',6-diamidino-2-phenilindol (DAPI) (Sigma-Aldrich).

6.5 Analysis of AKT and mTOR pathway

The brain tissue was fixed with 4% buffered formaldehyde, paraffin-embedded and sliced into 5 μ m. Primary antibodies anti-AKT, anti-AKT phosphorylated, anti-mTOR e anti-mTOR phosphorylated (Cell Signaling) diluted 1:100 with blocking buffer were used. The slides were incubated at 4 °C for twelve hours followed by treatment with secondary antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) for two hours at room temperature. The slides were washed with PBS and DAPI 0,01% was added to nuclei staining. Analysis was performed using confocal microscope Zeiss LSM-5 exciter. For quantitative analysis, we randomly selected 10 visual fields using 20X objective lens, with a minimum of 20 DAPI positive cells.

6. RESULTS

7.1 AKT/mTOR pathway analysis

The analyses of AKT/mTOR pathway in the cerebral dysplastic tissue show a statistically significant difference between cerebral tissues, as shown in Figure 7. The quantified area stained with anti-AKT was 756 μ m² (Pct1) and 291 μ m² (Pct 2) (p=0.006), and phospho-AKT was 974 μ m² and 408 μ m², for Pct1 and Pct2 respectively with p=0,004. In addition, the mTOR pathway analyses also showed a difference statistically significant between cerebral tissues. In mTOR pathway the Pct1 showed 1.210 μ m² and the Pct2 341 μ m² (p=0.0003) of stained area. The area positive for phospho-mTOR pathway was 1.004 μ m² for Pct1 and 507 μ m² for Pct2 (p=0.004).

7.2 Establishment of skin fibroblasts from patients with focal cortical dysplasia

Skin fragments cultures for twenty days were screened for mycoplasma, and after a negative result, the derived fibroblasts were subculture up to seven passages. Cells in the fourth, fifth, sixth, and seventh passages was cryopreserved in liquid nitrogen. In addition, the morphology characterization was performed with fifth passage fibroblast. Figure 8A shown the skin fragment (arrow) and the derived fibroblasts and in Figure 8B the derived fibroblasts suitable for viral transfection.

7.3 Induced pluripotent stem cells (iPS) from cellular reprogramming of fibroblasts from patients with focal cortical dysplasia

Clones with morphological features of embryonic cells could be detected in the 13th day after viral transfection. Clones could be manually selected, and cultured over Matrigel, around day 25th as shown in Figure 9. A small clone surrounded by few fibroblasts was observed in Figure 9A (day 13). After 20 (Figure 9B) and 25 days (Figure 9C) of culture, a larger clone with morphological features of embryonic cells were detected but still with fibroblasts. Finally, after a passage to a Matrigel support (Figure 9D), a cell clone free of fibroblasts was obtained.

The features of embryonic cells were further confirmed after three subcultures of clones over Matrigel, with antibodies against pluripotency markers: Nanog, Sox2, Oct4, TRA1-60, and TRA1-81 (Figure 10). The positive staining characteristics of the embryonic cells confirm the success of pluripotent stem cells derived from fibroblasts from patients with focal cortical dysplasia.

7. DISCUSSION

Several neural diseases, mainly the ones that affect the central nervous system are still poorly understood, since the embryonic development up to clinical signs. In addition, they represent a huge physical and social burden to patients and families, with highly financial costs to public health. While significant advances have been made in recent decades in genetic terms, clinical classification, patient care, effective treatments are still scarce (Ichida and Kiskinis, 2015).

On the other hand, the unquestionable advance of induced pluripotent stem cells (iPS) generation, and subsequent differentiation into several tissue types render them a stand out of cellular models for diverse diseases, including the ones that affect the central nervous system. This strategy allows the investigation and a new approach to study the mechanisms of embryonic neurodevelopment and pathological contexts specific for each patient, considering your personal genetic uniqueness (Ichida and Kiskinis, 2015).

In this work, we have shown for the first time, as far as we known, the development of a cell model for the study of embryonic neurogenesis of refractory epilepsy to drug treatment, a focal cortical dysplasia (FCD) disease.

Recently, some studies have shown a link between genetic changes and different types of cortical malformations, relating separately, with the main stages of the central nervous system development (Kuzniecky, 2015). More than 100 genes have been associated with different types of cortical malformations (Guerrini and Dobyns, 2014). Major genes, and therefore some with a role on signaling pathways related to cerebral cortex malformation, are involved with apoptosis, cell proliferation, cytoskeletal structure, cell migration and neurodiferenciação. Alterations in the signaling and/or

other control pathways may have a varying impact not only on the pattern of brain cortical malformation, as well as site affected (Kuzniecky, 2015).

The diagnosis of some cortical defects, such as megalencephaly, polymicrogyria, hemimegalencephaly, cortical dysplasia are clinically generated by typical features in imaging. Pathological changes in these disorders include a wide range of abnormalities, including those typically related to the FCD. A growing number of gene alterations have been related to polymicrogyria and hemimegalencephaly especially cases with more severe phenotypes. Megalencephaly with polymicrogyria present mutation in PI3K-CAE PI3K-R2. The isolated hemimegalencephaly are associated with mosaic mutations in pathways PI3K, AKT e mTOR. However, unlike these malformations, the FCD etiology are still unknown (Hsu et al., 2011; Kuzniecky, 2015; Zhou et al., 2009).

Normal PI3K/AKT integrates fundamental physiological responses for a healthy aging and longevity. Some studies have shown that the reduction in PI3K/AKT signaling pathway could be related to life span of some species (Johnson, 2008; Kenyon, 2010). PI3K/AKT/mTOR signaling pathways alterations are involved with age-related, such as heart and neurological diseases. An increased activation of this pathway can be considered a feature of early onset of Alzheimer's disease, but also relates to normal aging subjects (C, 2013). The brain tissue from the patients investigated in this study have shown a difference regarding both pathways. A significant increase of AKT, phopho-AKT, mTOR, and phospho-mTOR expression was observed in the older (Pct 1: 45 years old) when compared with the younger patient (Pct 2: 12 years old). Indeed, the literature shows that balloon and giant cells in the brain tissue from patients with DCF express markers of mature, undifferentiated neuronal cells and glial cells. However, this hypothesis can only be confirm if one could

investigate brain tissue from patients with the same age, although it cannot be discarded its genetic background.

