
**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E
CIÊNCIAS DA SAÚDE
TESE DE DOUTORADO**

SIMONE DENISE SALAMONI

**ESTUDO SOBRE O EFEITO DO TRANSPLANTE DE
CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA NO
MODELO DE EPILEPSIA GENÉTICA NO CAMUNDONGO EL**

**PORTO ALEGRE
2012**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA CONCENTRAÇÃO NEUROCIÊNCIAS**

**ESTUDO SOBRE O EFEITO DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS
MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA NO MODELO DE EPILEPSIA
GENÉTICA NO CAMUNDONGO EL**

**SIMONE DENISE SALAMONI
ORIENTADOR PROF. DR. JADERSON COSTA DA COSTA**

**PORTO ALEGRE
2012**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA CONCENTRAÇÃO NEUROCIÊNCIAS**

**ESTUDO SOBRE O EFEITO DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS
MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA NO MODELO DE EPILEPSIA
GENÉTICA NO CAMUNDONGO EL**

Simone Denise Salamoni

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina da PUCRS, para obtenção de título de doutora em Ciências da Saúde: Neurociências.

**Porto Alegre
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA

S159e Salamoni, Simone Denise

Estudo sobre o efeito do transplante de células mononucleares da medula óssea no modelo de epilepsia genética no camundongo EL / Simone Denise Salamoni. Porto Alegre: PUCRS, 2012.

104p.: gráf. il. tab. Inclui artigo de periódico a ser submetido à publicação.

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa.

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

1. MEDULA ÓSSEA. 2. CÉLULAS MONONUCLEARES/TRANSPLANTE. 3. EPILEPSIA/GENÉTICA. 4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE. 5. MODELOS ANIMAIS DE DOENÇA. 6. SINTOMAS COMPORTAMENTAIS. 7. ELETROFISIOLOGIA. 8. ÉLETROENCEFALOGRAFIA. 9. CRISES CONVULSIVAS/TERAPIA. 10. CÉLULAS-TRONCO. 11. CAMUNDONGOS. 12. PESQUISA BÁSICA. I. COSTA, JADERSON COSTA DA. II. TÍTULO.

C.D.D. 616.8

C.D.U. 616.853:616.71-018.46 (043.2)

N.L.M. WL 385

Rosária Maria Lúcia Prenna Geremia
Bibliotecária CRB 10/196

SIMONE DENISE SALAMONI

**ESTUDO SOBRE O EFEITO DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS
MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA NO MODELO DE EPILEPSIA
GENÉTICA NO CAMUNDONGO EL**

**Tese de doutorado apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Medicina e Ciências da Saúde,
Faculdade de Medicina da PUCRS, para obtenção de
título de doutora em Ciências da Saúde:
Neurociências.**

Aprovado em 05 de março de 2012

Banca Examinadora

Dra. Andréa Luiza Alencar Tavares

Dra. Denise Cantarelli Machado

Dra. Magda Lahorgue Nunes

Dr. André de Castro Dalbem

Dr. Fabrício Simão (suplente)

Dedicatórias

*Aos meus pais, Miriam e Bráulio, pelo amor e dedicação em todos os momentos de
minha vida.*

À minha filha, Natália, por me ensinar o verdadeiro sentido da palavra “amor”.

*Ao meu amor, Paulo Andretta, por todo apoio, amor e compreensão nos
momentos mais difíceis.*

A toda minha família por acreditar em mim.

*Aos meus “grandes amigos” que me ajudaram na conclusão deste trabalho de
alguma forma especial de cada um, meu muito obrigado.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador Dr. Jaderson Costa da Costa por incentivar meu conhecimento e crescimento profissional, pela confiança e amizade durante todos esses anos.

Ao meu colega de trabalho, colaborador do estudo e grande amigo Daniel Marinowic, pelo constante apoio, amizade e profissionalismo.

Aos colaboradores deste estudo e amigos, Ramon Hypolito, Alexandre Dolganov e Gianina Venturin.

Ao grupo Neurolab pelo apoio, amizade e carinho, especialmente a Gleice Reder, Bruno Razzera, Pâmella Azevedo, Michele Domingues, Zuzete Pires, Ricardo Breda

Aos colegas do Instituto de Pesquisas Biomédicas pelo apoio e amizade, especialmente a Marilaine Becker e Carla Rothmann.

Ao Programa de pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde da PUCRS.

*"A coisa mais importante no mundo não é tanto aonde nós chegamos, como em qual
direção estamos nos movendo."*

Oliver Wendall Holmes

RESUMO

Considerando-se a elevada incidência da epilepsia (2-3% da população mundial) e o alto índice de refratariedade ao tratamento com fármacos antiepilépticos disponíveis (20-30%) torna-se fundamental que sejam estudadas e disponibilizadas novas alternativas terapêuticas. Na epilepsia, a exemplo de outros distúrbios do sistema nervoso central, há perda de sub-populações neuronais, o que representa uma consequência importante na patogenia da doença. Estratégias terapêuticas envolvendo o transplante de células-tronco e terapia gênica começam a ser estudadas em modelos experimentais de epilepsia. Entre os modelos experimentais destaca-se o modelo de epilepsia genética do camundongo EL/Suz. Neste modelo, as crises se originam próximos ao lobo parietal e se propagam para as outras regiões do cérebro como o hipocampo. Algumas das manifestações comportamentais que os animais apresentam são as manipulações de crises associadas à estimulação vestibular, sendo que este comportamento é exacerbado com o aumento com a idade do animal. Visando explorar este potencial, nosso estudo se propôs a verificar o efeito da administração de células mononucleares da medula óssea no tratamento da epilepsia genética através da injeção periférica destas células (C57BL/6-EGFP) em camundongos EL/Suz.

O estudo foi distribuído em 4 grupos: I) EL+Controle (C); II) EL+Salina (S); III) EL+Células-Inativadas (CI); IV) EL+Células Mononucleares (CMMO). Os animais foram estimulados desde o nascimento com observação direta das manifestações comportamentais a partir de 30 dias de vida. A observação e a estimulação dos animais foram realizadas uma vez por semana com o movimento de subida e

descida do animal e movimentos pendulares (ir-vir) nas quatro direções. Para verificar a presença de CMMO transplantadas no hipocampo bem como em outras estruturas encefálicas e outros órgãos utilizamos a técnica da *polymerase chain reaction* (PCR). A observação dos grupos pré e pós-transplante foi usada como parâmetro para que se infira que as células mononucleares transplantadas foram capazes de migrar para o tecido nervoso e diminuir o número de crises convulsivas. A contagem do número de crises foi avaliada no período pré e pós-transplante com registro eletroencefalográfico (EEG) nos grupos EL+Salina e EL+CMMO para controle de intensidade das crises. Os registros eletrofisiológicos *in vitro* avaliaram a resposta sináptica utilizando o paradigma de estimulação por pulso pareado em fatias de cérebro.

Nossos resultados mostram uma redução gradual da frequência de crises num período de 240 dias chegando a 50%. Para comparar nossos achados de redução de crises fizemos estudo da atividade elétrica cerebral através do registro EEG onde observamos nos traçados eletroencefalográficos uma intensidade maior da fase ictal no grupo EL+Salina comparado com o grupo EL+CMMO. Observamos que os animais do grupo EL+Salina apresentaram uma excitabilidade neuronal significativamente maior comparado ao grupo controle e o grupo EL+CMMO comprovando o efeito terapêutico das CMMO. No estudo de estímulo condicionante podemos observar que os três grupos apresentaram indução facilitada de potenciação de longa duração (LTP) com uma maior amplitude do potencial pós-sináptico excitatório no grupo EL+Salina.

Com base nos dados obtidos no presente estudo, concluímos que as células mononucleares da medula óssea podem ter efeito terapêutico na epilepsia genética no modelo do camundongo EL/Suz.

ABSTRACT

Considering the high incidence of epilepsy (2-3% of world population) and the high rate of resistance to treatment with available antiepileptic drugs (20-30%) it is essential to be considered and made available new therapeutic options. In epilepsy, like other central nervous system disorders, there is loss of neuronal subpopulations, which represents an important consequence in the pathogenesis of the disease. Therapeutic strategies involving the transplantation of stem cells and gene therapy have been studied in experimental models of epilepsy. The genetic model of EL/Suz epilepsy mouse highlights among the experimental models. In this model, seizures originate close to the parietal lobe and spread to other brain regions such as the hippocampus. Some of the behavioral manifestations that they show are the manipulations of seizures associated with handling and vestibular stimulation, and this behavior is exacerbated by the increase with age of the animal. In order to exploit this potential, our study was to evaluate the effect of administration of bone marrow mononuclear cells in the treatment of genetics epilepsy by peripheral injection of these C57BL/6-EGFP cells in EL/Suz mice. The study was distributed in four groups: I) EL+Control (C), II) EL+Saline (S); III) EL+Bone Marrow Mononuclear Cells Inactivated (BMMCI), IV) EL+Bone Marrow Mononuclear Cells (BMMC). The animals were stimulated from birth with direct observation of behavioral manifestations from 30 days of life. Observation and stimulation of the animals were held once a week with the movement up and down the animal and commuting (go-around) in the four directions. To verify the presence of BMMC transplanted in the hippocampus and other brain structures, other agencies use the technique of polymerase chain reaction (PCR). The observation of the pro-and post-transplant groups was used as a parameter to infer that the transplanted mononuclear cells

were able to migrate to the nerve tissue and reduce the number of seizures. Counting the number of seizures was evaluated in the pre and post-transplant record electroencephalographic (EEG) in groups EL+Saline and EL+BMMC for intensity control of seizures. Electrophysiological recordings in brain slices were done to evaluate the synaptic response using the paradigm of paired pulse stimulation. Our results show a gradual reduction in seizure frequency over a period of 240 days reaching 50%. To compare our findings to reduce crises we study the brain electrical activity by recording EEG in which we observed a higher intensity of ictal phase in EL+Saline group compared with the group EL+BMMC. We observed that the animals in the EL+Saline showed a significantly higher neuronal excitability compared to the control group and EL+BMMC proving the therapeutic effect of BMC. In the study of stimulus condition we saw that the three groups were facilitated induction of long-term potentiation (LTP) with a greater amplitude of excitatory postsynaptic potential in the group EL+Saline. Based on data obtained in this study, we conclude that the mononuclear bone marrow may have therapeutic effect on epilepsy genetics in the mouse model of EL/Suz.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fase inicial da crise do camundongo EL.....	26
Figura 2- Fase ictal do camundongo EL	27
Figura 3 - Pós- ictal do camundongo EL.....	27
Figura 4 - Células-tronco da medula óssea	30
Figura 5 - Transplante de células mononucleares da medula óssea.....	36
Figura 6 - Delineamento experimental dos grupos do estudo	38
Figura 7 – Linha de tempo experimental dos grupos do estudo	38
Figura 8 - Preparo das células-tronco da medula óssea (CMMO).....	40
Figura 9 – Posição dos eletrodos no escalpo do animal.....	38
Figura 10 - Animal com eletrodo e registro com software Morfeu-bio.....	45
Figura 11 - Equipamento eletrofisiológico.....	47
Figura 12 - Fatiamento (Vibroslice)	48
Figura 13 - Câmara de interface	49
Figura 14- Esquema mostrando fatia de hipocampo com eletrodos.....	50
Figura 15 - Protocolo de linha de base	50
Figura 16 - Registro extracelular de campo.....	52
Figura 17 - Protocolo de indução de LTP	53
Figura 18- Citometria de fluxo para imunofenotipagem das CMMO.....	55

Figura 19 - Fotografia dos produtos da PCR para o gene GFP.....	56
Figura 20 - Fotografia dos produtos da PCR 120 dias após o transplante.....	56
Figura 21 - Contagem do número de crises	58
Figura 22 - Média do número de crises avaliada por mês	59
Figura 23 - Comportamento das crises em relação ao tempo de tratamento	60
Figura 24 - Percentual de redução de crises.....	61
Figura 25 - Registro ictal pós estímulo de camundongo EL+Salina.....	62
Figura 26 - Registro ictal pós estímulo de camundongo EL+CMMO	62
Figura 27 - Gráfico identificando a linha de base..	64
Figura 28 - EPSP por pulso pareado para estudo da excitabilidade neuronal.....	65
Figura 29 - Potencial pós-sináptico excitatório após estímulo condicionante.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Contagem geral do número de crises.....	57
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ACFS	Líquido cefalorraquidiano artificial (Artificial Cerebrospinal Fluid)
BHE	Barreira hematoencefálica
CA	<i>Cornu ammonis</i>
CER	Crises espontâneas recorrentes
CI	Células Inativadas
CMMO	Células mononucleares da medula óssea
CT	Células-tronco
CTMO	Células-tronco da medula óssea
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC	Extracelular
EEG	Eletroencefalograma
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
ELT	Epilepsia do lobo temporal
EMT	Esclerose mesial temporal
EPSP	Potencial pós-sináptico excitatório
GABA	Ácido gama-amino butírico
GD	Giro denteado
IC	Intracelular
ISI	Intervalo inter-estímulos (<i>Interstimulus interval</i>)
LTD	Depressão de longa duração (<i>Long-term depression</i>)
LTP	Potenciação de longa duração (<i>Long-term potentiation</i>)
MO	Medula óssea
MTT	Sal de Tetrazólio (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
Ne	Neurônio
NMDA	N-metil-D-aspartato
PCR	Reação em cadeia de polimerase
Pm	Potencial de membrana
PPR	Relação pulso pareado (<i>Paired-pulse ratio</i>)
PPD	Depressão pulso pareado (<i>Paired-pulse depression</i>)
PPF	Facilitação pulso pareado (<i>Paired-pulse facilitation</i>)
PS	População de espículas (<i>Population spike</i>)
RN	Ringer normal

SCER Sem crises espontâneas recorrentes

SE *Status epilepticus*

SNC Sistema nervoso central

SS Solução salina

SUMÁRIO

1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
1.1 EPILEPSIA	19
1.2 EPILEPSIA GENÉTICA.....	21
1.3 MODELOS EXPERIMENTAIS	23
1.4 CAMUNDONGO EL/SUZ	24
1.5 CÉLULAS-TRONCO	29
1.6 OBJETIVOS	34
1.6.1 Objetivo geral	34
1.6.2 Objetivo específicos	34
2 MATERIAIS E MÉTODOS	35
2.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	35
2.2 ANIMAIS.....	35
2.3 TRANSPLANTE	36
2.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	37
2.5 OBTENÇÃO E PREPARO DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA (CMMO).....	39
2.6 CARACTERIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES CELULARES PRESENTES NA MEDULA ÓSSEA	40
2.7 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS	41
2.8 CRITÉRIO DE INCLUSÃO E AVALIAÇÃO DE CRISE DO CAMUNDONGO EL/SUZ	43
2.9 REGISTRO ELETRENCEFALOGRÁFICO (EEG).....	44
2.10 REGISTRO ELETROFISIOLÓGICO IN VITRO.....	45
2.11 FATIAS CEREBRAIS (“BRAIN SLICES”).....	47
2.12 EXCITABILIDADE NEURONAL ATRAVÉS DE PULSO PAREADO	49
2.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
3 RESULTADOS	54

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DO SANGUE DE MEDULA ÓSSEA	54
3.2 DETECÇÃO POR PCR DA PRESENÇA DE EGFP+ DAS CMMO TRANSPLANTADAS NOS CAMUNDONGOS EL/SUZ EM DIFERENTES PERÍODOS DE TRANSPLANTE.....	55
3.3 O TRATAMENTO COM CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA TEM O POTENCIAL DE DIMINUIR OU CESSAR AS CRISES CONVULSIVAS DE CAMUNDONGOS EL/SUZ	57
3.4 REGISTRO ENCEFALOGRAFICO (EEG) PÓS-TRANSPLANTE PARA CARACTERIZAR A INTENSIDADE DAS CRISES CONVULSIVAS NOS GRUPOS TRATADOS.....	61
3.5 O TRATAMENTO COM CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA APRESENTAM DIFERENÇA NA EXCITABILIDADE NEURONAL ATRAVÉS DE PULSO PAREADO	63
4 DISCUSSÃO	67
5 CONCLUSÕES	73
6 PERSPECTIVAS	74
7 REFERÊNCIAS	75
8 ANEXOS	75
8.1 CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	80
8.2 ARTIGO SUBMETIDO A REVISTA CIENTÍFICA.....	81

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 EPILEPSIA

Epilepsia é um tipo de disfunção cerebral caracterizada clinicamente por alterações comportamentais súbitas (crises epiléticas) que tendem a se repetir ao longo da vida do paciente e que afeta de 2% a 3% da população mundial. O tratamento medicamentoso é realizado com fármacos antiepiléticos, mas, infelizmente, aproximadamente 30% dos pacientes não respondem a esta terapêutica, tornando-se refratários ao tratamento (LOSCHER, 2002b). Essas crises refletem a atividade elétrica anormal e paroxística, acometendo preferencialmente uma ou várias áreas do cérebro e podem ser causadas por inúmeras patologias estruturais ou neuroquímicas. Há, portanto, uma diferença entre definição de epilepsia e de crise epilética. Em geral o diagnóstico de epilepsia implica uma anormalidade epileptogênica persistente do cérebro, provocando crises recorrentes e espontâneas. Em contraposição, pessoas sem epilepsia podem apresentar convulsão provocada por atividade elétrica anormal como resposta isolada do cérebro a um insulto transitório ou a perda de homeostase (ZIELINSKI, 1988).

Assim, epilepsia presume a existência de uma anormalidade epileptogênica intrínseca, endógena ao próprio cérebro e que está presente mesmo entre as crises, independente de qualquer condição ou insulto agudo. Esta propriedade do “cérebro epilético” pode gerar crises recorrentes durante um período de tempo relativamente curto, ou durante muitos anos, ou mesmo durante toda a vida do indivíduo (GASTAUT, 1973). A atividade epilética cerebral pode ser desencadeada por diversos fatores, e por isso a epilepsia é considerada uma disfunção complexa e multifatorial. Existem duas categorias etiológicas básicas: a) distúrbio epileptogênico

específico, que gera epilepsia em indivíduos susceptíveis; b) fatores precipitantes, que são perturbações endógenas ou exógenas e que evocam crises epiléticas agudas em determinados períodos de tempo. Os distúrbios epileptogênicos específicos podem ser lesões como trauma, infecção, neoplasia, malformação vascular, malformações congênitas e anormalidades genéticas, como mutações gênicas pontuais ou aberrações cromossômicas. Nos casos em que é possível tratar esses distúrbios (remoção cirúrgica de neoplasia), a condição epilética é abolida. É interessante notar que várias vias celulares associadas a esses insultos, tais como, morte celular, reorganização axonal, inflamação e astrogliose, também ocorrem de forma secundária às crises recorrentes. Portanto, as próprias crises epiléticas, potencialmente, poderiam perpetuar ou agravar em maior ou menor grau, o processo epileptogênico (SANDER, 1999).