It is speculated that clonal somatic mutations can be shared among affected patients. Some studies are show increase of mTOR signaling in about 80% to 90% of balloons cells present in the cortex of patients with FDC type IIb. Some cases of FCD type IIb also exhibit increased PI3K and AKT activity (Hsu et al., 2011; Kuzniecky, 2015; Zhou et al., 2009). An increased signaling of the PI3K/AKT/mTOR pathway was demonstrated in FCD type IIa and IIb without genetic mutation, which is attributed to other mechanisms related to other common diseases (Jansen et al., 2015).

Induced pluripotent stem cells (iPS) can be obtained from somatic cells by the means of distinct techniques, such as chemical induction or gene transfection. Using the premised raised by the technique developed by Takahashi and Yamanaka, one should offer, at least the four genes that confer pluripotency. Retroviral vectors require the integration of transfected genes in the host genome in order to be expressed along with the other hosts genes. Adenoviral, adeno-associated virus and plasmid vectors do not require, but can integrate and may disrupt the host genome. The viral vector used in the present study are not integrative, showing no influence on the host cell genome (Fusaki et al., 2009; Li et al., 2000). This property are an addition to the embryonic features already mentioned, such as pluripotency.

The consensus currently used to characterize pluripotent cells starts, initially by observing the clone morphology, since the iPS clones generated from human cells have distinct morphology, containing large nuclei and well-organized colonies with clearly defined edges (2009). In addition, adequate clones should be well organized and tightly adhered, without areas of differentiation.

The pluripotency of the clones was confirmed by positive expression of Nanog, Sox2, Oct4, TRA1-60 and TRA1-81. There is no minimum criteria required for the iPS characterization. However, the presence of some markers are essential to confirm the pluripotency, as well as the maintenance of the undifferentiated condition (Asprer and Lakshmipathy, 2015).

8. CONCLUSION

The global understanding development and normal brain functioning, depends on the extensive knowledge in the brain formation, connections patterns between neurons and brain regions, as well as the synaptic communications present in these connections. Studies with iPS cells from patients with FCD allow to investigate the neurodevelopmental stages, and the molecular and clinical evidence found in the affected adult tissue. Furthermore, the generated iPS will simulate, *in vitro*, the processes involved in the embryonic neurogenesis and possible changes that may be related to the abnormal development of the FCD cerebral cortex.

Here we present a useful tool that can help to understand the embryonic brain development related to focal cortical dysplasia, a disease with an unclear genesis. Perhaps using the same approach, other developmental diseases can benefit.

9. COMPETING INTERESTS STATEMENT

The authors declare no conflicts of interest.

10. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support.

11. REFERENCES

- Consensus guidance for banking and supply of human embryonic stem cell lines for research purposes. *Stem cell reviews*, 2009; 5: 301-14.
- Arai A, Saito T, Hanai S, Sukigara S, Nabatame S, Otsuki T, Nakagawa E, Takahashi A, Kaneko Y, Kaido T, Saito Y, Sugai K, Sasaki M, Goto Y, Itoh M. Abnormal maturation and differentiation of neocortical neurons in epileptogenic cortical malformation: unique distribution of layer-specific marker cells of focal cortical dysplasia and hemimegalencephaly. *Brain research*, 2012; 1470: 89-97.
- Asprer JS, Lakshmi U. Current methods and challenges in the comprehensive characterization of human pluripotent stem cells. *Stem cell reviews*, 2015; 11: 357-72.
- Blumcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Vinters HV, Palmini A, Jacques TS, Avanzini G, Barkovich AJ, Battaglia G, Becker A, Cepeda C, Cendes F, Colombo N, Crino P, Cross JH, Delalande O, Dubeau F, Duncan J, Guerrini R, Kahane P, Mathern G, Najm I, Ozkara C, Raybaud C, Represa A, Roper SN, Salamon N, Schulze-Bonhage A, Tassi L, Vezzani A, Spreafico R. The clinicopathologic spectrum of focal cortical dysplasias: a consensus classification proposed by an ad hoc Task Force of the ILAE Diagnostic Methods Commission. *Epilepsia*, 2011; 52: 158-74.
- C ON. PI3-kinase/Akt/mTOR signaling: impaired on/off switches in aging, cognitive decline and Alzheimer's disease. *Experimental gerontology*, 2013; 48: 647-53.
- Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 2002; 296: 1655-7.
- Chung CY, Khurana V, Auluck PK, Tardiff DF, Mazzulli JR, Soldner F, Baru V, Lou Y, Freyzon Y, Cho S, Mungenast AE, Muffat J, Mitalipova M, Pluth MD, Jui NT, Schule B, Lippard SJ, Tsai LH, Krainc D, Buchwald SL, Jaenisch R, Lindquist S. Identification and rescue of alpha-synuclein toxicity in Parkinson patient-derived neurons. *Science*, 2013; 342: 983-7.
- Devlin AC, Burr K, Borooah S, Foster JD, Cleary EM, Geti I, Vallier L, Shaw CE, Chandran S, Miles GB. Human iPSC-derived motoneurons harbouring TARDBP or C9ORF72 ALS mutations are dysfunctional despite maintaining viability. *Nature communications*, 2015; 6: 5999.
- Djuric U, Cheung AY, Zhang W, Mok RS, Lai W, Piekna A, Hendry JA, Ross PJ, Pasceri P, Kim DS, Salter MW, Ellis J. MECP2e1 isoform mutation affects the form and function of neurons derived from Rett syndrome patient iPS cells. *Neurobiology of disease*, 2015; 76: 37-45.
- Doers ME, Musser MT, Nichol R, Berndt ER, Baker M, Gomez TM, Zhang SC, Abbeduto L, Bhattacharyya A. iPSC-derived forebrain neurons from FXS individuals show defects in initial neurite outgrowth. *Stem cells and development*, 2014; 23: 1777-87.
- Dolmetsch R, Geschwind DH. The human brain in a dish: the promise of iPSC-derived neurons. *Cell*, 2011; 145: 831-4.
- Dragunow M. The adult human brain in preclinical drug development. *Nature reviews. Drug discovery*, 2008; 7: 659-66.
- Duan L, Bhattacharyya BJ, Belmadani A, Pan L, Miller RJ, Kessler JA. Stem cell derived basal forebrain cholinergic neurons from Alzheimer's disease patients are more susceptible to cell death. *Molecular neurodegeneration*, 2014; 9: 3.
- Fries KM, Blieden T, Looney RJ, Sempowski GD, Silvera MR, Willis RA, Phipps RP. Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. *Clin Immunol Immunopathol*, 1994; 72: 283-92.

- Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 2009; 85: 348-62.
- Guerrini R, Dobyns WB. Malformations of cortical development: clinical features and genetic causes. *The Lancet. Neurology*, 2014; 13: 710-26.
- Guerrini R, Dobyns WB, Barkovich AJ. Abnormal development of the human cerebral cortex: genetics, functional consequences and treatment options. *Trends in neurosciences*, 2008; 31: 154-62.
- Guo X, Disatnik MH, Monbureau M, Shamloo M, Mochly-Rosen D, Qi X. Inhibition of mitochondrial fragmentation diminishes Huntington's disease-associated neurodegeneration. *The Journal of clinical investigation*, 2013; 123: 5371-88.
- Hossini AM, Megges M, Prigione A, Lichtner B, Toliat MR, Wruck W, Schroter F, Nuernberg P, Kroll H, Makrantonaki E, Zouboulis CC, Adjaye J. Induced pluripotent stem cell-derived neuronal cells from a sporadic Alzheimer's disease donor as a model for investigating AD-associated gene regulatory networks. *BMC genomics*, 2015; 16: 84.
- Hsu PP, Kang SA, Rameseder J, Zhang Y, Ottina KA, Lim D, Peterson TR, Choi Y, Gray NS, Yaffe MB, Marto JA, Sabatini DM. The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. *Science*, 2011; 332: 1317-22.
- Ichida JK, Kiskinis E. Probing disorders of the nervous system using reprogramming approaches. *The EMBO journal*, 2015; 34: 1456-77.
- Israel MA, Yuan SH, Bardy C, Reyna SM, Mu Y, Herrera C, Hefferan MP, Van Gorp S, Nazor KL, Boscolo FS, Carson CT, Laurent LC, Marsala M, Gage FH, Remes AM, Koo EH, Goldstein LS. Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2012; 482: 216-20.
- Jansen LA, Mirzaa GM, Ishak GE, O'Roak BJ, Hiatt JB, Roden WH, Gunter SA, Christian SL, Collins S, Adams C, Riviere JB, St-Onge J, Ojemann JG, Shendure J, Hevner RF, Dobyns WB. PI3K/AKT pathway mutations cause a spectrum of brain malformations from megalencephaly to focal cortical dysplasia. *Brain : a journal of neurology*, 2015; 138: 1613-28.
- Jiao J, Yang Y, Shi Y, Chen J, Gao R, Fan Y, Yao H, Liao W, Sun XF, Gao S. Modeling Dravet syndrome using induced pluripotent stem cells (iPSCs) and directly converted neurons. *Human molecular genetics*, 2013; 22: 4241-52.
- Johnson TE. *Caenorhabditis elegans 2007: the premier model for the study of aging*. *Experimental gerontology*, 2008; 43: 1-4.
- Kabat J, Krol P. Focal cortical dysplasia - review. *Pol J Radiol*, 2012; 77: 35-43.
- Kenyon CJ. The genetics of ageing. *Nature*, 2010; 464: 504-12.
- Kiskinis E, Sandoe J, Williams LA, Boulting GL, Moccia R, Wainger BJ, Han S, Peng T, Thams S, Mikkilineni S, Mellin C, Merkle FT, Davis-Dusenbery BN, Ziller M, Oakley D, Ichida J, Di Costanzo S, Atwater N, Maeder ML, Goodwin MJ, Nimesh J, Handsaker RE, Paull D, Noggle S, McCarroll SA, Joung JK, Woolf CJ, Brown RH, Eggan K. Pathways disrupted in human ALS motor neurons identified through genetic correction of mutant SOD1. *Cell stem cell*, 2014; 14: 781-95.
- Kuzniecky R. Epilepsy and malformations of cortical development: new developments. *Current opinion in neurology*, 2015; 28: 151-7.

- Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurles ME, Homfray T, Penninger JM, Jackson AP, Knoblich JA. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, 2013; 501: 373-9.
- Lee G, Papapetrou EP, Kim H, Chambers SM, Tomishima MJ, Fasano CA, Ganat YM, Menon J, Shimizu F, Viale A, Tabar V, Sadelain M, Studer L. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature*, 2009; 461: 402-6.
- Lee P, Martin NT, Nakamura K, Azghadi S, Amiri M, Ben-David U, Perlman S, Gatti RA, Hu H, Lowry WE. SMRT compounds abrogate cellular phenotypes of ataxia telangiectasia in neural derivatives of patient-specific hiPSCs. *Nature communications*, 2013; 4: 1824.
- Li HO, Zhu YF, Asakawa M, Kuma H, Hirata T, Ueda Y, Lee YS, Fukumura M, Iida A, Kato A, Nagai Y, Hasegawa M. A cytoplasmic RNA vector derived from nontransmissible Sendai virus with efficient gene transfer and expression. *Journal of virology*, 2000; 74: 6564-9.
- Livide G, Patriarchi T, Amenduni M, Amabile S, Yasui D, Calcagno E, Lo Rizzo C, De Falco G, Ulivieri C, Ariani F, Mari F, Mencarelli MA, Hell JW, Renieri A, Meloni I. GluD1 is a common altered player in neuronal differentiation from both MECP2-mutated and CDKL5-mutated iPSC cells. *European journal of human genetics : EJHG*, 2015; 23: 195-201.
- Luo Y, Fan Y, Zhou B, Xu Z, Chen Y, Sun X. Generation of induced pluripotent stem cells from skin fibroblasts of a patient with olivopontocerebellar atrophy. *Tohoku J Exp Med*, 2012; 226: 151-9.
- Marchetto MC, Carromeu C, Acab A, Yu D, Yeo GW, Mu Y, Chen G, Gage FH, Muotri AR. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell*, 2010; 143: 527-39.
- Marinowic DR, Domingues MF, Machado DC, DaCosta JC. The expression of pluripotency genes and neuronal markers after neurodifferentiation in fibroblasts co-cultured with human umbilical cord blood mononuclear cells. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, 2015; 51: 26-35.
- Mekhoubad S, Bock C, de Boer AS, Kiskinis E, Meissner A, Eggan K. Erosion of dosage compensation impacts human iPSC disease modeling. *Cell stem cell*, 2012; 10: 595-609.
- Palmini A, Najm I, Avanzini G, Babb T, Guerrini R, Foldvary-Schaefer N, Jackson G, Luders HO, Prayson R, Spreafico R, Vinters HV. Terminology and classification of the cortical dysplasias. *Neurology*, 2004; 62: S2-8.
- Parent JM, Anderson SA. Reprogramming patient-derived cells to study the epilepsies. *Nature neuroscience*, 2015; 18: 360-6.
- Paulsen Bda S, de Moraes Maciel R, Galina A, Souza da Silveira M, dos Santos Souza C, Drummond H, Nascimento Pozzatto E, Silva H, Jr., Chicaybam L, Massuda R, Setti-Perdigao P, Bonamino M, Belmonte-de-Abreu PS, Castro NG, Brentani H, Rehen SK. Altered oxygen metabolism associated to neurogenesis of induced pluripotent stem cells derived from a schizophrenic patient. *Cell transplantation*, 2012; 21: 1547-59.
- Prayson RA, Spreafico R, Vinters HV. Pathologic characteristics of the cortical dysplasias. *Neurosurgery clinics of North America*, 2002; 13: 17-25, vii.
- Reinhardt P, Schmid B, Burbulla LF, Schondorf DC, Wagner L, Glatza M, Hoing S, Hargus G, Heck SA, Dhingra A, Wu G, Muller S, Brockmann K, Kluba T, Maisel M, Kruger R, Berg D, Tsytsyura Y, Thiel CS, Psathaki OE, Klingauf J, Kuhlmann T, Klewin M, Muller H, Gasser T, Scholer HR, Sternecker J. Genetic correction of a

- LRRK2 mutation in human iPSCs links parkinsonian neurodegeneration to ERK-dependent changes in gene expression. *Cell stem cell*, 2013; 12: 354-67.
- Robicsek O, Karry R, Petit I, Salman-Kesner N, Muller FJ, Klein E, Aberdam D, Ben-Shachar D. Abnormal neuronal differentiation and mitochondrial dysfunction in hair follicle-derived induced pluripotent stem cells of schizophrenia patients. *Molecular psychiatry*, 2013; 18: 1067-76.
- Sanders LH, Laganieri J, Cooper O, Mak SK, Vu BJ, Huang YA, Paschon DE, Vangipuram M, Sundararajan R, Urnov FD, Langston JW, Gregory PD, Zhang HS, Greenamyre JT, Isacson O, Schule B. LRRK2 mutations cause mitochondrial DNA damage in iPSC-derived neural cells from Parkinson's disease patients: reversal by gene correction. *Neurobiology of disease*, 2014; 62: 381-6.
- Sareen D, O'Rourke JG, Meera P, Muhammad AK, Grant S, Simpkinson M, Bell S, Carmona S, Ornelas L, Sahabian A, Gendron T, Petrucelli L, Baughn M, Ravits J, Harms MB, Rigo F, Bennett CF, Otis TS, Svendsen CN, Baloh RH. Targeting RNA foci in iPSC-derived motor neurons from ALS patients with a C9ORF72 repeat expansion. *Science translational medicine*, 2013; 5: 208ra149.
- Song B, Sun G, Herszfeld D, Sylvain A, Campanale NV, Hirst CE, Caine S, Parkington HC, Tonta MA, Coleman HA, Short M, Ricardo SD, Reubinoff B, Bernard CC. Neural differentiation of patient specific iPSCs as a novel approach to study the pathophysiology of multiple sclerosis. *Stem Cell Res*, 2012; 8: 259-73.
- Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nature protocols*, 2007a; 2: 3081-9.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007b; 131: 861-72.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006; 126: 663-76.
- Taylor DC, Falconer MA, Bruton CJ, Corsellis JA. Focal dysplasia of the cerebral cortex in epilepsy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 1971; 34: 369-87.
- Tiscornia G, Vivas EL, Matalonga L, Berniakovich I, Barragan Monasterio M, Eguizabal C, Gort L, Gonzalez F, Ortiz Mellet C, Garcia Fernandez JM, Ribes A, Veiga A, Izpisua Belmonte JC. Neuronopathic Gaucher's disease: induced pluripotent stem cells for disease modelling and testing chaperone activity of small compounds. *Human molecular genetics*, 2013; 22: 633-45.
- Wainger BJ, Kiskinis E, Mellin C, Wiskow O, Han SS, Sandoe J, Perez NP, Williams LA, Lee S, Boulting G, Berry JD, Brown RH, Jr., Cudkowicz ME, Bean BP, Eggan K, Woolf CJ. Intrinsic membrane hyperexcitability of amyotrophic lateral sclerosis patient-derived motor neurons. *Cell reports*, 2014; 7: 1-11.
- Williams EC, Zhong X, Mohamed A, Li R, Liu Y, Dong Q, Ananiev GE, Mok JC, Lin BR, Lu J, Chiao C, Cherney R, Li H, Zhang SC, Chang Q. Mutant astrocytes differentiated from Rett syndrome patients-specific iPSCs have adverse effects on wild-type neurons. *Human molecular genetics*, 2014; 23: 2968-80.
- Yagi T, Ito D, Okada Y, Akamatsu W, Nihei Y, Yoshizaki T, Yamanaka S, Okano H, Suzuki N. Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Human molecular genetics*, 2011; 20: 4530-9.
- Yao Y, Cui X, Al-Ramahi I, Sun X, Li B, Hou J, Difiglia M, Palacino J, Wu ZY, Ma L, Botas J, Lu B. A striatal-enriched intronic GPCR modulates huntingtin levels and toxicity. *eLife*, 2015; 4.