A natureza do distúrbio epileptogênico é essencial para classificação etiológica das epilepsias. Neste sentido, as epilepsias generalizadas e focais têm sido classificadas em sintomáticas, idiopáticas ou provavelmente sintomáticas. As epilepsias sintomáticas são aquelas em que é possível a detecção de lesões anatômicas ou histológicas. Quando não é possível a detecção da disfunção primária da epilepsia sintomática, esta é denominada “provavelmente sintomática” (criptogênica) (ENGEL, 2001). Nas epilepsias idiopáticas, por sua vez, o processo da epileptogênese não é atribuído a nenhum insulto endógeno ou exógeno específico. Neste caso diz-se que a epilepsia é própria do indivíduo. Hoje se sabe que a maioria das epilepsias idiopáticas é causada por mutações genéticas (GASTAUT, 1975).

1.2 EPILEPSIA GENÉTICA

A Classificação das Epilepsias e Síndromes Epilépticas, proposta pela Liga Internacional de Epilepsia - ILAE (*International League Against Epilepsy*) divide as epilepsias em idiopáticas, sintomáticas e criptogênicas (GASTAUT, 1975; ENGEL, 2006). O grupo das epilepsias idiopáticas corresponde a aproximadamente 50% do total das epilepsias humanas (BERKOVIC *et al.*, 1999). É nas epilepsias idiopáticas que a predisposição genética se apresenta de maneira mais marcada. Inicialmente, acreditava-se que as epilepsias idiopáticas generalizadas apresentavam um forte componente genético, mas que as epilepsias parciais eram predominantemente causadas por fatores ambientais. Desde os primórdios da medicina muito se tem especulado sobre a base genética das epilepsias. Nos anos 50 e 60 vários estudos epidemiológicos demonstraram as primeiras evidências científicas para uma predisposição genética nas várias formas de epilepsia (ROMCY-PEREIRA *et al.*, 2008).

Nos anos 70, Andermann (1982) propôs o modelo multifatorial para as epilepsias, no qual fatores genéticos e ambientais interagem na determinação dos riscos de recorrência familiar da doença. Atualmente, as epilepsias, particularmente idiopáticas, são vistas como doenças complexas do ponto de vista da herança genética. Com os avanços recentes da biologia molecular as teorias sobre genes implicados na transmissão das epilepsias poderão ser comprovadas experimentalmente. Além disso, interações entre múltiplos genes e fatores ambientais poderão ser melhor investigadas. Muitos dos aproximadamente 30 mil genes humanos podem estar associados à epilepsia por meio de alterações genéticas ou de alterações na expressão gênica. As alterações gênicas são aquelas que ocorrem na estrutura física do gene, como as mutações ou polimorfismos, e

contribuem para a epileptogênese agindo diretamente como causa primária ou indiretamente, no estabelecimento do limiar de susceptibilidade. Este tipo de alteração, transmitida hereditariamente, reflete mudanças nos níveis ou na localização dos produtos gênicos e é deflagrada por insultos epileptogênicos. Em contrapartida, a modulação da expressão gênica influencia a atividade dos transcritos e proteínas codificadas, mesmo na ausência de modificações físicas no DNA. Esse tipo de modulação pode alterar os níveis ou localização de mRNAs e proteínas, deflagradas por insultos epileptogênicos (BERKOVIC *et al.*, 1999). Desta forma, alterações na expressão gênica são uma das principais respostas do tecido cerebral a tais insultos (ROMCY-PEREIRA *et al.*, 2008). Atualmente, as abordagens de investigação baseiam-se na análise individual da expressão de genes isolados, selecionados de acordo com determinada funcionalidade, ou na análise de expressão de múltiplos genes simultaneamente, não diretamente relacionados ao processo de hiperexcitabilidade neuronal.

Em modelos experimentais de epilepsia, a maior parte dos trabalhos concentra-se na análise da expressão gênica em períodos específicos depois da geração do insulto convulsivo (ELLIOTT *et al.*, 2004). O período entre 1-2 semanas após o insulto inicial compreende o período de latência, ou seja, imediatamente anterior ao aparecimento das crises espontâneas. Já no período crônico ocorrem modificações que estariam estabelecidas pelo processo epileptogênico, refletindo o perfil molecular do tecido cerebral frente a crises espontâneas recorrentes (CERs). Diversos estudos têm verificado que as crises epilépticas induzem no hipocampo alteração da expressão de genes que codificam proteínas de receptores metabotrópicos e ionotrópicos de glutamato, enzimas que participam da síntese de

GABA, transportadores de glutamato, neuropeptídeos pró e anticonvulsivantes e neurotrofinas e seus receptores. Isso possibilitará avanços importantes no entendimento dos mecanismos básicos responsáveis pela epileptogênese, o que por sua vez poderá resultar em terapêutica mais específica e eficiente (ELLIOTT *et al.*, 2004; LEPPERT *et al.*, 1993).

1.3 MODELOS EXPERIMENTAIS

Existem numerosos modelos animais de epilepsia ou de crises epiléticas. Os principais induzem uma cascata de eventos moleculares e estruturais que resultam em modificações nas propriedades neuronais intrínsecas, bem como nas redes neuronais, tornando-as epileptogênicas. Nos modelos denominados agudos, o animal apresenta crises convulsivas somente durante a ação do agente indutor, enquanto que nos modelos ditos crônicos as crises ocorrem a intervalos variados de tempo após a indução, podendo acompanhar toda a vida do animal (SANABRIA; CAVALHEIRO, 2000).

Em modelos crônicos temos os de epilepsia adquirida (sintomática) e os modelos genéticos. A primeira categoria inclui os modelos nos quais a epilepsia é induzida por métodos químicos ou elétricos em animais previamente saudáveis (não epiléticos), geralmente ratos (CAVALHEIRO *et al.*, 1991). Já os modelos genéticos podem ser subdivididos em aqueles que empregam animais com mutações espontâneas ou animais com mutações induzidas, como camundongos transgênicos ou camundongos nos quais um ou mais genes é retirado do genoma (*knockout*) (SUZUKI, 2004).

A epilepsia pode ser estudada *in vivo* com modelos experimentais e *in vitro* utilizando fatias cerebrais. As preparações de fatias de cérebro (*brain slices*) foram desenvolvidas por McIlmwin e colaboradores, com o intuito de estudar a bioquímica do sistema nervoso central (SNC), no entanto, esse procedimento se expandiu para o estudo dos mecanismos básicos das epilepsias, especificamente no estudo da epilepsia do lobo temporal. Assim, a atividade epileptiforme pode ser estudada *in vitro* utilizando-se fatias de cérebro associadas com registros eletrofisiológicos (MACLLMWAIN *et al.*, 1953).

1.4 CAMUNDONGO EL/SUZ

Entre os modelos de epilepsia genética utilizados destaca-se o modelo do camundongo EL/SuzSeyFrkJ, genótipo Tyr^c/Tyr^c , uma cepa pura de modelo poligênico para o estudo da epilepsia (SUZUKI, 2004).

O camundongo EL foi descrito em 1954 por investigadores Japoneses estudando o hidrocefalo. O relatório original descreveu uma raça congênita mutante derivada dos camundongos DDY (a “raça mãe”) que experimentou as crises tônico-clônicas induzidas pela estimulação vestibular (agitação). O camundongo EL foi registrado internacionalmente como um mutante epiléptico em 1964 (JOSEPH *et al.*, 1989).

A tendência de crises no EL é herdada fenomenologicamente por um traço autossômico dominante. A herança do EL é poligênica e estão envolvidos pelo menos dois genes: EL-1, que se localiza na região distal do centrômero sobre o cromossomo 9, e EL-2 no cromossomo 2. Além disso, vários fatores de risco

circundantes parecem influenciar o desenvolvimento da suscetibilidade das crises nos EL (RISE *et al.*, 1991).

Neste modelo a ictogenese foi estabelecida cerca de 10 semanas de idade, enquanto a epileptogênese foi estabelecida através das repetidas convulsões durante o seu desenvolvimento. A fragmentação do DNA leva a apoptose no tecido e a suscetibilidade dos neurônios do hipocampo aumenta depois de convulsões repetitivas durante o período final do desenvolvimento, provavelmente devido ao desequilíbrio entre mecanismo de proteção e inativação de vias proapoptóticas (MURASHIMA *et al.*, 2004).

As crises do camundongo EL/Suz se originam próximas ao lobo parietal e se propagam para as outras regiões do cérebro, como o hipocampo. As crises espontâneas recorrentes se manifestam em torno dos 80-100 dias de vida e são também acompanhadas por anormalidades no EEG, vocalização, incontinência, perda do equilíbrio postural, aumento da salivação e automatismos faciais. Manipulações do animal e estimulação vestibular provocam a manifestação das crises e sua incidência aumenta com a idade do animal. Em animais mais jovens, as crises podem ser induzidas através de estimulação rítmica (SUZUKI, 2004).

As crises do EL são evocadas por estimulação sensorial arremessando o camundongo para cima no ar, ou sujeitando a uma rápida aceleração. Embora desenvolvam predisposição genética, há necessidade de estímulos provocativo no EL, uma vez por semana, para desencadear as crises. A incidência das crises aumenta com a repetição de estímulos, e a prevalência, após a estimulação alcançar eventualmente 100% (SUZUKI *et al.*, 1982).

Depois de um longo período sem estimulação, o limiar da crise de um EL, tende a aumentar, ou há extinção das crises. Após a estimulação ser recomeçada e repetida, como previamente, as crises são induzidas novamente em quase todos os animais. Entretanto, depois de 14 semanas de ausência de estimulação, nenhuma crise ocorre depois da primeira estimulação, mas o reaparecimento e a diminuição do limiar das crises se desenvolvem mais rápido do que em outros animais. A ocorrência das crises nos EL necessita de estimulação reforçada e é afetada por certos tipos de experiências ou memória de estímulo ou pela crise antecedente (SUZUKI *et al.*, 1982; IMAIZUMI *et al.*, 1959).

As crises do camundongo EL têm três fases definidas: prodromais, ictais e pós-ictais (Figuras 1, 2, 3).



Figura 1- Fase inicial da crise caracterizada com rangido, imobilidade transitória e ataques de corrida.



Figura 2- Fase ictal com cauda curvada sobre a cabeça, perda de equilíbrio e convulsão generalizada tônico-clônica.



Figura 3 – A fase pós-ictal apresenta letargia, postura de canguru com movimentos giratórios de cabeça e uma hiperirritabilidade motora ao manuseio.

Aparentemente qualquer estimulação vestibular rítmica como a agitação, o balanço, o movimento de ir-e-vir horizontal, o movimento pendular ou a rotação alternadamente é suficiente para induzir crises, mas a rotação unidirecional falha em produzir convulsões. Imaizumi e colaboradores perceberam que se os camundongos EL recebessem estimulação vestibular semanal (30 “agitações” 1/15

cm verticalmente) durante um período de tempo de desenvolvimento de 5-8 semanas de idade, os camundongos adultos começariam a ter convulsões na idade de 7-8 semanas e pela idade de 10 semanas teriam convulsões regularmente na aplicação de estimulação vestibular apropriada. Além disso, se os camundongos EL não são estimulados durante este período de desenvolvimento, alguns camundongos adultos ainda exibirão convulsões se propriamente estimulados (IMAIZUMI *et al.*, 1959).

Suzuki e colaboradores perceberam que com a idade muitos camundongos EL terão uma crise quando colocados em uma gaiola de isolamento e observados por 3 min antes da estimulação vestibular (então chamados “crises espontâneas”) (SUZUKI, 2004). Naruse e colaboradores relataram que a duração média da crise do primeiro rangido até o último movimento convulsivo entre os 22 animais foi de 16s (NARUSE *et al.*, 1960). Os animais exibiram um período refratário durante o qual qualquer estímulo foi ineficaz ao provocar crises futuras. O período refratário variou de animal para animal, e em todos os casos foi de pelo menos 30 minutos. Os camundongos de ambos os sexos evidenciam convulsões igualmente e a gravidez não tem efeito nas convulsões. A tendência de camundongos terem uma crise não diminui com a idade; de fato, com a idade, o camundongo frequentemente requer menos estimulação progressivamente para ter convulsões (IMAIZUMI *et al.*, 1959).

1.5 CÉLULAS-TRONCO

Estratégias terapêuticas envolvendo o transplante de células-tronco da medula óssea e terapia gênica começam a ser estudada em modelos experimentais de epilepsia. Entre elas estão o uso células neurais fetais, células liberadoras de adenosina, células produtoras de GABA e células-tronco neurais (HAAS *et al.*, 2005).

Dado que a medula óssea é uma fonte permanente de células-tronco adultas e possivelmente pluripotentes é possível que o transplante destas tenha como consequência o restabelecimento da excitabilidade neuronal fisiológica, bem por sua diferenciação ou por outros mecanismos biológicos, tais como fusão celular ou a secreção de fatores tróficos. Logo, pode-se afirmar que há um potencial muito grande para a terapia com células-tronco no tratamento das epilepsias refratárias, principalmente para aquelas que têm um curso progressivo pela frequência de crises associada à polifarmácia (MCKAY, 2004).

Dentro desse panorama, torna-se fundamental o entendimento do processo epileptogênico e, por conseguinte, abrem-se perspectivas para ações preventivas e intervenções terapêuticas mais efetivas, como tratamento com células-tronco.

As células-tronco representam uma unidade natural do desenvolvimento embrionário e da reparação tecidual e é um subconjunto de células imaturas, indiferenciadas e não especializadas. Estas células apresentam a capacidade tanto de se auto-regenerar, ou seja, dividir-se e criar outras células-tronco, quanto de se diferenciar através de uma determinada via molecular e originar diferentes linhagens celulares. As células-tronco embrionárias são totipotentes, isto é, têm o privilégio de

poder escolher entre a maioria, senão todas, as vias de diferenciação. As células-tronco adultas ou somáticas são responsáveis pelo reabastecimento tecidual ao longo da vida e estão presentes na maioria dos tecidos, tais como, o sangue, a pele, o fígado, o coração e o cérebro (MORRISON *et al.*, 1997) (Figura 4).

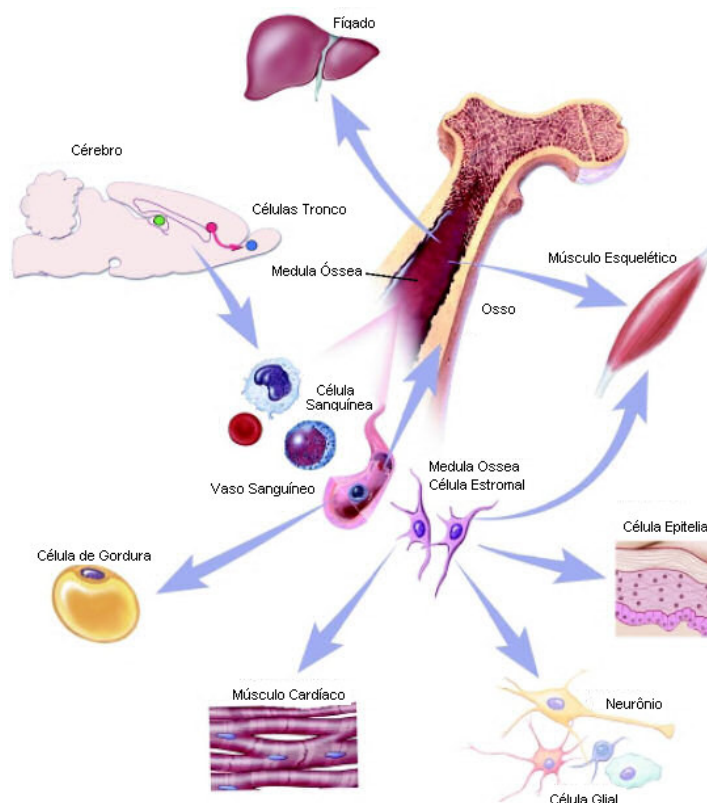


Figura 4 - Células-tronco da medula óssea

Os grandes avanços nas áreas de genética e biologia molecular devem trazer consigo grandes mudanças na medicina. Com a expansão do conhecimento acerca das células-tronco e a possibilidade de que elas possam diferenciar-se nos mais diversos tecidos, é natural que haja grande interesse quanto à sua utilização terapêutica, como no tratamento de doenças do sistema nervoso. Muitos grupos têm

estudado a alternativa do uso de células-tronco na clínica, estimulados por evidências que apontam recuperação em modelos animais de doenças neurodegenerativas (MENDEZ-OTERO *et al.*, 2005; MCKAY, 2004).

Estudos recentes têm demonstrado que o transplante de células-tronco melhora a função cerebral fisiológica em modelos de isquemia cerebral, doença de Huntington e traumatismo raquimedular (DUNNETT *et al.*, 2004; KODA *et al.*, 2005). Kim e colaboradores observaram melhora dos sintomas parkinsonianos em ratos que receberam células-tronco embrionárias neurais, com a geração de neurônios dopaminérgicos que detinham propriedades eletrofisiológicas e bioquímicas semelhantes às células mesencefálicas não-transplantadas (KIM *et al.*, 2003). Mais, estudos recentes têm demonstrado a capacidade de diferenciação das células-tronco da medula óssea (CTMO) em progenitores celulares com características de células de Schwann, capazes de apoiar a regeneração em nervos ciáticos de ratos lesados após três semanas do transplante (MIMURA *et al.*, 2004). Mimura e colaboradores demonstraram em ratos adultos com nervos ciáticos seccionados um aumento significativo na velocidade de condução e no índice de escala funcional para nervo ciático no grupo transplantado com células-tronco comparado ao grupo controle não transplantado após seis meses (DEZAWA *et al.*, 2001). Outros dados indicam que CTMO migram da corrente sanguínea para a área isquêmica e, uma percentagem pequena delas, expressa marcadores neurais (LI *et al.*, 2001).

A medula óssea (MO) é uma fonte permanente de células-tronco contendo três tipos de populações de células-tronco: hematopoiéticas, estromais (mesenquimais) e possivelmente progenitoras endoteliais. Já foi demonstrado que células da medula óssea de camundongos podem derivar-se em microglia, e

neurônios *in vivo* (AZIZI *et al.*, 1998). Porém, ainda não se sabe qual sub-população da medula óssea foi capaz de expressar este desenvolvimento neuronal. Além disso, a transdiferenciação de CTMO em neurônios no sistema nervoso central foi também demonstrada em seres humanos. Parece que a incorporação destas células no tecido nervoso é intensificada frente a um dano tecidual. Ainda, mesmo que estas células não regeneram o tecido lesado por transdiferenciarem-se em determinado tipo celular, é provável que a recuperação de funções cerebrais ou estabilização da doença neurológica ocorra por outros mecanismos biológicos tais como a fusão celular, a liberação de fatores tróficos, citocinas ou ativação de células endógenas (EGLITIS *et al.*, 1999; COGLE *et al.*, 2004; COSTA-FERRO *et al.*, 2011).

As vantagens em se estudar células-tronco adultas em contraste com as embrionárias incluem a maior facilidade de obtenção das primeiras, sendo que as células-tronco da MO podem ainda ser obtidas em maior quantidade (ideal para aplicação clínica) do que as demais células-tronco adultas. Ainda mais, elas podem ser obtidas a partir de uma pequena amostra de MO de um dado paciente, expandidas em cultura, e re-administradas a este mesmo paciente. Assim, seria possível evitar problemas associados com a rejeição imunológica dos tecidos ou células transplantadas (HAAS *et al.*, 2005).

Alguns estudos desenvolvidos em nosso laboratório com células-tronco na epilepsia induzida mostraram resultados de redução na frequência de crises convulsivas e melhora cognitiva (COSTA-FERRO *et al.*, 2010; VENTURIN *et al.*, 2011). Nestes estudos o modelo experimental utilizado foi de epilepsia temporal, é um modelo de epilepsia lesional (sintomático) que determina expressiva lesão hipocampal.

Apesar dos avanços que foram feitos neste campo de conhecimento, o potencial terapêutico das células-tronco em epilepsias idiopáticas, isto é naquelas com possível origem genética, que representam 50% de todas as epilepsias, ainda não foi determinado. Este é o primeiro estudo que investiga a possibilidade de terapia celular em camundongos com epilepsia genética.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo é verificar se as células mononucleares da medula óssea (CMMO) apresentam um potencial terapêutico no controle ou diminuição das crises epilépticas na epilepsia genética do camundongo EL/Suz.

1.6.2 Objetivo específicos

1. Verificar a migração celular através da investigação molecular da presença de células mononucleares administradas nos animais tratados;
 2. Avaliar o número de crises após o transplante das células mononucleares de medula óssea no camundongo EL;
 3. Verificar a frequência de descargas através do registro eletroencefalográfico (EEG);
 4. Avaliar a resposta sináptica utilizando o paradigma de estimulação por pulso pareado e LTP.
-

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ASPECTOS ÉTICOS

Os protocolos experimentais utilizados foram submetidos para avaliação e aprovação pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da PUCRS e seguiram as normas internacionais de experimentação com animais de laboratório, registro CEUA 09/00089. Todos os procedimentos foram realizados tomando os cuidados necessários para reduzir ao máximo o número de animais empregados e seu sofrimento.

2.2 ANIMAIS

Camundongos mutados EL/SuzSeyFrkJ, albino, provenientes do Laboratório Jackson (MAINE, Estados Unidos). Neste estudo utilizamos 50 camundongos fêmeas (EL/Suz), pesando entre 25 e 30 gramas com 80 dias de vida divididos em 4 grupos experimentais. Estes animais ficaram alojados no Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS e recebem comida e água “*ad libitum*”, com iluminação controlada em ciclos de 12 horas claro-escuro e temperatura controlada aproximadamente 24°C.

Também foram utilizados 20 camundongos C57BL/6N transgênicos machos e adultos (C57BL/6-EGFP), pesando entre 25 e 30 gramas. Estes animais foram doadores de CTMO e expressam EGFP (*Enhanced green fluorescent protein*), proteína verde fluorescente que serve como marcador das células transplantadas. Estes animais são provenientes da Fundação Oswaldo Cruz – Bahia e serão

mantidos no Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, sob as mesmas condições citadas acima.

2.3 TRANSPLANTE

Os transplantes foram feitos na veia da cauda do animal após estimulação vestibular rítmica, após a crise o animal é colocado no contensor onde é feita a aplicação da injeção (Figura 5). Após uma semana é feita a contagem pelo observador do número de crises convulsivas pós-transplante nos grupos por um período de 240 dias (8meses). A perda de alguns animais durante o estudo foi natural por crise convulsiva e por envelhecimento.

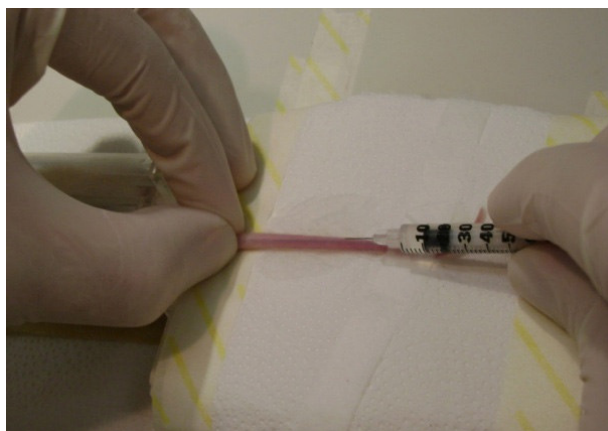


Figura 5 – Transplante de células mononucleares da medula óssea na veia da cauda do animal

2.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O estudo foi distribuído em 4 grupos: I) EL+Controle n=10; II) EL+Salina n=10; III) EL+CMMO n=10; IV) EL+Inativadas n=10. Os animais foram estimulados desde o nascimento uma vez por semana com observação direta das manifestações comportamentais a partir de 30 dias de vida (Figura 6).

Grupo I – EL+Controle: Estes animais passaram pelo mesmo estresse, mas sem aplicação de solução após 80 dias de vida.

Grupo II – EL+Salina: Estes animais receberam solução salina em substituição à CMMO (200µL de solução salina) via veia da cauda após 80 dias de vida.

Grupo III – EL+CMMO: Os animais receberam transplante de células mononucleares da medula óssea (CMMO) (200µL contendo 10^6 células mononucleares EGFP⁺), via veia da cauda no momento da crise após 80 dias de vida.

Grupo IV – EL+Inativadas: Os animais receberam transplante de células mononucleares inativadas, (200µL contendo 10^6 células inativadas), via veia da cauda no momento da crise após 80 dias de vida.



Figura 6 – Delineamento experimental dos grupos do estudo

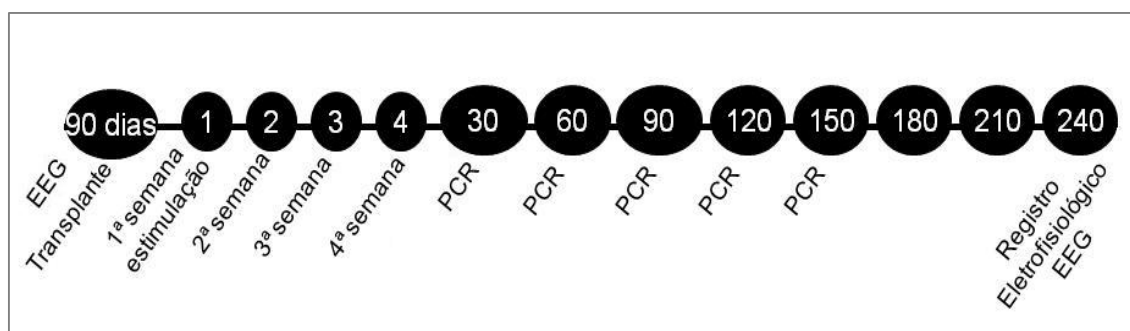


Figura 7- Linha de tempo experimental dos grupos do estudo

Para os registros eletrofisiológicos um grupo adicional de camundongos BALBC (n=5) de mesma idade, foi utilizado como controle saudável.

2.5 OBTENÇÃO E PREPARO DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA (CMMO)

Foram utilizados como animais doadores de células-tronco da medula óssea, camundongos transgênicos (C57BL6/EGFP+) que expressam a proteína fluorescente verde (GFP, do inglês, *Green Fluorescent Protein*) (OKABE *et al.*, 1997). Os animais doadores de medula óssea foram anestesiados com 0,4-0,6ml de uma solução contendo 0,8% de ketamina e 0,2% clorpromazina, conforme o peso, para sacrifício do animal. As células da medula óssea foram obtidas do fêmur, tíbia e úmero e preparadas para o transplante. Foi realizada a retirada dos ossos e posterior lavagem com meio de cultura RPMI -1640 (Gibco). A extração posteriormente do estroma medular foi obtido pela introdução de uma agulha 32G nas extremidades ósseas e o interior dos ossos longos foram lavados com meio de cultura RPMI-1640 heparinizado (100 U/mL). O conteúdo foi filtrado a uma porosidade de 100µm. Esta suspensão foi fracionada em um gradiente de densidade gerado por centrifugação sobre Histopaque na densidade de 1,119 g/mL (Sigma-Aldrich) a 400 g durante 30 minutos a 25 °C. A fração mononuclear situada sobre a interface com o Histopaque foi coletada e lavada duas vezes com solução salina 0,9 % estéril. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão com azul tripan 0,4 % (Gibco) (Figura 8).



Figura 8 – Preparo das células-tronco da medula óssea (CTMO)

2.6 CARACTERIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES CELULARES PRESENTES NA MEDULA ÓSSEA

Uma das alíquotas foi avaliada com os seguintes anticorpos: CD19, CD34, CD45, CD117 e Sca-1, diluídos na concentração de um 1:10 em PBS. Após incubação a 5° C no escuro por pelo menos 15 minutos, as células foram lavadas com PBS e centrifugadas a 1.500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas com 1 ml de paraformaldeído 4% (em PBS), para análise. As amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, USA). Os dados obtidos correspondem a pelo menos 50.000 eventos.

Para preparação das células inativadas, os procedimentos de obtenção e tratamentos foram idênticos aos da preparação das células tronco de medula óssea como descrito acima. Porém, após a separação da fração mononuclear do sangue

da medula óssea, as células foram fixadas com fomaldeído 10% e sua viabilidade foi medida pelo teste MTT através da incubação com 3-(4,5-dimethyldiazoniol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) e dimetilsulfóxido (DMSO) por 4 horas. Foi realizada leitura a 570 nm em leitor de ELISA e o estado não funcional das células mostrou-se inferior a 95%

2.7 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS

Para detecção das células transplantadas foi realizada a técnica da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) a partir de duas amplificações sucessivas do mesmo fragmento (*nested-PCR*). Essa técnica foi idealizada por Kary Mullis e permite a amplificação de uma região específica do DNA, que pode ser visualizada através da análise por eletroforese em gel de agarose. A reação em cadeia da polimerase (PCR) vem sendo investigada como alternativa de alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico rápido. A *nested-PCR*, constituída por duas amplificações sucessivas do marcador molecular, é defendida por conciliar ainda maior sensibilidade e especificidade (MULLIS *et al.*, 1986).

Para identificar se as células EGFP migram em direção a região lesada e sobrevivem após o transplante, foi realizada a infusão de CMMO-GFP⁺, através da veia da cauda, e os camundongos foram eutanasiados, por deslocamento cervical, em diferentes tempos, 24 horas, 30, 60, 90 120 e 150 dias após transplante. Esses animais tiveram seus encéfalos dissecados e coletados para posterior análise pela técnica de PCR. Como a presença da EGFP serve de indicativo de que o tecido regenerado foi proveniente das células da medula óssea do animal doador e não de células residentes do animal receptor, utilizamos oligonucleotídeos iniciadores

(*primers*) complementares à sequência de DNA correspondente a uma sequência específica do gene que codifica a proteína EGFP. Para a extração de DNA, os tecidos foram marcados em 300µL de tampão fosfato. A seguir, foi adicionado 600µL de Brazol. Os tubos foram agitados com auxílio de vórtex e então foi adicionado 120µL de clorofórmio gelado. As amostras foram centrifugadas em 14.000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi transferido para novos tubos e foi adicionada 0,7x o volume de isopropanol gelado e então incubados a -20°. Os tubos contendo precipitado foram descartados e depois uma nova centrifugação a 10.000 rpm, por 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão. Por fim, o pellet foi ressuscitado em 50µL água MilliQ autoclavada. Os frascos contendo as amostras de DNA foram armazenados a -20°C. Previamente à reação de PCR, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria utilizando comprimento de onda de 260nm. As amostras foram diluídas para obter um padrão de volume de 1µg de DNA por reação. A amplificação foi realizada em termociclador (PTC-200/MJ Research) utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) direto 5'-42TTGAATTCGCCACCATGGTGAGC-3' e reverso 5'-TTGAATTCTTACTTGTACAGCTCGTCC-3' complementares à sequência de DNA correspondente a uma sequência específica do gene que codifica a proteína GFP, gerando um produto de PCR de 1000 pb, e uma nova amplificação utilizando o *primer* direto 5'-GGGCACAAGCTGGAGTACA-3' e reverso 5'-ATGTTGTGGCGGATCTTGA-3' gerando um produto de PCR de 100 pb, caracterizando a técnica de *Nested-PCR*. As condições de amplificação foram as seguintes: 95°C por 5 minutos para desnaturação; 30 ciclos subsequentes consistindo cada ciclo de uma etapa de desnaturação a 95°C por 45 segundos, uma etapa de anelamento a 62°C por 1 minuto e uma etapa a 72°C por 1,5 minutos para

extensão; e então uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos. Para controlar o funcionamento da reação, foram ensaiados, juntamente com cada bateria de DNA de amostras de animais transplantados, um controle positivo de reação que consistirá de DNA extraído a partir de CMMO obtidas de camundongo C57BL/6-EGFP, e um controle negativo de reação, com omissão de qualquer DNA, além de amostras de animais que não receberão CMMO. Os produtos amplificados foram detectados por eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE 1x, contendo brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta. As condições da corrida eletroforética foram de 100 V, com corrente de 400 mA por 30 minutos. O resultado foi considerado positivo para a presença de DNA de células EGFP⁺ quando visualizada a banda correspondente.

2.8 CRITÉRIO DE INCLUSÃO E AVALIAÇÃO DE CRISE DO CAMUNDONGO EL/SUZ

Foram consideradas crises as manifestações comportamentais conforme cada fase do camundongo EL e a estimulação foi o movimento de subida e descida do animal até a caixa. Os animais foram estimulados a partir dos 30 dias de vida, quando passou a ser computada a frequência de crises. A observação foi realizada uma vez por semana até o final do experimento, aos 240 dias. Os animais receberam a administração de CMMO, CI ou Salina aos 90 dias de vida. A diferença no número de crises convulsivas pré e pós-transplante foram usados como parâmetro para que se infira que as células mononucleares transplantadas foram capazes de migrar para o tecido nervoso e melhorar sua função, como na redução das crises convulsivas.

2.9 REGISTRO ELETROENCEFALOGRÁFICO (EEG)

Para registro do EEG foram utilizados eletrodos subdermais dispostos biparietalmente no escalpo do animal sendo um par a frente da sutura bregmática e dois pares distribuídos simetricamente entre a sutura do bregma e sutura do lambda (Figura 9). Estes eletrodos foram conectados ao amplificador de sinal diferencial Morfeu-bio (DOLSCH Ltda., RS, Brasil) com ampla banda de frequência e ganho programável. Houve determinação de rejeição do modo comum de 100 dB, e impedância de entrada maior que 100 Mohm. Em seguida, os sinais passaram por módulos condicionadores, os quais filtram com uma banda de passagem de 0,1 a 64 Hz. Foi, então, direcionado para uma placa conversora analógico-digital, sendo esta conectada a um computador, via porta serial RS232. Após este processamento, a amplificação final foi de 10.000 vezes. Os registros foram realizados utilizando-se o *software* Morfeu-bio (DOLSCH Ltda., RS, Brasil) para receber os impulsos cerebrais transmitidos pelo conversor analógico-digital e exibi-los para a análise simultânea (Figura 10). Qualquer medição que tenha sido associada à desconexão do sensor na pele do animal foi desconsiderada.