Yoon KJ, Nguyen HN, Ursini G, Zhang F, Kim NS, Wen Z, Makri G, Nauen D, Shin JH, Park Y, Chung R, Pekle E, Zhang C, Towe M, Hussaini SM, Lee Y, Rujescu D, St Clair D, Kleinman JE, Hyde TM, Krauss G, Christian KM, Rapoport JL, Weinberger DR, Song H, Ming GL. Modeling a genetic risk for schizophrenia in iPSCs and mice reveals neural stem cell deficits associated with adherens junctions and polarity. *Cell stem cell*, 2014; 15: 79-91.

Zhou J, Blundell J, Ogawa S, Kwon CH, Zhang W, Sinton C, Powell CM, Parada LF. Pharmacological inhibition of mTORC1 suppresses anatomical, cellular, and behavioral abnormalities in neural-specific Pten knock-out mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2009; 29: 1773-83.

12. FIGURES LEGENDS

Figure 1: Ictal EEG recording of Patient #1. Rythmic seizure discharge starting in the right fronto temporal region (highlighted).

Figure 2: MR image of Patient # 1 indicating area of transmantica dysplasia in the right frontal lobe, with vagueness and blurring of the cortico-subcortical interface.

Figure 3: Histopathology of Patient #1.: A: cortex morphology showing delamination of the layers. B. cortical disorganization area with dysmorphic neurons and balloons cells (arrow). C. Reaction immunohistochemistry for Neu-N showing neurons with delamination of the cortical layers. D. Reaction immunohistochemistry for vimentin, marking balloons neurons (arrow).

Figure 4: Ictal EEG of Patient # 2. The recorded EEG discharge started in the left anterior quadrant, with a maximum in the left frontal region (highlighted).

Figure 5: MR image of Patient # 2 showing heterotopic subcortical and periventricular nodules in the left frontal lobe, with vagueness and blurring of the cortico-subcortical interface.

Figure 6: Histopathology of Patient # 2: A: cortex morphology showing delamination of the layers. B. cortical disorganization area with dysmorphic neurons and balloons cells (arrow). C. Reaction immunohistochemistry for Neu-N showing neurons with delamination of the cortical layers. D. Reaction immunohistochemistry for vimentin, marking balloons neurons (arrow).

Figure 7: Immunofluorescence analysis of Akt and mTOR phosphorylation (a) and quantitation (b) of dysplastic sections from patiente # 1 (A) and patient # 2 (B). In (a) anti-nuclear marker (DAPI) is stained in blue, anti-Akt in red, anti-phospho-Akt in

green, anti-mTOR in yellow, and anti-phospho-mTOR in pink. In (b), the graph bars show the area in μm^2 corresponding the positive staining. **:p<0.005; ***: p<0.0005.

Figure 8: Photomicrography of skin fibroblast primary cultures. A: cells grown in culture dish. The arrow shown the skin fragment before the first passage. B: fibroblasts after the sixth passage with confluence suitable for viral transfection.

Figure 9: Photomicrography of cell cultures after viral transfection. A small clone surrounded by few fibroblasts can be observed in A (day 13). After 20 (B) and 25 days (C) of culture, a larger clone with morphological features of embryonic cells were detected but still with fibroblasts. After a passage to a Matrigel support (D), a cell clone free of fibroblasts was obtained. (200X).

Figure 10: Photomicrography of iPS clones by confocal microscopy. Antibody specific to Nanog (green), Oct4 (light brown), Sox2 (red), Tra1-60 (purple), and Tra1-81 (yellow) was used to confirm the embryonic features. (200X).