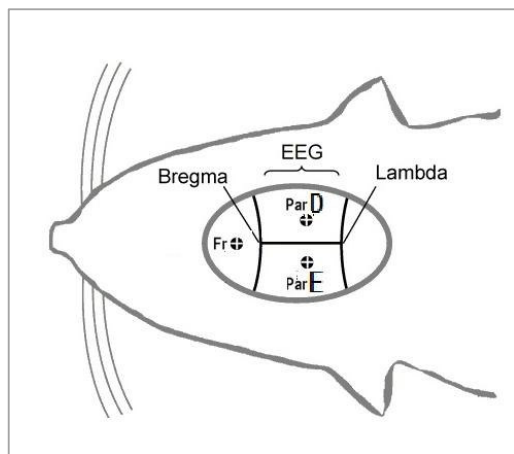


Figura 9 – Posição dos eletrodos no escalpo do animal: Fr – Frontal; Par D – Parietal Direito; Par E – Parietal Esquerdo



Figura 10 – Animal com eletrodo fixado no escalpo; Registro utilizando o software Morfeu-Bio

2.10 REGISTRO ELETROFISIOLÓGICO *IN VITRO*

O estudo da funcionalidade das células transplantadas foi avaliado com registro eletrofisiológico (SCHWARTZKROIN, 1994). Para registro de potenciais de campo foram utilizadas micropipetas de borossilicato, preenchidas com Ringer normal apresentando uma resistência de 0,5 a 10M Ω eletrodo com filamento de

platina. A diferença de potencial foi registrada com potencial terra referencial no eletrodo fixo de platina-iridium em contato com a solução de perfusão na câmara de registro. Quando obtido o registro simultâneo de atividade extracelular, identificamos potenciais de campo repetitivos (“pontas”) em crescimento e de alta frequência, caracterizando a expressão extracelular de atividade ictal. Os sinais eletrofisiológicos foram captados e pré-amplificados inicialmente com pré-amplificadores para registros intracelular (IC) e extracelular (EC) (“headstages”), e amplificados pelo equipamento de registro. Os registros eletrofisiológicos foram realizados com o auxílio dos seguintes equipamentos: (a) amplificador AxoClamp 2B (*Axon Instruments Inc.®*) - trata-se de um fixador de corrente para realizar as medições do potencial de membrana no extracelular; (b) condicionador de sinais programável CyberAmp 320 (*Axon Instruments Inc.®*) - serve para manipular o sinal analógico do AxoClamp 2B; (c) estimulador programável Master 8 (*A.M.P. Instruments Ltd.®*) - utilizado para gerar pulsos para estimulação elétrica das fatias e para programar rotinas de controle, sincronizando o AxoClamp 2B e o Digidata 1200B; (d) Digidata 1200B (*Axon Instruments Inc.®*) - instrumento para aquisição de dados que converte o sinal analógico em digital, para poder ser gravado e analisado no microcomputador; (e) Software AxoScope 8 (*Axon Instruments Inc.®*) - o software monta na tela do computador o sinal capturado, expressando os valores de voltagem e tempo para serem gravados no disco rígido e posteriormente analisados, e (f) Softwares Origin versão 5.0 (*Microcal Software®*) e Clampfit 9.2 (*Axon Instruments Inc.®*) - responsáveis pela análise estatística dos dados e construção de gráficos (Axon, 1993) (Figura 11).

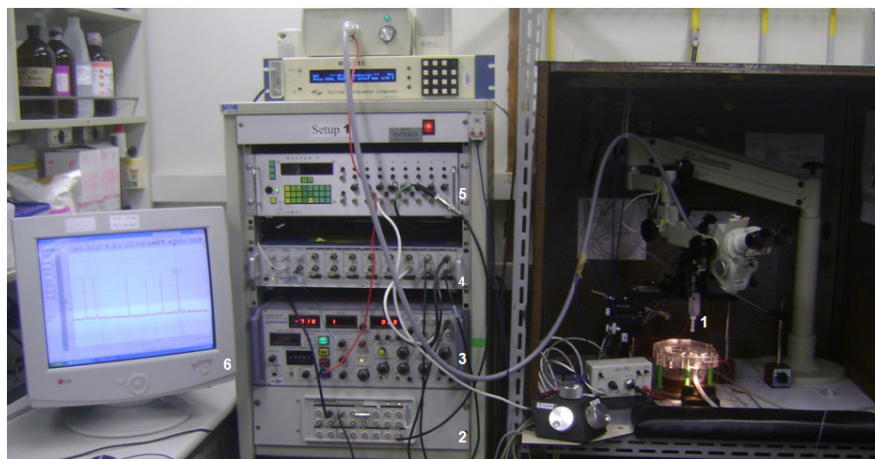


Figura 11 - Equipamentos eletrofisiológicos 1) Headstage; 2) Digidata; 3) Axoclamp; 4) Cyberamp; 5) Master 8; 6) Axoscope, Clampex 9.2.

2.11 FATIAS CEREBRAIS (“BRAIN SLICES”)

Após o período de observação dos animais foi feito o desnucamento cervical, decapitação e remoção do encéfalo. Seus cérebros foram imersos em solução salina de Ringer de dissecação com a seguinte composição (em mM): NaCl 130, KCl 3, NaH_2PO_4 1,2, NaHCO_3 26, Glicose 10, MgCl_2 5, e CaCl_2 1. A solução foi mantida a temperatura de 4°C e sob constante oxigenação (95% de O_2 e 5% de CO_2). Em seguida o encéfalo foi fatiado a 400 μm de espessura com auxílio de um vibroslice (Figura 12).

Para descanso das fatias, o material foi imerso numa solução contendo Ringer normal com a seguinte composição (em mM): NaCl 124, KCl 5, NaH_2PO_4 1,2, NaHCO_3 26, Glicose 10, MgSO_4 2 e CaCl_2 2 com pH de 7,4. A solução permaneceu à temperatura ambiente e com oxigenação constante, por 1h (Figura 10).

Posteriormente o material foi levado à câmara de registro para a realização do estudo eletrofisiológico. A perfusão das fatias na câmara de interface foi com Ringer aquecido a 34°C e continuamente oxigenada (95% de O₂ e 5% de CO₂).

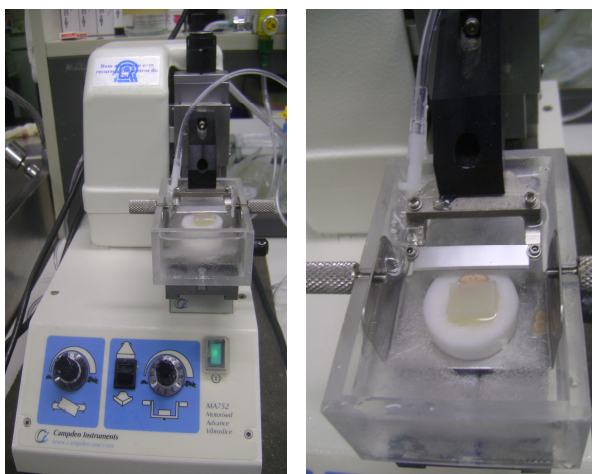


Figura 12 - Fatiamento (Vibroslice)

Esta técnica permite o estudo *in vitro* da atividade de campo extracelular, com a possibilidade de visualizar o local de estimulação. Outra facilidade é a possibilidade de manipulação do meio intra e extra celular, modificando sua concentração iônica. Através disto, é possível não só mimetizar condições morfofisiológicas normais além de patológicas (MCLLMWAIN, 1953) (Figura 13).

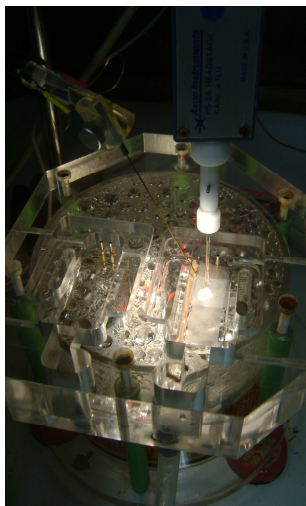


Figura 13 – Câmara de Interface

2.12 EXCITABILIDADE NEURONAL ATRAVÉS DE PULSO PAREADO

Para os registros dos potenciais de campos registrados na região do hipocampo, a visualização da região de CA1 e da Colateral de Schaffer para o posicionamento dos eletrodos de estímulo e registro, respectivamente, foi realizada com microscópio estereoscópico (HENDERSON, 1993). A distância mínima entre os eletrodos foi de 0.5 mm, e a máxima, de 1 mm. O registro dos potenciais de campo foi realizado utilizando micropipetas de boro silicato, preenchidas com Ringer normal apresentando uma resistência de 0,5 a 10M Ω . As micropipetas foram confeccionadas com o estirador de pipetas P-87 (Sutter Instrument Company®). O posicionamento da pipeta sobre a fatia foi realizado com o micromanipulador MP-285 (Sutter Instrument Company®). Para a aplicação dos estímulos de teste e tetânico foi utilizados eletrodos bipolares de platina-iridium com 75 μ m, encapados

com teflon (A-M Systems®). Os eletrodos foram posicionados no hipocampo com o micromanipulador auxiliar MP-285 Huxley-Wall (Sutter Instrument Company®) (Figura 14).

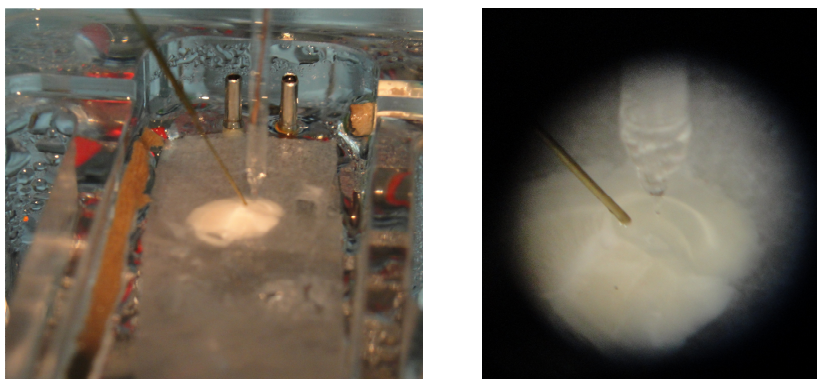


Figura 14- Esquema mostrando fatia de hipocampo com eletrodos na cuba de perfusão

Inicialmente, procuramos verificar a estabilidade da linha de base aplicando estímulos simples, com 20 μ seg de duração cada pulso aplicado a cada 20 segundos, por um período total de 15 minutos (Figura 15). Com tais estímulos obtivemos uma *population spike* (PS). Ao início de cada registro, estabelecemos a intensidade de estímulo (μ A) pela amplitude da reposta pós-sináptica evocada neste caso, a intensidade do estímulo foi progressivamente aumentada até determinarmos à amplitude máxima do PS. A intensidade do estímulo durante o experimento foi àquela necessária para obtermos 50-60% da amplitude máxima do OS. Foi utilizado um protocolo com intervalo entre os pulsos (ISI - “*Interstimulus Interval*”) que variou da seguinte forma: 3 min de 10 ms, 3 min com 20 ms, 3 min com 40 ms, 3 min com 100 ms e, por fim, 3 min com 120 ms (Figura 15).

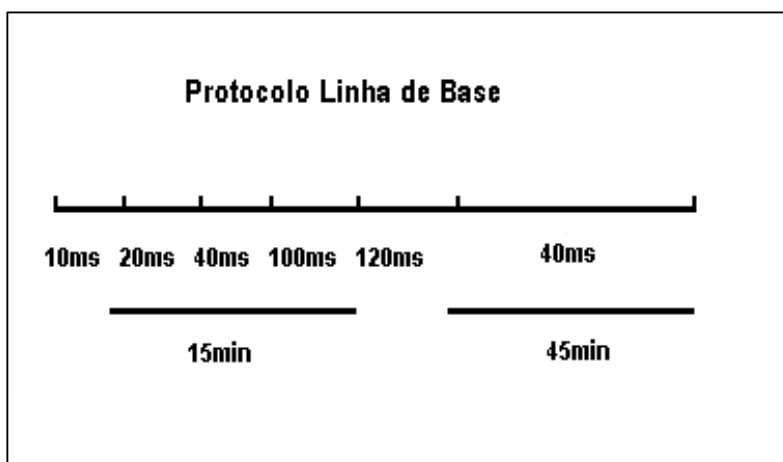


Figura 15 – Protocolo de linha de base

A estimulação com pulsos pareados constitui-se num paradigma neurofisiológico amplamente utilizado para avaliar modificações extremamente rápidas na eficiência sináptica. A razão entre o segundo EPSP evocado e o primeiro (PPR, de “*paired-pulse ratio*”) fornece uma estimativa da probabilidade de liberação do neurotransmissor pelo(s) terminal (is) pré-sináptico(s) da via estudada. A $PPR < 1$ determina o fenômeno de depressão por pulso pareado (PPD, de “*paired-pulse depression*”), ao passo que quando > 1 , configura-se no fenômeno de facilitação por pulso pareado (PPF, de “*paired-pulse facilitation*”) (Figura 16). Desta forma, foi realizada a estimulação com pulsos pareados com intervalo inter-estímulo de 40ms por 45 minutos antes da aplicação do estímulo condicionante de alta frequência (100 Hz) na via. Para isto, manteve-se a frequência de 0,05 Hz.

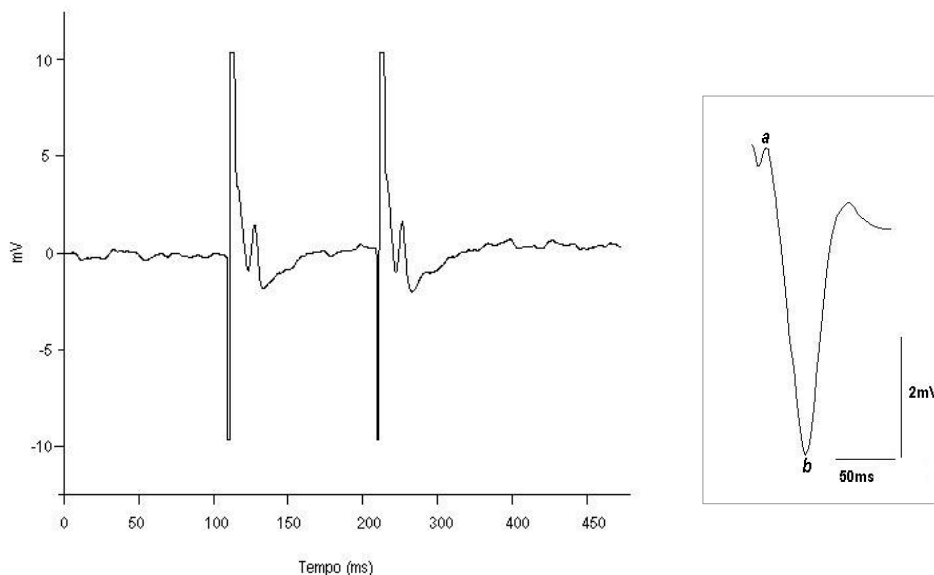


Figura 16 - Registro de campo mostrando o segundo EPSP evocado e o primeiro (PPR, de “paired-pulse ratio”). As letras a-b marcam os parâmetros eletrofisiológicos utilizados para a aferição do PS (Population Spike)

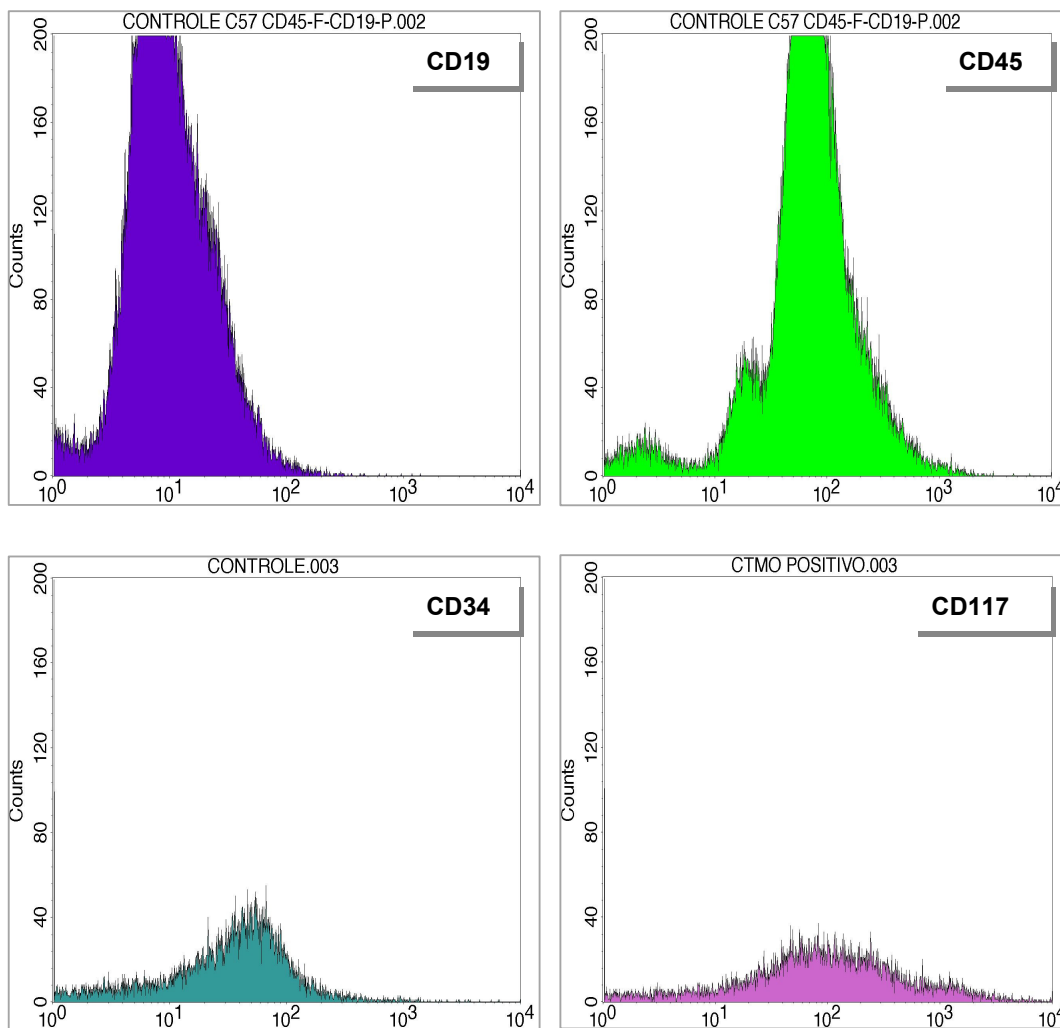
Imediatamente após o término do protocolo de pulsos pareados, induziremos alterações sinápticas de longa duração no hipocampo através da estimulação tetânica. Para tal, os seguintes parâmetros serão utilizados: 4 trens de estímulo com 3 segundos de duração cada, 100 Hz de frequência, em intervalos de 20 segundo (BLISS *et al.*, 1993). A duração de cada pulso foi de 0,2 mseg. A intensidade da corrente durante o estímulo condicionante foi aquela necessária para induzir o PS de máxima amplitude.

Foi considerada a indução de LTP se a resposta permanecer estável e aumentada em no mínimo 30% da resposta inicial por um período mínimo de 30 minutos após a estimulação tetânica (BEAR *et al.*, 1994) (Figura 17).

3 RESULTADOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DO SANGUE DE MEDULA ÓSSEA

Para caracterização das populações celulares, foi realizada a técnica de citometria de fluxo utilizando os seguintes anticorpos: CD19, CD45, CD34, CD117 e Sca-1. Os resultados estão expressos na figura abaixo:



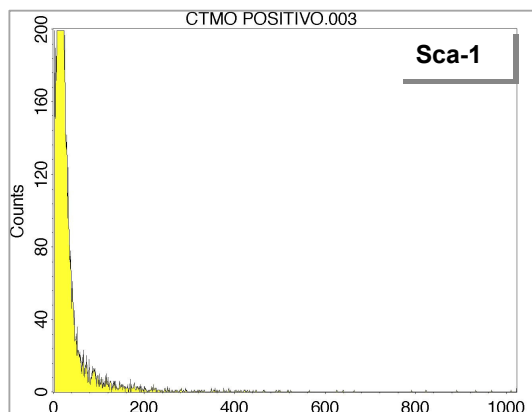


Figura 18- Citometria de fluxo para imunofenotipagem das CMMO. As células extraídas da medula óssea de camundongos C57BL/6-EGFP apresentaram as respectivas proporções: CD19: 37%; CD45: 94%; CD34: 79%; CD117: 79%; Sca-1: 2%.

3.2 DETECÇÃO POR PCR DA PRESENÇA DE EGFP⁺ DAS CMMO TRANSPLANTADAS

A avaliação por PCR permitiu encontrar positividade para o a amplificação de um fragmento do gene GFP em amostras de encéfalos de camundongos EL/Suz tratados com a fração mononuclear de medula óssea de camundongos transgênicos GFP⁺ nos períodos de 24 horas, 30 dias, 60 dias, 90 dias e 120 dias após o transplante.

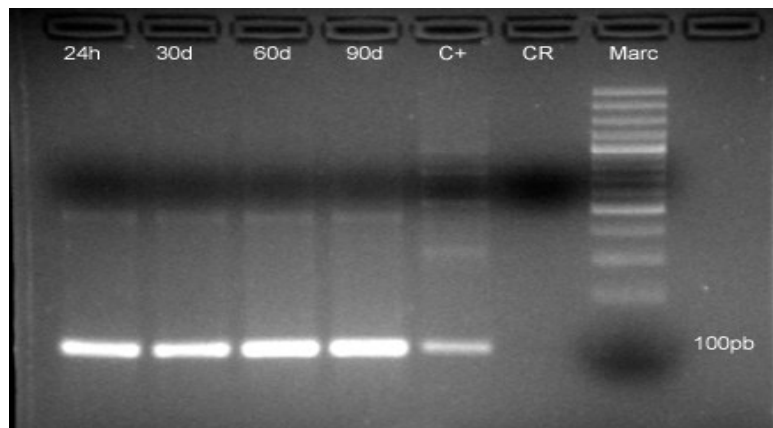


Figura 19 - Fotografia dos produtos da PCR para o gene GFP após eletroforese em gel de agarose 2%. 24h: produto da PCR com iniciadores para um segmento do gene GFP 24 horas após o transplante das células mononucleares; 30d, 60d e 90d: produto da PCR com iniciadores para um segmento do gene GFP 30 dias, 60 dias e 90 dias, respectivamente, após o transplante das células mononucleares; C+: controle positivo utilizando amostra de DNA de camundongo C57/BL6 transgênicos para o gene GFP; CR: Controle da reação sem presença de DNA; Marc: Marcador de peso molecular de 100 pb.

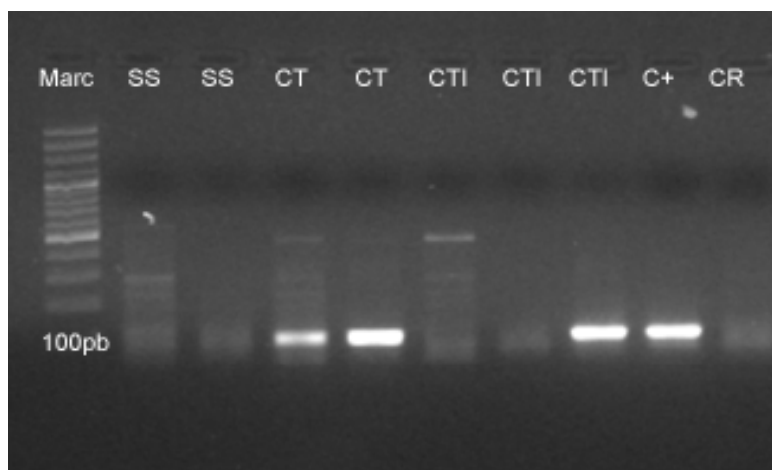


Figura 20 - Fotografia dos produtos da PCR para o gene GFP após eletroforese em gel de agarose 2% 120 dias após o transplante das células mononucleares. Marc: Marcador de peso molecular de 100pb; SS: produto da PCR com iniciadores para um segmento do gene GFP em animais que receberam solução salina; CT: produto da PCR com iniciadores para um segmento do gene GFP em animais que receberam células-tronco (mononucleares); CTI: produto da PCR com iniciadores para um segmento do gene GFP em animais que receberam células-tronco (mononucleares) inativadas; C+: controle positivo utilizando amostra de DNA de camundongo C57/BL6 transgênicos para o gene GFP; CR: Controle da reação sem presença de DNA.

3.3 O TRATAMENTO COM CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA TEM O POTENCIAL DE DIMINUIR OU CESSAR AS CRISES CONVULSIVAS DE CAMUNDONGOS EL/SUZ

Através das observações feitas em cada semana de estímulo foi avaliado o número de crises de cada animal por grupo (Tabela 1) durante 240 dias com 4 observações por mês.

Tabela 1 - Contagem geral do número de crises por grupos avaliados por tempo de observação de cada animal pós-transplante.

Dias pós-transplante	Número de observações/semana	Nº de animais por grupo	Total de crises por grupo			
			Controle	Salina	CMMO	Inativado (CI)
30	4	10	40	40	34	38
60	4	10	40	40	33	38
90	4	10	40	40	30	39
120	4	10	40	40	29	37
150	4	9	36	36	26	36
180	4	8	32	32	20	32
210	4	8	32	32	18	32
240	4	8	32	32	16	31

A contagem do número de crise durante o período de observação mostra uma diminuição na frequência de crises no grupo tratado com a fração mononuclear da medula óssea (CMMO) (Figura 21). A média de crises computadas durante os 240 dias de observação dos animais foi de $25 \pm 6,9$ para os camundongos tratados com CMMO. Por outro lado, quando os animais recebem somente solução salina,

essa média é de $36 \pm 3,6$. A diminuição da frequência de crises observadas no grupo CMMO é estatisticamente significativa ($P=0.0001$).

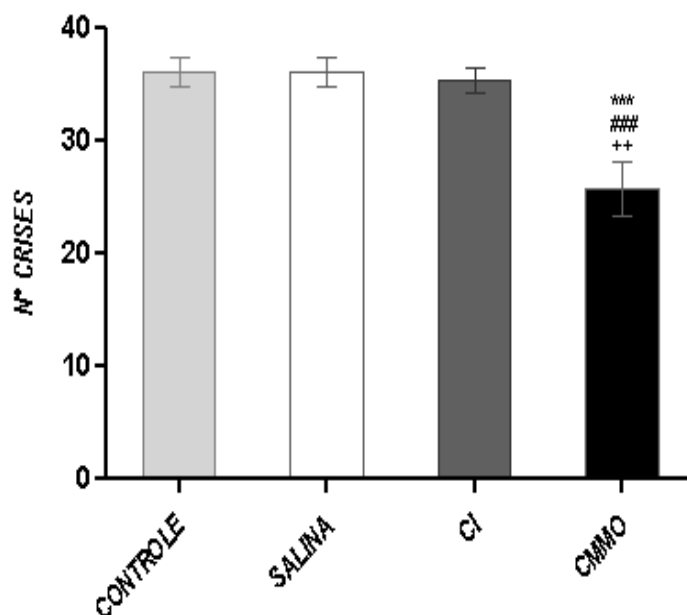


Figura 21 - Contagem do número de crises por estimulação vestibular rítmica durante 240 dias de observação. Utilizando ANOVA, seguida de *Tukey*, o grupo tratado com CMMO foi significativo, $***P=0.0001$. * Controle vs CMMO; # Salina vs CMMO; + CI vs CMMO.

A média de crises durante 240 dias de observação mostra uma diminuição na frequência de crises no grupo tratado com CMMO ($2,7 \pm 0,49$) em relação aos grupos controle ($3,9 \pm 0,05$), salina ($3,9 \pm 0,05$) e CMMO inativado ($3,8 \pm 0,11$) (Figura 22).

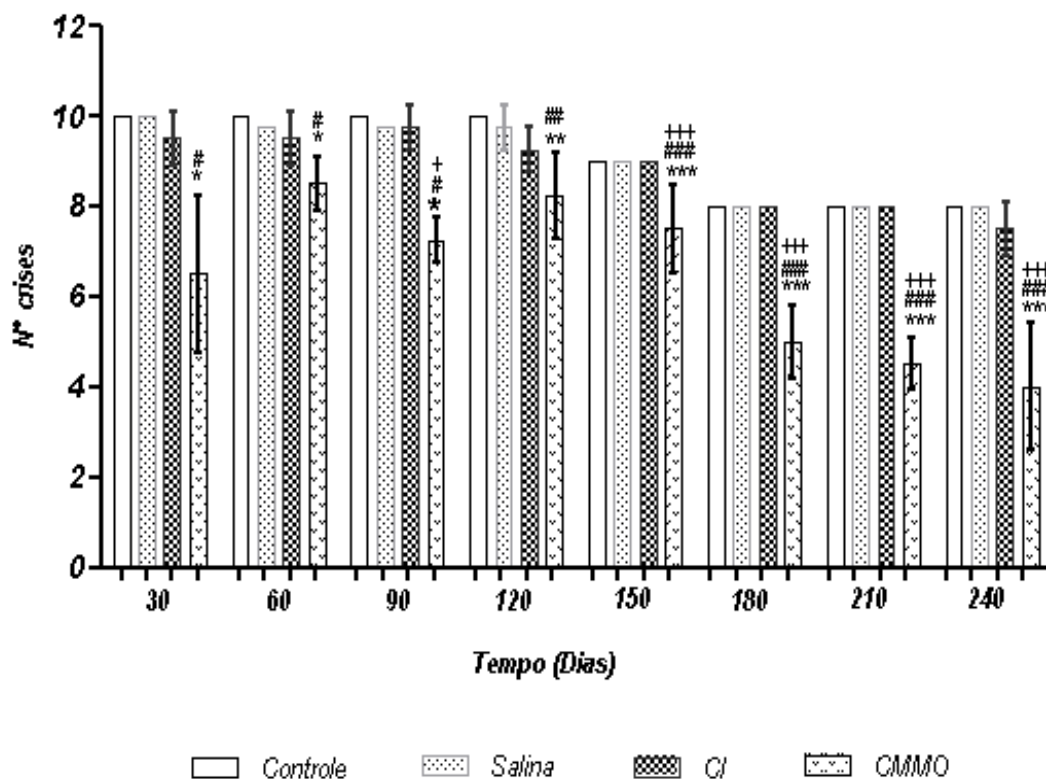


Figura 22 - Média do número de crises avaliada por mês nos quatro grupos em estudo durante 240 dias de observação. Utilizando ANOVA, seguida de Tukey, mostrou em 30 dias $p=0,0023$; 60 dias $p=0,0249$; 90 dias $p=0,0001$; 120 dias $p=0,0356$; 150 dias $p=0,0071$; 180 dias $p=0,0001$; 210 dias $p=0,0001$; 240 dias $p=0,0002$; * Controle vs CMMO; # Salina vs CMMO; + CI vs CMMO.

O número de crises também foi observado e computado no período anterior ao transplante celular. Quando comparamos estes dados com aqueles obtidos após o transplante verificamos que há redução gradual na frequência de crises (Figura 23).

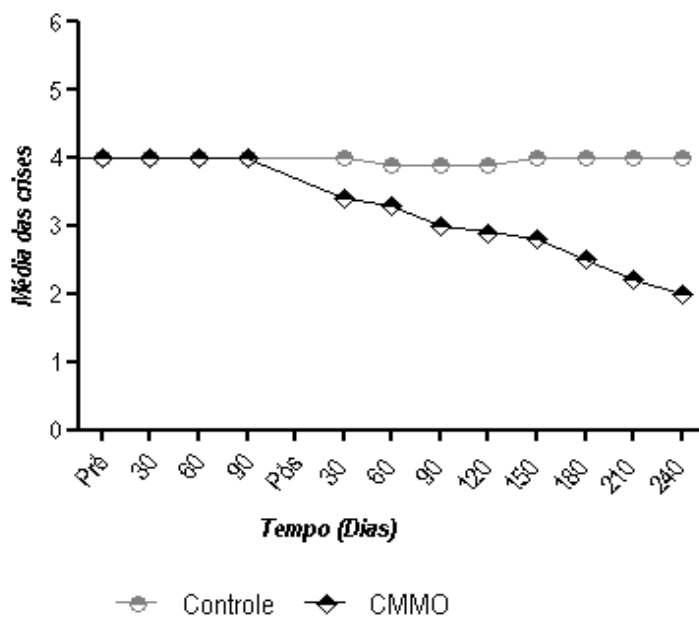


Figura 23 - Comportamento das crises em relação ao tempo de tratamento pré e pós-transplante dos camundongos com epilepsia genética.

O percentual de redução de crises observados no período de avaliação foi gradual chegando a 50% em 240 dias de observação (Figura 24).

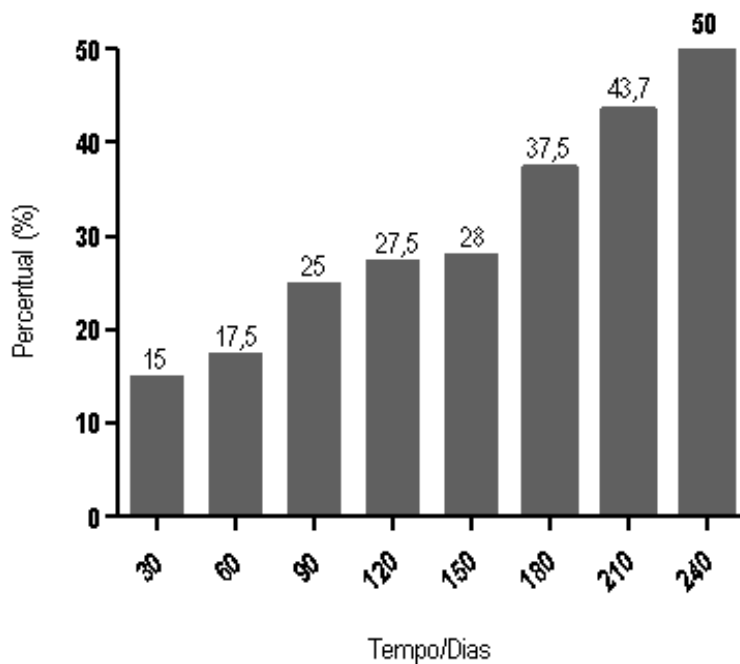


Figura 24 - Percentual de redução de crises em relação ao tempo de observações do grupo tratado com CMMO.

3.4 REGISTRO ENCEFALOGRÁFICO (EEG) PÓS-TRANSPLANTE PARA CARACTERIZAR A INTENSIDADE DAS CRISES CONVULSIVAS NOS GRUPOS TRATADOS

Para confirmar a diminuição e/ou a intensidade da crise convulsiva foi realizado o EEG de 2 animais do grupo EL+Salina e do grupo EL+CMMO com 30 e 240 dias de transplante.

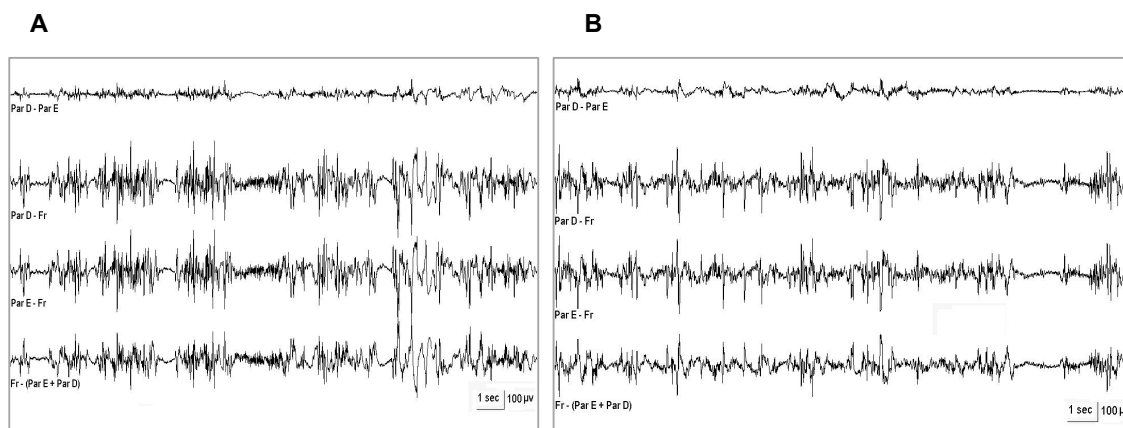


Figura 25- Registro ictal pós-estímulo de camundongo EL+Salina. (A) pré-transplante com frequência de 37 pontas ictais e (B) com frequência de 36 pontas ictais, em 1min. Média EL+Salina 4.970 ± 0.300 erro padrão.