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

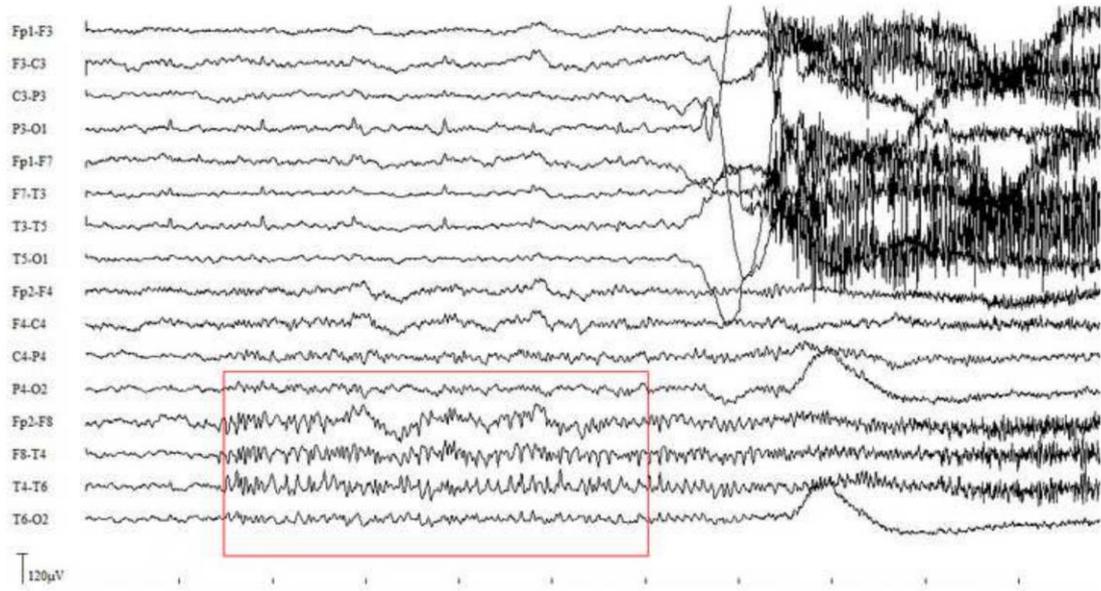


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

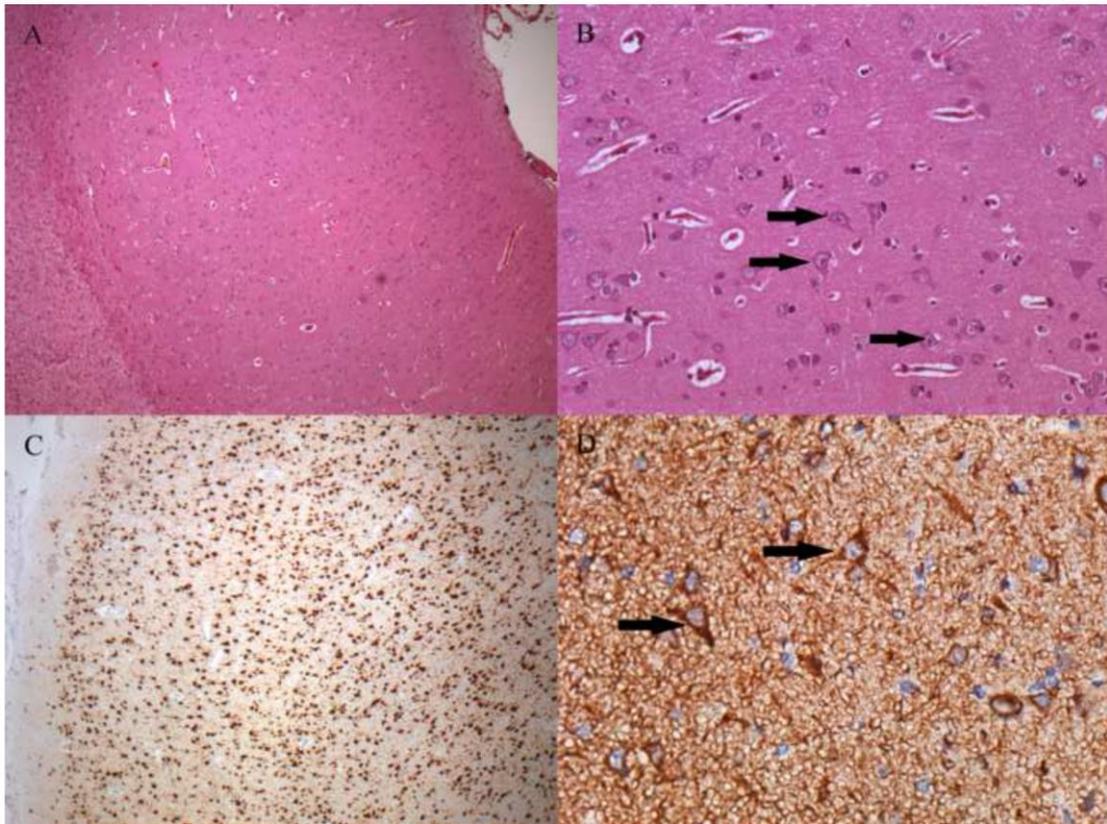


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

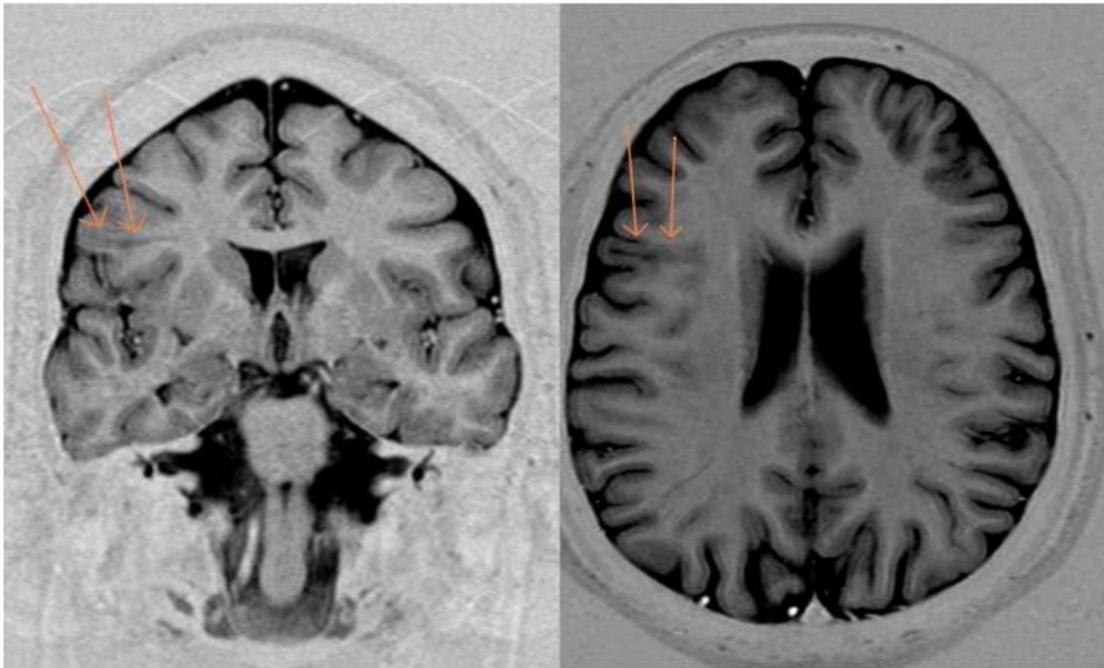


Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)