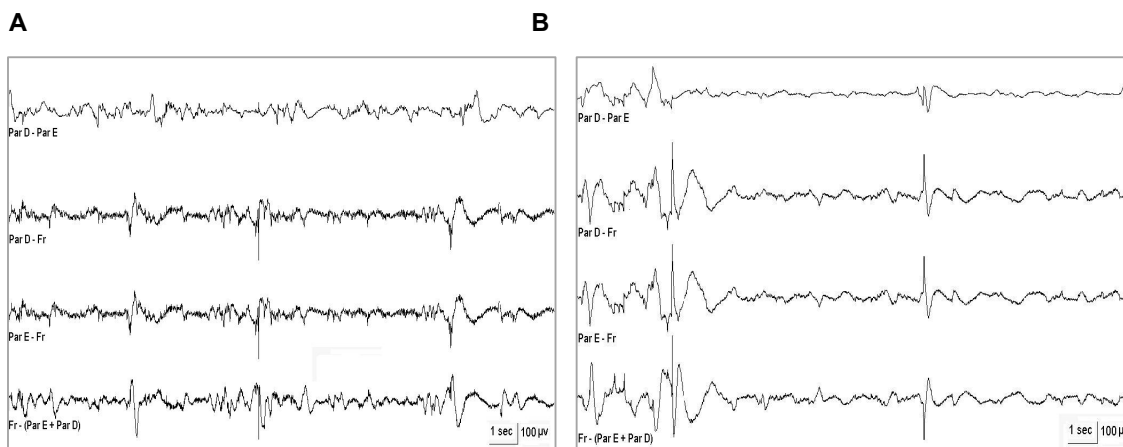


Figura 26 - Registro ictal pós estímulo de camundongo EL+CMMO. (A) 240 dias pós-transplante com frequência de 18 pontas ictais e (B) 240 dias pós-transplante com 7 pontas ictais, em 1min. Média EL+CMMO 3.956 ± 0.0992 erro padrão. Utilizando teste t houve diferença estatística, $*P= 0,0404$ entre os grupos EL+CMMO vs EL+Salina.

3.5 O TRATAMENTO COM CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA APRESENTAM DIFERENÇA NA EXCITABILIDADE NEURONAL ATRAVÉS DE PULSO PAREADO

Neste estudo foi utilizado 12 camundongos divididos em três grupos Controle (BALBC sadio) n=5 registros, EL+ Salina n=4 registros, EL+CMMO n= 5 registros para estudo da excitabilidade neuronal.

Inicialmente procuramos verificar a estabilidade da linha de base aplicando estímulos simples 10ms, 20ms, 40ms, 100ms e 120ms, com 0,2mseg de duração cada pulso, aplicados a cada 20 seg por um período total de 15 minutos. Identificando que o aumento da amplitude máxima ficou com inter-estímulo em 40ms começamos o estudo da excitabilidade neuronal.

Para reduzir a variabilidade que existe entre as fatias, normalizamos os valores das inclinações do PEPS, em 100% e analisamos os dados pelo teste ANOVA após Tukey (média±erro padrão).

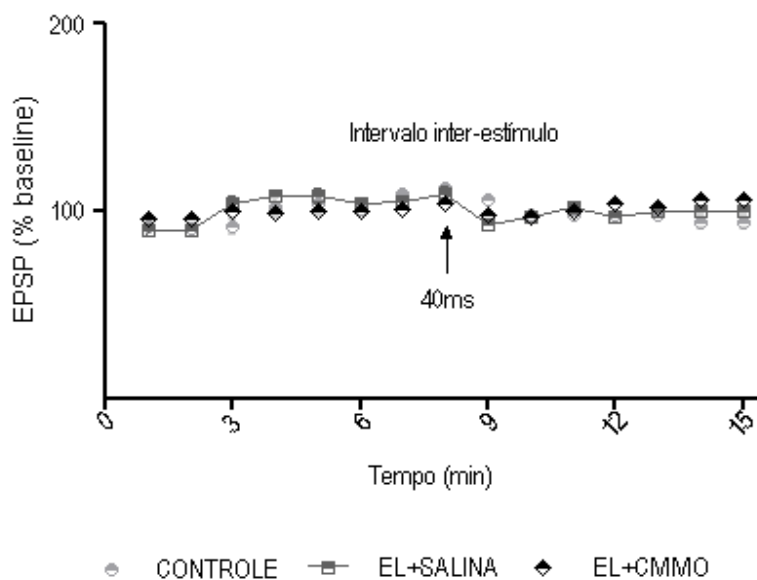


Figura 27 - Gráfico identificando a linha de base em 40ms como pico máximo de amplitude do EPSP. Neste experimento, utilizamos uma intensidade de corrente de 60 μ A.

Uma das técnicas utilizadas para estudo de excitabilidade neuronal numa população de neurônios é por pulso pareado, que consiste na aplicação de dois estímulos um logo após o outro na célula pré-sináptica, no caso da colateral de Schaffer das células piramidais de CA3 e captação do EPSP na região de CA1. No hipocampo a amplitude do segundo EPSP é dependente da amplitude do primeiro (Figura 28).

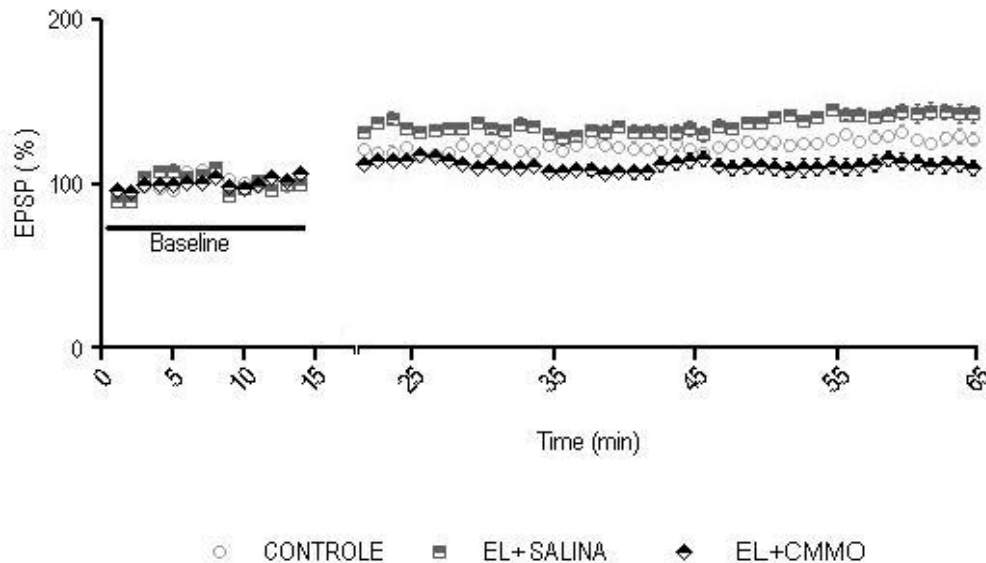


Figura 28 - EPSP por pulso pareado para estudo da excitabilidade neuronal. Utilizando a análise de ANOVA e Tukey entre os grupos, Controle vs EL+Salina* e EL+Salina vs EL+CMMO*** houve diferença estatística, ***P= 0,0001. Cada ponto do gráfico representa a média das amplitudes da população de espículas de 3 minutos \pm erro padrão.**

Após assegurarmos a excitabilidade neuronal por pulso pareado, aplicamos o estímulo condicionante de alta frequência de 100 Hz. A intensidade da corrente durante o estímulo condicionante foi àquela necessária para induzir o PS de máxima amplitude (Figura 29).

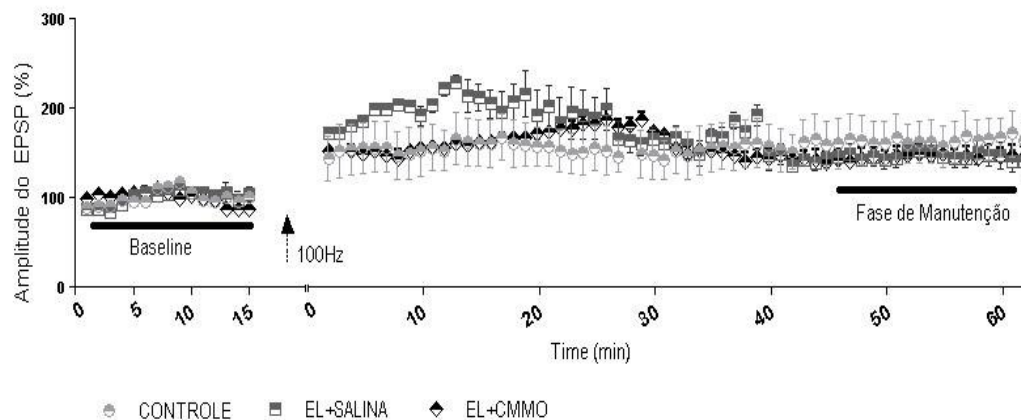


Figura 29 - Potencial pós-sináptico excitatório após estímulo condicionante (seta pontilhada). Utilizando ANOVA e Tukey houve diferença estatística, $***P= 0,0018$ entre os grupos Controle vs EL+Salina*; EL+Salina vs EL+CMMO**. Cada ponto do gráfico representa a média das amplitudes da população de espículas de 3 minutos \pm erro padrão.

Pode-se observar no gráfico um instantâneo aumento do potencial pós-sináptico excitatório (“EPSP” – tipo “*population spike*”; PS), imediatamente após a aplicação do estímulo condicionante nos grupos em estudo, bem como a manutenção da potenciação.

4 DISCUSSÃO

Este estudo se propôs a avaliar o efeito do transplante da fração mononuclear da medula óssea sobre as crises convulsivas no modelo de epilepsia genética do camundongo EL/Suz. Os animais foram observados desde 30 dias de vida com estímulos vestibular (ir e vir) uma vez por semana para controle de crises pré-transplante. Após 80 dias de vida estes animais receberam o transplante e foram estimulados e observados para controle do número de crises durante o período do estudo.

Os grupos experimentais sob observação apresentaram resultados positivos nos períodos de 24 horas, 30, 60, 90, 120 dias pós-transplante onde foi identificada a presença de CMMO EGFP⁺ no encéfalo. Nossos resultados indicam que as células mononucleares da medula óssea atravessaram a barreira hematoencefálica através do transplante na veia da cauda do camundongo EL/SUZ após o estímulo. A partir de 150 dias pós-transplante não foi identificada a presença de CMMO EGFP⁺ no encéfalo.

O estudo mostrou através da técnica *nested*-PCR, que as CMMO-GPF⁺ de camundongos transplantados por via sistêmica, são capazes de atravessar a BHE e migrar em direção ao encéfalo. A BHE é um obstáculo entre o sangue e o cérebro, em que as células endoteliais capilares cerebrais formam junções impermeáveis entre as células adjacentes (BETZ, 1992; GREENWOOD, 1991). No entanto, como

nosso estudo é em epilepsia genética, acreditamos que a BHE não seja um impedimento para a passagem das CMMO, visto que ela abre durante as convulsões (COSTA, 1972).

Nossos resultados demonstraram mudanças nas manifestações comportamentais e diminuição de crises nos animais tratados com CMMO no período de 240 dias de observação e estímulo comparados aos grupos controle, salina e células inativadas. De acordo com o potencial das CMMO podemos inferir que a observação de mudanças nas manifestações das crises e uma tendência à diminuição das mesmas, estão diretamente relacionadas com a presença dessas células com importante redução de 50% no número de crises.

Para comprovar a redução do número de crises observados nos grupos de estudo, realizamos registro de EEG da atividade elétrica cerebral antes e depois do transplante e verificamos que o grupo salina apresentou aumento da frequência de pontos caracterizando a fase ictal comparado com o grupo CMMO com 240 dias pós-transplante.

Suzuki e colaboradores demonstraram que o registro eletroencefalográfico com eletrodos implantados foi realizado em camundongos EL movimentando-se livremente durante a convulsão. A crise foi induzida com os estímulos sensorial evocado por arremessar o camundongo para cima no ar. O registro da crise foi em três estágios: prodromal, ictal e pós-ictal predominante convulsões tônico-clônica foram mais frequente, começando no córtex parietal e se estendendo pra outras regiões do encéfalo (SUZUKI *et al.*, 1977).

Comparando nossos resultados com a literatura, estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que 24h após SE por via intravenosa as CTMO são capazes de suprimir as crises precoces reduzindo epileptogênese no modelo lesional (COSTA-FERRO *et al.*, 2010).

Mais recentemente, Venturin e colaboradores demonstraram que as CMMO administrada no período crônico reduzem as crises e promovem reversão do déficit cognitivo (VENTURIN *et al.*, (2011).

Várias abordagens têm sido testadas utilizando terapia celular em modelos de epilepsia. Ruschenschmidt e colaboradores demonstraram que células-tronco embrionárias derivadas de neurônios exibiam propriedades características de neurônios quando transplantadas no hipocampo de animais epiléticos crônicos (RUSCHENSCHMIDT *et al.*, 2005).

Chu e colaboradores examinaram os efeitos de células-tronco neurais obtidas da zona ventricular de embriões humanos nas CERs de ratos que passaram por *status epilepticus* (SE). Nesse trabalho, as células também foram administradas durante o período agudo da epilepsia (CHU *et al.*, 2004).

Costa-Ferro e colaboradores (2011) demonstraram que as CTMO reduziram as crises independentes do transplante ser na fase inicial ou após período prolongado, sendo uma terapia eficaz para tratar epilepsia crônica induzida

Apesar do efeito benéfico destas terapias nos modelos animais, o mecanismo de ação destas células é ainda uma grande controvérsia e é objeto de investigação em diversos laboratórios. A hipótese inicial era de que estas células apresentavam

Uma grande plasticidade e poderiam se diferenciar em células do tecido a ser tratado.

Outro enfoque que investigamos neste trabalho foi o efeito das células mononucleares da medula óssea sobre a excitabilidade neuronal por pulso pareado e estímulo condicionante (4 trens 100Hz).

Nossos resultados demonstraram que os animais do grupo EL+Salina apresentam uma excitabilidade neuronal significamente maior comparado com o grupo Controle e o grupo EL+CMMO. No estudo de estímulo condicionante observamos que os grupos EL+CMMO e EL+Salina apresentaram indução facilitada de LTP bem como a manutenção da potenciação. Devido ao aumento da excitabilidade neuronal, o grupo EL+Salina apresentou uma maior amplitude do potencial pós-sináptico excitatório.

Costa-Ferro e colaboradores demonstraram que no modelo de epilepsia lesional os animais tratados com CTMO apresentam uma maior amplitude do potencial excitatório pós-sináptico (EPSP) comparado ao grupo não tratados (COSTA-FERRO *et al.*, 2010).

Em primeira análise, nossos dados apontam que o transplante de CMMO em camundongos com epilepsia genética reduz crises convulsivas e diminui a excitabilidade neuronal quando observado por estímulo pulso pareado. No estudo de indução facilitada os camundongos EL tratados com CMMO e não tratados apresentaram LTP com PEPS de maior amplitude quando comparado com os controles, sugerindo comprometimento hipocampal não reversível pelo transplante de CMMO.

Diversos trabalhos têm demonstrado um aumento na expressão das LTPs patológicas em detrimento de uma redução parcial ou total na capacidade de indução de LTDs. Isto tem sido observado em modelos de isquemia, uso de neurotoxinas, manipulação genética, entre outros (CALABRESI *ET al.*, (1992).

Quanto aos fenômenos de plasticidade sináptica na via corticoestriatal, já está bem estabelecida a existência de pelo menos duas formas de LTP: fisiológica e patológica. Esta segunda, desencadeada primariamente por um aumento excessivo nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} no neurônio pós-sináptico, o que levaria à morte celular pela ativação de diversas cascatas enzimáticas. Este processo provavelmente resulte numa interferência em diversos estágios da cadeia respiratória mitocondrial, levando a uma falência na produção de ATP, além de uma maior formação de espécimes oxidativos reativos a enzimas de vital importância na manutenção da homeostase iônica transmembrana (PIVOVAROVA *ET al.*, (2010).

Nas doenças neurológicas, os danos são freqüentemente irreversíveis, uma vez que mesmo que o sistema nervoso central adulto abrigue inúmeras células com potencial de regeneração, ele não consegue recrutá-las de maneira efetiva. Dessa maneira, estratégias que busquem promover acréscimo de número e função de células regenerativas endógenas, ou ainda introduzir células com potencial regenerativo no SNC através de transplante, podem representar novas alternativas terapêuticas neste caso.

Estudos recentes demonstraram que o transplante de CTMO reduziu a ativação de astrócitos, induziu a proliferação de novos neurônios no giro denteado e ativação e proliferação de células progenitoras, possivelmente devido à modulação da resposta inflamatória na epilepsia crônica induzida (COSTA-FERRO *et al.*, 2011).

Existe uma variada gama de agentes que podem modificar, de alguma maneira, os processos de neuroplasticidade. São os chamados fatores de crescimento, fatores neurotróficos ou neurotrofinas. Esses fatores de crescimento são proteínas endógenas especiais que promovem sobrevivência, divisão e crescimento, bem como diferenciação e plasticidade morfológica de células neurais (BERGADO-ROSADO *et al.*, 2000).

Os fatores neurotróficos exercem seus efeitos através de receptores de membrana que conectam com diferentes cascatas moleculares intracelulares, capazes de modificar a expressão gênica e a síntese de proteínas. Isso, por sua vez, capacita-os para induzir e modular os processos de neuroplasticidade por crescimento ou plasticidade funcional (ATON *et al.*, 1996).

Estudos prévios sugeriram que as células da medula óssea induzem modificações no tecido danificado através de diferentes mecanismos, como a produção de fatores neurotróficos (CHEN *et al.*, 2003), através da estimulação de proliferação endógena, através de secreção de fatores anti-epilépticos (SHETTY *et al.*, 2007), ou através de interação de células-tronco, exógenas e endógenas, idealizadas para propiciar neuroproteção por suporte trófico (NOMURA *et al.*, 2005).

Este estudo é pioneiro na epilepsia genética no modelo do camundongo EL/Suz com tratamento de células mononucleares da medula óssea. Esse tipo de tratamento pode ser útil dado o potencial que estas células têm de restaurar o circuito neuroquímico alterado durante o curso da doença. Com base nos dados obtidos no presente estudo, sugerimos que as células mononucleares da medula óssea podem ter efeito terapêutico na epilepsia genética no modelo do camundongo EL/Suz.

5 CONCLUSÕES

O transplante de células mononucleares da medula óssea em camundongos com epilepsia genética EL/SUZ, possibilitou as seguintes conclusões:

1. As células mononucleares da medula óssea apresentaram efeito terapêutico no controle de crises no modelo de epilepsia genética do camundongo EL/Suz;
 2. As células transplantadas migram rapidamente para o encéfalo, estando presentes 24 horas após o transplante.
 3. Os animais apresentaram uma redução significativa no número de crises quando avaliados os 240 dias pós-transplante (50%).
 4. Observamos diminuição na frequência de descargas no EEG do grupo tratado com EL+CMMO comparado ao grupo EL+Salina.
 5. O registro eletrofisiológico por pulso pareado mostrou que o grupo EL+CMMO diminuiu significativamente a excitabilidade neuronal comparado ao grupo EL+Salina.
 6. O estímulo condicionante de potenciação de longa duração foi facilitado nos grupos EL+Salina e EL+CMMO em comparação ao grupo EL+Controle, sugerindo comprometimento do hipocampo.
-

6 PERSPECTIVAS

Este trabalho foi pioneiro no sentido de estudar epilepsia genética no modelo de camundongo EL/Suz tratados com a fração mononuclear da medula óssea.

Para um maior entendimento do efeito terapêutico das CMMO deveremos evoluir com estudos intracelulares e *patch clamp* de neurônios hipocampais no intuito de determinar os receptores e o mecanismo envolvido no modelo.

Mantendo esta mesma linha de pesquisa, pretendemos aprofundar nossos achados com avaliação bioquímica, processo inflamatório e análise histológica do tecido encefálico.

7 REFERÊNCIAS

Andermann E. Multifactorial inheritance of generalized and parcial epilepsy. In: Anderson VE; Penry JK; Sing CF (Eds). Genetic Basis of the Epilepsies, Raven Press, New York, p.355-374, 1982.

Aton MJ & Whitemore SR. Autocrine BDNF secretion enhances the survival and serotonergic differentiation of raphe neuronal precursor cells grafted into the adult rat CNS. *Exp Neurol* 1996; 140(2):105-114.

Axon TG. The Axon Guide for electrophysiology & biophysics. Laboratory techniques. Axon Instruments INC, p.17-24, 1993.

Azizi AS, Strok, SD, Augelli BJ, Digirolamo C., *et al.* Engraftment and migration of human boné marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats-similarities to astrocyte grafts. *Proc. Natl. Acad Sci USA* 1998; 95: 3908-3913.

Bear MF, Malenka RC. Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol* 1994; 4: 389-399.

Bergado-Rosado JA, Almaguer- Melian. Cellular mechanisms in neuroplasticity. *Rev Neurol* 2000; 31(11):1074-1095.

Berkovic SF, Genton P, Hirsch E, Picard F. Genetics of focal epilepsies. Clinical aspects and Molecular biology. John Libbey & Company Ltd. London, p. 229-237, 1999.

Betz AL. An overview of the multiple functions of the blood-brain barrier. *NIDA Res Monogr* 1992; 120: p.54-72.

Bliss TV, Collingridge GL. A Synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993; 361: 31-39.

Calabresi P, Maj R, Mercuri NB, Bernardi G. Long-term synaptic depression in the striatum: physiological and pharmacological characterization. *J Neurosci* 1992; 12(11):4224-4233.

Cavalheiro EA, Leite JP., *et al.* Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia* 1991; 32(6): 778-782.

Cogle CR, Yachnis At, Laywell Ed., *et al.* Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: a retrospective study. *Lancet* 2004; 363: 1432-1437.

Costa-Ferro ZS, Vitola AS, Pedroso MF, Cunha FB, Xavier LL, Machado DC, *et al.* Prevention of seizures and reorganization of hippocampal functions by transplantation of bone marrow cells in the acute phase of experimental epilepsy. *Seizure* 2010; 19(2):84–92.

Costa-Ferro Z.S.M; Souza B.S.F; Leal M.M.T; Kaneto C.M; Azevedo C.M; Silva I.C; Soares M.B.P; Santos R.R; DaCosta J.C. Transplantation of bone marrow mononuclear cells decreases seizure incidence, mitigates neuronal loss and modulates pro-inflammatory cytokine production in epileptic rats. *Neurobiology of Disease* 2012: 46 (2):302-313.

Costa JC. Influência de eletroconvulsões sobre a permeabilidade da barreira sangue-cérebro ao azul tripan. *Arquivos de Neuro-psiquiatria* 1972; 30:2-7.

Chen J, Li Y, Katakowski M, Chen X, Wang L, Lu D, Lu M, Gautam SC, Chopp M. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *Journal of Neuroscience Research* 2003; (6):778-786.

Chu K, Kim M, Jung KH, Jeon D, Lee ST, Kim J, Jeong SW, Kim SU, Lee SK, Shin HS, Roh JK. Human neural stem cell transplantation reduces spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus in adult rats. *Brain Research* 2004; 1023(2):213-221.

Dezawa M, Takahashi I, Esaki M, Takano M, Sawada H. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. *Eur J Neurosci* 2001; 14(11):1771-1776.

Dunnett SB, Rosser AE. Cell therapy in Huntington's disease. *NeuroRx* 2004; 1(4):394-405.

Engel JR, A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy. *Epilepsia* 2001; 42(6): 796-803,

Engel JR., J. ILAE classification of epilepsy syndromes. *Epilepsy Research* 2006; 70(1):5-10.

Eglitis MA, Dawson D., *et al.* Targeting of marrow-derived astrocytes to the ischemic brain. *Neuroreport* 1999; 10(6): 1289-1292.

Elliott RC, Lowenstein DH. Gene expression profiling of seizure disorders. *Neurochem Res* 2004; 29(6):1083-1092.

Gastaut, H. Letter: 'Epileptic seizures'. *Dev Med Child Neurol* 1973; 5(5): 688-689.

Gastaut H, Gastaut JL., *et al.* Relative frequency of different types of epilepsy: an study employing the classification of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 1975; 16(3):457-461.

Gibbs RA. DNA amplification by the polymerase chain reaction. *Analytical Chemistry* 1990; 62(13):1202-1214.

Greenwood J. Mechanisms of blood-brain barrier breakdown. *Neuroradiology* 1991; 33(2): 95-100.

Haas S, Weidner N, Winkler J. Adult stem cell therapy in stroke. *Current Opin Neurol* 2005; 18(1):59-64.

Henderson G. Pharmacological analysis of synaptic transmission in *brain slices*. *Electrophysiology: A practical Approach*. Oxford University press, Oxford, p.89-107, 1993.

Imaizumi K, Ito S, Kutsukaka G, Takizawa T, Fujiwara K, Tsuchikawa K. The epilepsy-like abnormalities in a strain of mice. *Exp Anim* 1959; (8):6-10.

Joseph T, King Jr. and Carole C LaMotte. El Mouse as a Model of Focal Epilepsy: A Review. *Epilepsia* 1989; 30(3):257-265.

Kim JY, Koh HC, Lee JY, Chang MY., *et al.* Dopaminergic neuronal differentiation from rat embryonic neural precursors by Nurr1 overexpression. *J Neurochem* 2003; 85(6):1443-1454.

Koda M, Okada S, Nakayama T, Koshizuka S, Kamada T, Nishio Y., *et al.* Hematopoietic stem cell and marrow stromal cell for spinal cord injury in mice. *Neuroreport* 2005; 16(16):1763-1767.

Leppert M, McMahon WM, Quattlebaum TG., *et al.* Searching for human epilepsy genes: a progress report. *Brain Pathology* 1993; 3(4):357-369.

Li Y CJ, Chopp M. Adult bone marrow transplantation after stroke in adult rats. Adult bone marrow transplantation after stroke in adult rats. *Cell Transplant* 2001; 10(31):31-40.

Löscher W. Current status and future directions in the pharmacotherapy of epilepsy. *Trends Pharmacol Sci* 2002 b; 23(3):113-8.

Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009; 20(5-6):419-427.

Mendez-Otero R, Valle CZ, Gubert F, de Freitas GR, Santiago MF. Regulation and function of neurogenesis in the adult vertebrate brain. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2005; 38(10):1553-1559.

Mimura T, Dezawa M, Kanno H, Sawada H, Yamamoto I. Peripheral nerve regeneration by transplantation of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in adult rats. *J Neurosurg* 2004; 101(5):806-812.

Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 1997; 88:287-298.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G and Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology* 1986; 51: 263-273.

Murashima YL, Suzuki J, Yoshii M. Molecular mechanism of DNA fragmentation without cell loss in the epileptic mutant EL mice brain. *Neurology Asia* 2004; 9(1):82-84.

Mckay RD. Stem cell biology and neurodegenerative disease. *Phil Trans R Soc Lnd B Biol Sci* 2004; 359: 851-856.

Mcllmwain H, Buddle HL. Techniques in tissue metabolism.1. a mechanical chopper. *Biochemichal Journal* 1953; 53: 412-420.

Naruse H, Kato M. Kurokawa M, Haba R, Yabe T. Metabolic defects in a convulsive strain of mouse. *J Neurochem* 1960; 5(4):359-369.

Nomura T, Honmou O, Harada K, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD. I.v. infusion of brain-derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. *Neuroscience* 2005; 136(1):161-169.

Okabe M, Ikawa M, Kominami K., *et al.* Green mice as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Letters* 1997; 407(3):313-319.

Pivovarova NB, Andrews SB. Calcium-dependent mitochondrial function and dysfunction in neurons. *FEBS J* 2010; 277(18):3622-3636.

Romcy-Pereira RN, Gitaí DL, Gitaí LL, Leite JP, Garcia-Cairasco N, Paçó-Larson ML. Genes and epilepsy II: differential gene expression in epilepsy. *Rev Assoc Med Bras* 2008; 54(5): 461-466.

Rise ML, Frankel WN, Coffin JM and Seyfried TN. Genes for epilepsy mapped mouse. *Science*1991; 253:669-673.

Ruschenschmidt C, Koch PG, Brustle O *et al.* Functional properties of ES cell-derived neurons engrafted into the hippocampus of adult normal and chronically epileptic rats. *Epilepsia* 2005; 46(5):174–183.

Sander JV, Hart YMA. Epidemiologia da Epilepsia In: *Epilepsia: Um Guia Prático*. Merit-Publishing International, São Paulo, p.43-50, 1999.

Sanabria ERG, Cavalheiro EA. Epileptogênese: Contribuição dos Modelos Experimentais. In: Epilepsia. Guerreiro GMM; Cendes CAM; Lopes-Cendes F. Lemos editorial & Gráficos Ltda. São Paulo, p.29-57, 2000.

Schwartzkroin PA. Cellular electrophysiology of human epilepsy. *Epilepsy Res* 1994;17(3):185-192.

Suzuki J, Nakamoto Y. Seizure patterns and electroencephalograms of El mouse *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 1977; 43(3): 299-311.

Suzuki J, Nakamoto Y. Abnormal plastic phenomena of sensory-precipitated epilepsy in the mutant El mouse. *Exp Neurol* 1982; 75(2):440-452.

Suzuki J. Investigations of epilepsy with a mutant animal (EL mouse) model. *Epilepsia* 2004; 45(8):2-5.

Shetty A, Hattiangady K. Prospects of Stem Cell Therapy for Temporal Lobe Epilepsy. *Stem Cells* 2007; 25(10): 2396-2407.

Venturin GT, Greggio S, Marinowic DR, Zanirati G, Cammarota, Machado DC, Dacosta JC. Bone marrow mononuclear cells reduce seizure frequency and improve cognitive outcome in chronic epileptic rats. *Life Sciences* 2011; (89):229–234.

Zielinski JJ. Epidemiology of epilepsy. In: Laidlaw J; Richens A; Oxley J (Eds). A textbook of Epilepsy, Third edition, Churchill Livingstone, New York, p.21-48, 1988.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS



Ofício 061/09 - CEUA

Porto Alegre, 18 de junho de 2009.

Senhor Pesquisador:

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 09/00089, intitulado: **"Transplante de células tronco da medula óssea no modelo de epilepsia genética no camundongo EL"**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Relatórios do andamento do projeto devem ser entregues a este Comitê.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Anamaria Feijó
Coordenadora do CEUA - PUCRS

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa
IPB
N/Universidade

PUCRS

Campus Central

Av. Ipiranga, 6690 - Prédio 60 sala 314
CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br

Elsevier Editorial System(tm) for Experimental Neurology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Bone marrow mononuclear cells reduces seizures in EL mice/SUZ.

Article Type: Regular Paper

Section/Category: Neurological Disorders

Keywords: EL mice; genetic epilepsy; nested-PCR; EEG; electrophysiology.

Corresponding Author: Dr Jaderson Costa DaCosta, MD, PhD

Corresponding Author's Institution: Laboratório de Neurociências e de Sinalização Celular, Instituto do Cérebro, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS)

First Author: Simone D Salamoni

Order of Authors: Simone D Salamoni; Daniel Marinowic; Ramon H Lima; Alexandre Dolganov; Jaderson Costa DaCosta, MD, PhD

Abstract: Considering the high incidence of world population epilepsy (2-3%) and the elevated rate of resistance to treatment with available antiepileptic drugs (20 to 30%), it is essential the study of new therapies, among them strategies involving cell transplantation and stem cell therapy. This study aims to determine the effect of the epilepsy treatment by peripheral injection of bone marrow mononuclear cells (BMMCs) (C57BL/6-EGFP) in EL/SUZ genetic epilepsy mice divided into four groups: I) EL + control; II) EL + saline; III) EL + BMMCs; IV) EL + inactivated BMMCs. The animals were stimulated from birth once a week with a direct observation of behavioral manifestations from 30 days of life, defining seizures as each phase prodromal, ictal and post-ictal. The animals underwent transplantation in the tail vein respectively from 90 days of life with seizures already defined. To verify the actual presence of BMMCs, EGFP + transplants we used the nested-PCR technique. The animals after transplantation were observed in the presence of EGFP+ in the brain and also changes in the behavioral manifestations were observed using EEG to assess the intensity of the crisis and even its abolition. The electrophysiological recordings measure synaptic response using the paradigm of paired pulse stimulation and stimulation condition. Our results show a 50% reduction of seizures in the group treated with cells of the mononuclear fraction of bone marrow in the genetic model of epilepsy in EL/SUZ mice. We can conclude that the observation of changes in crisis manifestations and a tendency to decrease ones, is directly related to the presence of BMMCs EGFP cells + in the brain.

Dear Editor,

I Jaderson Costa da Costa, corresponding author of the manuscript, I am submitting the article titled **Bone marrow mononuclear cells reducer seizures in mice EL/Suz** for publication in the Journal Experimental Neurology.

Along with the submission of the manuscript, I would like to emphasize:

- All authors of this article participated directly in planning, implementation or analysis of this study;
- All authors of this paper read and approved the final version sent;
- The contents of this manuscript did not have the copyright has been previously published or awarded;
- The contents of this manuscript is not under consideration for publication in any other journal at the time;
- The contents of this manuscript will not be granted the copyright, nor shall be submitted or published in any other journal while acceptance by the editors of the Journal is under consideration;
- There are no manuscripts or abstracts directly related to the subject of this work published or unpublished for any author of this article;
- Representatives of my institution Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul are under informed and sending this article.

Best regards,

***Reviewer Suggestions**

L. Olson, Stockholm, Sweden

S. David, Québec, QC, Canada

J. DeFelipe, Madrid, Spain

Y. Mizuno, Bunkyo-ku, Japan

J. Engel, Los Angeles, CA, USA

Highlights

We identified the presence of EGFP⁺ transplant through the brain via the tail vein model of epilepsy genetics of EL mice.

Treatment with BMMC cells decreased the number of seizures in EL mice in the period of 240 days of observation.

The percentage of reduction in the number of attacks in BMMC-treated group was 50%.

In the EEG recording was possible to verify the decreased frequency of points in the group treated with BMMC.

The neuronal excitability assessed by paired pulse stimulation was greater in the group not treated with BMMC.

Bone marrow mononuclear cells reduces seizures in EL mice/SUZ

Simone Denise Salomoni^{a,d,f}, Daniel Marinowic^{b,d,f}, Ramon Hypolito Lima^{c,d,f}, Alexandre Dolganov^{a,d,f}, Jaderson Costa da Costa^{a,d,e,f}.

^aLaboratório de Neurociências, ^bLaboratório de Biologia Celular e Molecular, ^cCentro de Memória, ^dInstituto de Pesquisas Biomédicas, ^eInstituto do Cérebro, ^fPontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Abstract

Considering the high incidence of world population epilepsy (2-3%) and the elevated rate of resistance to treatment with available antiepileptic drugs (20 to 30%), it is essential the study of new therapies, among them strategies involving cell transplantation and stem cell therapy. This study aims to determine the effect of the epilepsy treatment by peripheral injection of bone marrow mononuclear cells (BMMCs) (C57BL/6-EGFP) in EL/SUZ genetic epilepsy mice divided into four groups: I) EL + control; II) EL + saline; III) EL + BMMCs; IV) EL + inactivated BMMCs. The animals were stimulated from birth once a week with a direct observation of behavioral manifestations from 30 days of life, defining seizures as each phase prodromal, ictal and post-ictal. The animals underwent transplantation in the tail vein respectively from 90 days of life with seizures already defined. To verify the actual presence of BMMCs, EGFP + transplants we used the *nested*-PCR technique. The animals after transplantation were observed in the presence of EGFP+ in the brain and also changes in the behavioral manifestations were observed using EEG to assess the intensity of the crisis and even its abolition. The electrophysiological recordings measure synaptic response using the paradigm of paired pulse stimulation and stimulation condition. Our results show a 50% reduction of seizures in the group treated with cells of the mononuclear fraction of bone marrow in the genetic model of epilepsy in EL/ SUZ mice. We can conclude that the observation of changes in crisis manifestations and a tendency to decrease ones, is directly related to the presence of BMMCs EGFP cells + in the brain.

Keywords: EL mice, genetic epilepsy, *nested*-PCR, EEG, electrophysiology.

Epilepsy

Epilepsy is a type of brain disorder characterized clinically by sudden behavioral changes (seizures) that tend to repeat themselves over the patient life and affects 2% to 3% of world population. These seizures reflect abnormal and paroxysmal electrical activity preferentially affecting one or more areas of the brain and can be caused by many structural or neurochemical pathologies (Zielinski, 1988). Accordingly, there is a difference between the definition of epilepsy and seizure. In general the diagnosis of epilepsy implies a persistent epileptogenic abnormality of the brain, causing recurrent and spontaneous crisis. Thus, epilepsy assumes the existence of an intrinsic epileptogenic abnormality, endogenous to the brain itself and that is present even between attacks, independent of any condition or an acute insult (Sander, 1999). This property of "epileptic brain" can lead to recurrent crises over a relatively short period of time, for many years or even throughout the life. Epileptic brain activity can be triggered by various factors, and therefore the epilepsy is considered a complex and multifactorial disorder.