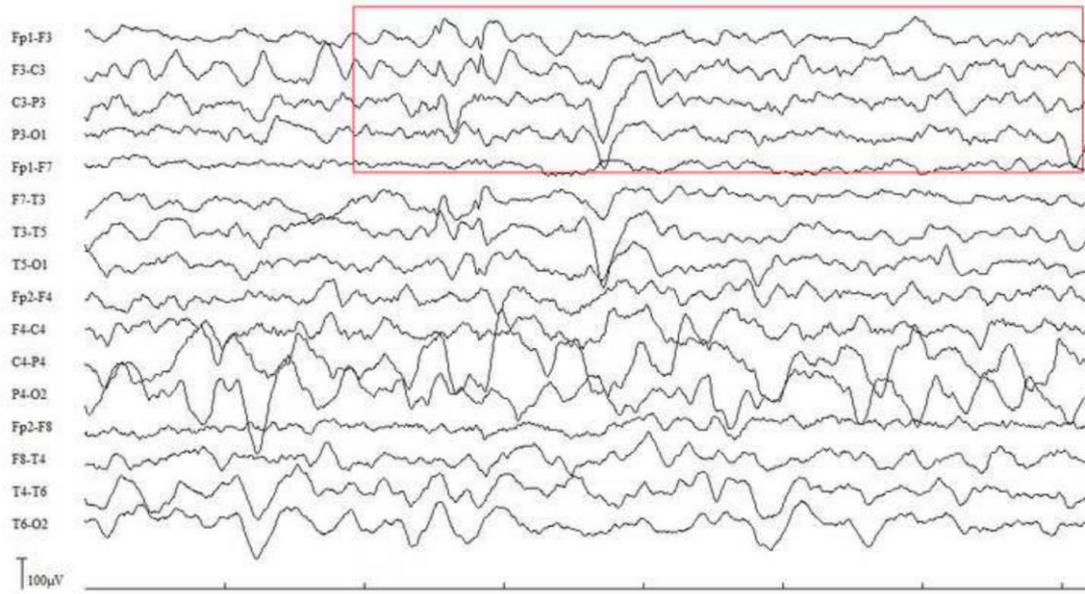


Figure 5
[Click here to download high resolution image](#)

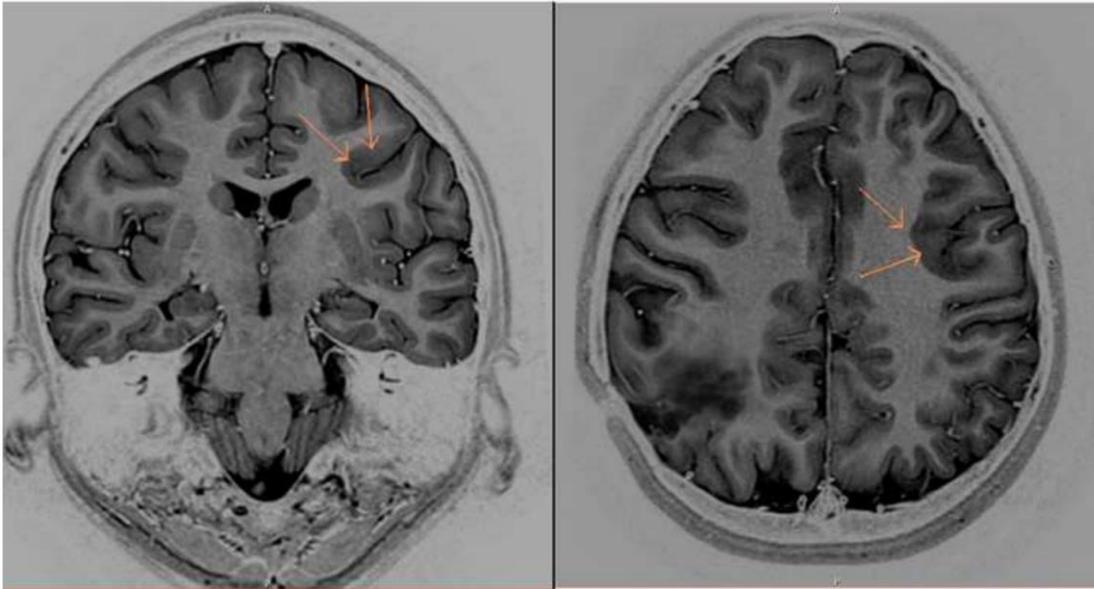


Figure 6
[Click here to download high resolution image](#)

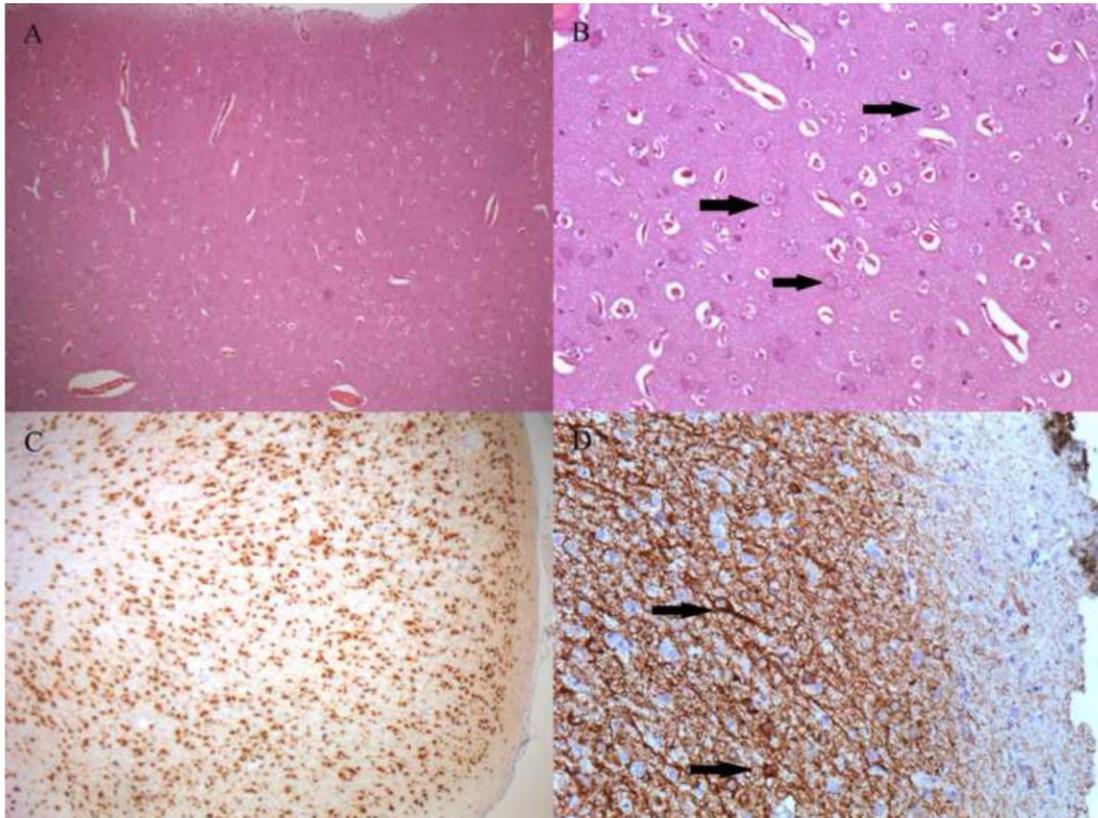


Figure 7
[Click here to download high resolution image](#)

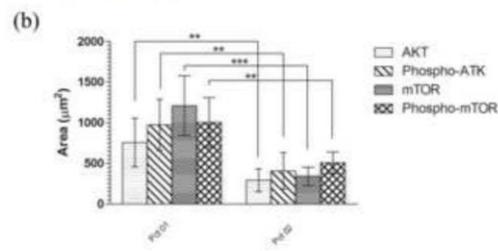
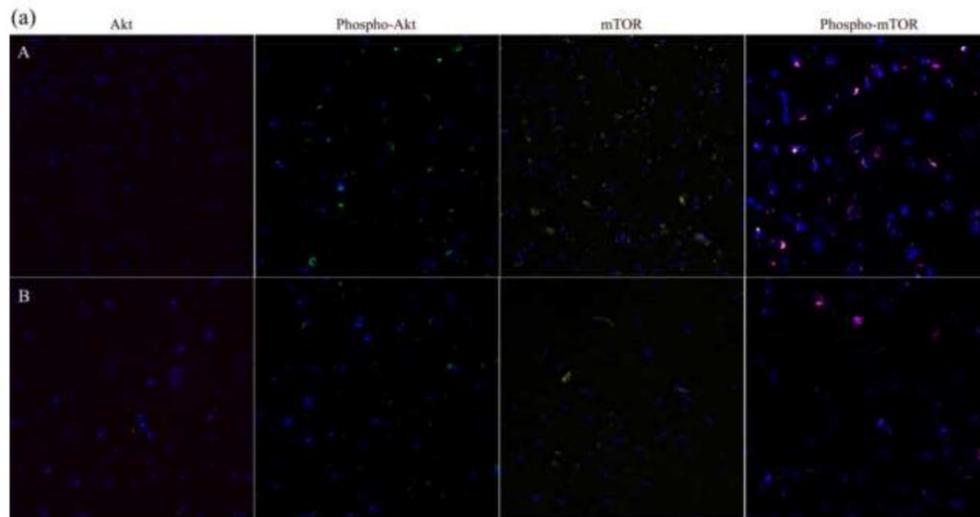


Figure 8
[Click here to download high resolution image](#)

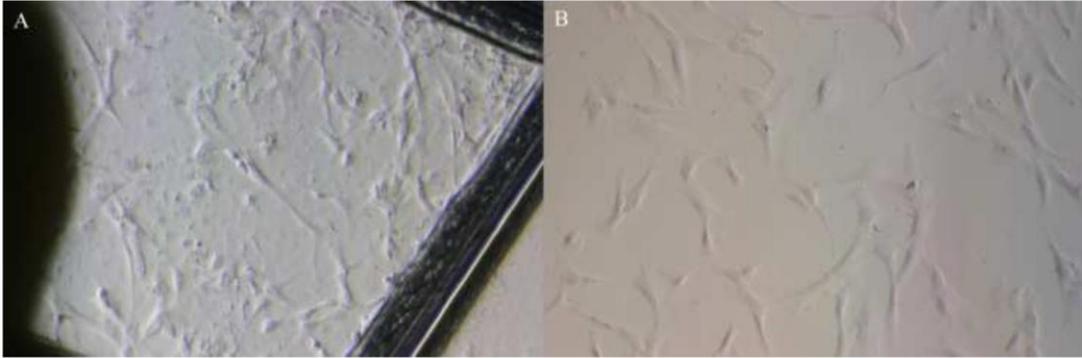


Figure 9
[Click here to download high resolution image](#)

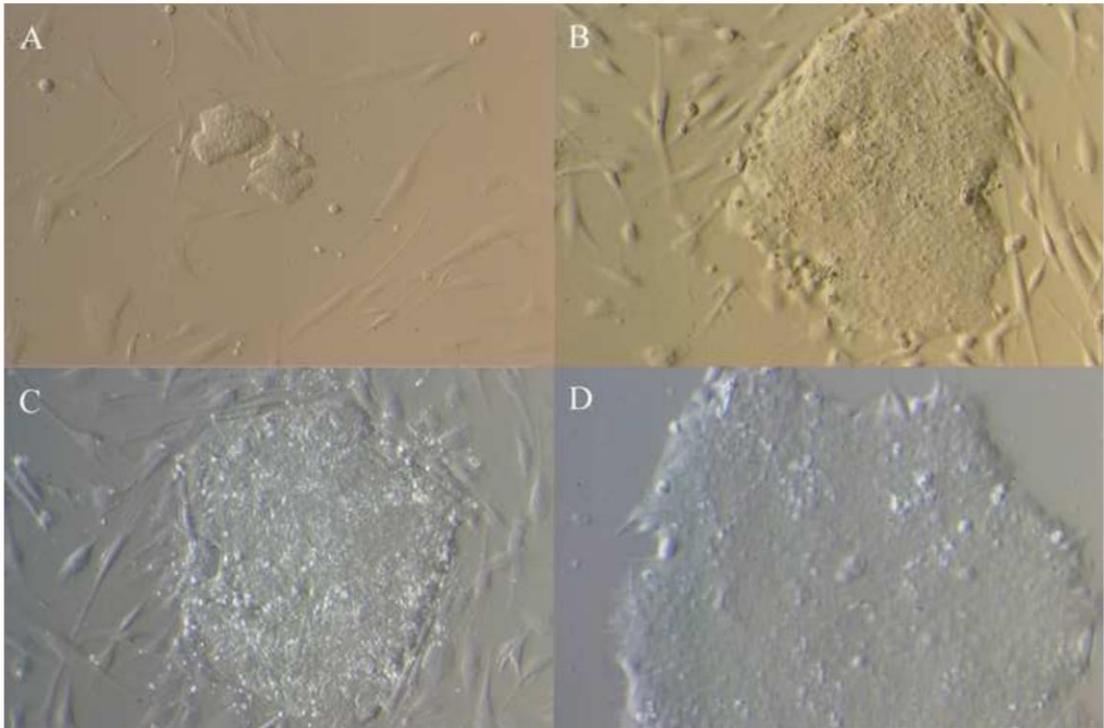


Figure 10
[Click here to download high resolution image](#)