The epileptogenic nature of the disorder is essential for etiologic classification of the epilepsies. In this sense, the focal and generalized epilepsies have been classified as symptomatic, idiopathic or probably symptomatic. The symptomatic epilepsies are those in which it is possible to detect anatomical or histological lesions. When it is not possible to detect the primary dysfunction of symptomatic epilepsy, this is called "probably symptomatic" (cryptogenic). In idiopathic epilepsies, in turn, the process of epileptogenesis is not assigned to any specific endogenous or exogenous insult. In this case it is said that epilepsy is the individual itself. Today, we know that the majority of idiopathic epilepsies are caused by genetic mutations (Sanabria and Cavalheiro, 2000).

There are numerous animal models of epilepsy or seizures. The main models induce a cascade of molecular and structural events that result in changes in neuronal intrinsic properties, as well as in neural networks, making them epileptogenic. In animal models called acute, the animal has seizures only during the action of the inducing agent, whereas in chronic models, the seizures recur at varying intervals of time after induction, and can follow the entire animal life (Knight et al. 1991; Sanabria and Cavalheiro, 2000).

In chronic models of epilepsy, there are acquired (symptomatic) and genetic models. The first category includes models in which epilepsy is induced by chemical or electrical methods in healthy animals (non-epileptic), usually rats. The genetic models can be subdivided into those that employ animals with spontaneous mutations or induced mutations animals like transgenic mice, or mice in which one or more genes are removed from the genome (*knockout*) (Suzuki, 2004).

Genetic epilepsy

The Classification of Epilepsies and Epileptic Syndromes proposed by the ILAE (*International League Against Epilepsy*) divides epilepsies into idiopathic, symptomatic and cryptogenic (Engel et al., 2006). The group of idiopathic epilepsies corresponds to approximately 50% of all human epilepsies (Berkovic, 1999). The genetic predisposition is more marked in the idiopathic epilepsies.

At first, it was believed that idiopathic generalized epilepsy had a strong genetic component, but that partial epilepsies were mainly caused by environmental factors. The genetic basis of epilepsy has long been speculated since the beginning of medicine. Several epidemiological 50 and 60 years studies demonstrated the first scientific evidences for a genetic predisposition in the various forms of epilepsy (Romcy-Pereira et al., 2008).

In 70 years, Andermann (1982) proposed a multifactorial model for epilepsy, in which genetic and environmental factors interact to determine the risk of disease familial recurrence. Currently, the idiopathic epilepsies are seen as complex in terms of genetic inheritance. The theories about genes implicated in transmission of epilepsy can be proven experimentally with recent advances in molecular biology. In addition, interactions between multiple genes and environmental factors may be better investigated. Many of the approximately 30 000 human genes may be associated with epilepsy through genetic alterations or changes in gene expression. The gene changes are those that occur in the gene physical structure, as mutations or polymorphisms and contribute to epileptogenesis by acting directly as primary cause, or indirectly, in establishing of the susceptibility threshold. This type of change, transmitted hereditarily, reflects changes in the levels or the localization of gene products and is triggered by epileptogenic insults. In contrast, the modulation of gene expression influences the activity of the encoded transcripts and proteins, even in the absence of physical changes in the DNA. This type of modulation can alter the levels or localization of mRNAs and proteins, triggered by epileptogenic insults (Berkovic, 1999). Therefore, changes in gene expression are one of the main brain tissue responses to such insults (Romcy-Pereira et al., 2008).

At present, the research approaches are based on individual analysis of single genes expression, selected according to certain functionality, or the analysis of expression of multiple genes simultaneously, not directly related to the process of neuronal hyper excitability (Elliott et al. 2004).

Mice EL/SUZ

The EL mouse was described in 1954 by Japanese researchers studying the hydrocephalus. The original report described a mutant race congenital derived from DDY mice (the "mother race") who experienced tonic-clonic seizures induced by vestibular stimulation (shaking). The EL mouse was recorded internationally as an epileptic mutant in 1964 (Joseph et al., 1989).

The tendency to crisis in EL is inherited phenomenologically by an autosomal dominant trace. Seyfried and colleagues (1991) demonstrated that the EL inheritance is polygenic. At least two genes are involved: EL-1, which is located in the distal region of the centromere on chromosome 9, and EL-2 on chromosome 2. In addition, several surrounding risk factors seem to influence the seizure susceptibility development in EL (Rise et al., 1991).

In this model, the ictogenesis was established about 10 weeks of life, while the epileptogenesis was established by the repeated seizures during the development. The DNA fragmentation leads to apoptosis in the tissue and the hippocampal neurons susceptibility increases after repeated seizures during the final period of development, probably due to the imbalance between protection mechanism and inactivation of pro-apoptotic pathways (Murashima et al., 2004).

In this model, seizures originate near the parietal lobe and then propagate to other brain regions, such as the hippocampus. The crisis manifest around 80-100 days of life and are also accompanied by EEG abnormalities, vocalization, incontinence, loss of postural balance, increased salivation and facial automatisms. Manipulations of the animal and vestibular stimulation cause the manifestation of the crisis and its incidence increases with stimuli repetition. The prevalence after stimulation eventually reaches 100% (Suzuki et al., 1982).

Bone marrow stem cells (BMMCs)

The adult stem cells are undifferentiated cells present in a differentiated tissue. These can be obtained from umbilical cord blood, bone marrow or other adult tissues. These cells are capable of self-renewal throughout the organism life and have been identified in various organs and tissues including the nervous system. This little proliferative capacity of adult stem cells becomes an advantage for the therapeutic use of such a long time decreases the probability of tumor formation from these cells (Morrison et al., 1997).

The bone marrow (BM) is a permanent source of stem cells containing three types of stem cell populations: hematopoietic, stromal (mesenchymal) and possibly endothelial progenitor cells. It has been shown that bone marrow cells of mice can be derived in microglia and neurons *in vivo* (Azizi et al., 1998). However, it is not known which subpopulation of BM was able to express this neuronal development. In addition, transdifferentiation of BMMCs in the central nervous system neurons was also demonstrated in humans. It seems that the incorporation of these cells in the nervous tissue is enhanced in the face of tissue damage. Even though these cells do not regenerate tissue damaged by transdifferentiate into specific cell type, probably the recovery of brain function or neurological disease stabilization occurs by other biological mechanisms such as cell fusion, release of trophic factors, cytokines or activation of endogenous cells (Eglitis et al., 1999; Costa-Ferro et al., 2011).

In order to explore this potential, our study was to determine the effect of BMMCs in the epilepsy treatment by peripheral cell injection of the mononuclear portion of the bone marrow in EL/SUZ mice with genetic epilepsy.

MATERIALS AND METHODS

Experimental groups

Female EL/SUZ mice weighing 25 to 30 grams were used. The animals were housed in individual cages and kept freely access to food and water under a light /dark cycle, with light onset at 7:00 AM. The BMMCs were obtained from EGFP (Okabe et al., 1997) transgenic C57BL/6N male mice, weighing 25 to 30 grams.

The present study was distributed in 4 groups: I) EL + control (n=10); II) EL + saline (n=10); III) EL + BMMCs (n=10); IV) EL + inactivated BMMCs (n=10). The mice were stimulated since birth once a week with direct observation on the behavioral activity (epileptic seizures). The transplants ($200\mu\text{L}/10^5$ BMMCs) were performed through the tail vein when the animals were 3 months old

after rhythmic vestibular stimulation, which makes possible that the BMMCs cross the blood brain barrier. The seizures counting by the observers started 24 hours after the transplants.

PCR detection of the presence of EGFP transplanted

The *Polymerase Chain Reaction* (PCR) technique allows the amplification of a specific DNA region, which can be visualized through the analysis by agarose gel electrophoresis (Gibbs et al., 1990). The PCR has been investigated as an alternative high sensitive and specificity for the rapid diagnosis.

A *nested-PCR*, which is constituted by two successive amplifications of the molecular marker, has been defended because it reconciles even greater sensibility and specificity. This study proposes to evaluate the applicability of the *nested-PCR* technique in the identification of EGFP+ on BMMCs transplanted animals. We used five animals per group to the PCR analysis in the period of 24, 30, 60, 90 and 120 days.

Frequency of seizures after transplantation of BMMCs

Seizures manifestations were considered as each phase of the stimulated EL mice in prodromal, ictal and postictal defined. In this study were included animals that showed the 3 phases. The observation occurred once a week and the stimulation was a pendulum movement.

The alteration on the number of seizures before and after transplantation were used as a parameter to infer that the BMMCs were able to achieve the injured nervous tissue and improve the function showing reduction on the seizures (Suzuki et al., 2004).

Electrophysiology

The study of the functionality of the transplanted cells was evaluated using electrophysiological recording (Schwartzkroin, 1994). To record field potential were used borosilicate micropipettes filled with Ringer showing a resistance of 0,5 to 10M Ω measured by an electrode with platinum filament. The potential difference was recorded at ground potential reference electrode fixed in a platinum-iridium in contact with the perfusion solution in the recording chamber. When obtaining the simultaneous recording of extracellular activity, we identified repetitive field potentials (spikes) in growth and high frequency, characterizing the expression of extracellular ictal activity. The electrophysiological signs were captured and pre-amplified initially with pre-amplifiers for recording extracellular (EC) ("head stages"), and amplified by the recording equipment (Axon, 1993).

Brain slices

The brain slices preparation were developed by McIlwain *et al.* in the 50's, in order to study the biochemistry of the CNS, however, this procedure has expanded to areas other than biochemistry, offering numerous opportunities to search for anatomists, physiologists, pharmacologists, molecular biologists and biophysicists to study the basic mechanisms of epilepsy, specifically in the study of temporal lobe epilepsy. This technique allows the *in vitro* study of the extracellular field activity with a possibility to visualize the stimulation spot. Another facility is the possibility of manipulation of the intra and extra-cellular medium, by modifying the ionic concentration. Through this, it is possible not only mimic normal morpho-physiological as well as pathological conditions (McIlwain *et al.*, 1953).

RESULTS

Detection of EGFP+ of transplanted BMMCs in EL/SUZ mice

The experimental group under investigation showed positive results at all investigated times after transplantation (Figure 1 and 2), where was identified the presence of BMMCs EGFP+ in the brain tissue. Our results indicate that the bone marrow mononuclear cells crossed the blood brain barrier through transplantation via tail vein of the EL/SUZ mice at the moment of seizure after stimulation.

EL/SUZ mice treated with BMMCs has the potential to reduce or stop seizures

Through the observations made each week of stimulation we evaluated the number of seizures of each animal. The seizures were counted until the 240-day with 4 observations per month. Our results showed that the group treated with BMMCs decreased the frequency of seizures (Figure 3 and 4).

In the period that preceded the transplants the number of seizures was also evaluated and computed. When we compared these data to the period after BMMCs transplantation we verify a gradual decrease on the seizures frequency (Figure 5 and 6).

EEG record after transplantation to confirm the decrease and/or the intensity of convulsive seizure.

We found that baseline EEG tracing after vestibular stimulation in the saline group strongly increases the electrical activity characterizing the Ictal's phase on the electroencephalographic trace comparing to the treated group, note that even with the induction of stimulus the treated group shows a lower intensity electrical activity (Figure 7 and 8).

Differences on the neuronal excitability caused by the BMMCs treatment through the electrophysiological Paired Pulse protocol.

One of the electrophysiological techniques used to study the neuronal excitability in a neurons population is the Paired Pulse protocol, which consists on the application of 2 electrical simultaneous stimuli on the Schaffer's collateral and capturing the EPSP on the *stratum radiatum* layer of the CA1 region. On the hippocampus the amplitude of the second EPSP depends on the second EPSP amplitude.

To perform this experiment we used 12 mice split in 3 different groups: Control (healthy BALBC mice) n=5 recordings, EL+ saline n=4 recordings, EL+BMMCs n=5 recordings (Figure 9). After we assure the baseline excitability and neuronal excitability by Paired Pulse protocol we applied a high frequency (100Hz) conditioning stimulus (CS). The intensity of the current during the CS was that necessary to induce PS of maximum amplitude.

DISCUSSION

Our study aimed to evaluate the effect of transplantation of bone marrow mononuclear fraction under the convulsive seizures on the model of EL/SUZ genetic epilepsy model in mice. The animals were observed since the 30-day of life with vestibular stimuli (come and go) once a week to be used as pre transplants control. After 80 days of birth the animals received the transplants and were stimulated to control the number of seizures during the 240 days of experiment.

We showed by *nested*-PCR technique, with two successive amplifications of the molecular marker, that the BMMC transplanted by animals tail vein, migrate to the brain and cross the blood brain barrier (BBB) in the genetic model of epilepsy after stimulation and convulsion.

The study also shows that BMMC-GFP+ of mice transplanted by systemic way, are able to cross the BBB and migrate to the brain. The BBB is a barrier between blood and brain and the brain where capillary endothelial cells form impermeable joints between adjacent cells (Betz, 1992; Greenwood, 1991). Twenty-four hours, 30, 60, 90 and 120 days after cell transplantation, the BMMC were present in the brain. However, as our study is about genetic epilepsy, we believe that the BBB is not an obstacle to the entry of the BMMC, since it opens during seizures (Costa, 1972). Our results showed a gradual reduction in seizure frequency during the 240 days of observation with stimulus reaching 50% of seizures reduction. To prove this, we performed electroencephalographic record of the brain electrical activity, which are an indicator of brain excitability and their location. We observed a great intensity of electrical activity in the ictal phase in EL + Saline group compared with the group EL + BMMC in the EEG tracings.

Suzuki and colleagues demonstrated that the EEG recording with implanted electrodes was carried out in EL mice moving freely during the seizure. The crisis was induced by sensory stimuli evoked by throwing the mouse up in the air. The crisis registry was in three stages: prodromal, ictal and postictal and predominant tonic-clonic seizures were more frequent, starting in the parietal cortex

and extending to other regions of the brain (Suzuki et al., 1977).

This is a pioneer study in genetics epilepsy in EL/SUZ mouse model treated with bone marrow mononuclear cells. Such treatment may be useful because these cells have the potential to restore the neurochemical circuit altered during the course of the disease.

In recent years, studies that search for neurodegenerative diseases treatments based on stem cells have been viewed with much interest. Various approaches have been tested using cell therapy in epilepsy models. Ruschenschmidt and colleagues (2005) demonstrated that embryonic stem cell-derived neurons exhibited properties characteristic of neurons when transplanted into the hippocampus of chronic epileptic animals.

Chu and colleagues (2004) examined the effects of neural stem cells obtained from ventricular region in embryonic human on the spontaneous recurrent seizures (RECs) mice that underwent (have gone through) status epilepticus (SE). In this study, the cells were also administered during the acute stage of epilepsy.

Recently, Costa Ferro and colleagues (2010) demonstrated that 24 hours after the intravenous SE, BMMCs are able to suppress premature seizures, reducing the epileptogenesis induced by epilepsy model.

Venturini and colleagues (2011) demonstrated that BMMC administered during chronic period reduce the crisis and promote reversion of cognitive impairment.

Another focus of this study was to investigate the effect of bone marrow mononuclear cells transplantation neuronal excitability and conditioning stimulus. Our results showed that the animals not treated with BMMC have a significantly higher neuronal excitability comparing to the control and treated group, demonstrating the therapeutic effect of BMMC. In the conditioning stimulus study, we could observe that the groups showed facilitated Long-Term Potentiation (LTP) induction in control and BMMC groups and an increased amplitude of excitatory postsynaptic potential in the EL + Saline group. We believe that the EL + saline group showed a greater facilitation of LTP due to an increased neuronal excitability.

From the pathological point of view, several studies have shown an increased expression of LTPs rather than a partial or total reduction in the ability to induce Long-Term Depression (LTDs). This has been observed in ischemia models, neurotoxins administration, genetic manipulation and others. In this context, the role of NMDA receptors in the excessive increase of intracellular calcium concentration and in excitotoxic process as a whole is well defined (Calabresi et al., 1992).

About the synaptic plasticity phenomena in the corticostriatal pathway, it is already well established the existence of at least two forms of LTP: physiological and pathological. The pathological form triggered primarily by an excessive increase in intracellular Ca^{2+} in the postsynaptic neuron, lead to cell death by activation of several enzymatic cascades. This process probably result in an interference with various stages of the mitochondrial respiratory chain, leading to a failure in ATP production, and increased formation of reactive oxidative specimens that react with enzymes of vital importance in maintaining the transmembrane ionic homeostasis (Pivovarova et al. 2010).

The induction facilitation of LTP in hippocampal slices of rats suggests: a) an increase in synaptic transmission efficiency and / or in neuron excitability, after transplantation, b) the transplanted cells participate in the neurosynaptic circuit preservation or regeneration involved in LTP. There is a wide range of agents that can modify neuroplasticity processes. These are called growth factors, neurotrophic factors or neurotrophins. The growth factors are special endogenous proteins that promote survival, division and growth, as differentiation and morphological plasticity of neural cells (Berg-Rosado et al., 2000).

Despite the beneficial effect of these therapies in animal models, the mechanism of action of these cells is still a great controversy and is under investigation in several laboratories. The initial hypothesis was that these cells showed a great plasticity and could differentiate into cells of the treated tissue.

In neurological diseases, the damage is often irreversible. The adult central nervous system (CNS) has numerous cells with regenerative potential but it can't recruit them effectively. Thus, strategies to promote increased number and function of endogenous regenerative cells, or transplant cells with regenerative potential in the CNS, may represent new therapeutic options in this case.

The neurotrophic factors exert their effects through membrane receptors that connect with different intracellular molecular cascades, which can modify gene expression and protein synthesis. This, in turn, enables them to induce and modulate neuroplasticity processes for growth or functional plasticity (Aton et al., 1996).

Previous studies have suggested that bone marrow cells induce changes in tissue damage through different mechanisms, such as, production of neurotrophic factors (Chen et al., 2003), stimulation of endogenous proliferation, secretion of anti-epileptic factors (Shetty et al., 2007), or interaction of exogenous and endogenous stem cells, developed to provide neuroprotection as a trophic support (Nomura et al., 2005).

CONCLUSION

Our results showed that the genetic model of epilepsy EL/SUZ treated with BMMCs decrease in 50% the seizures; the transplanted cells are present 24 hours after the procedure on the brain and lasts until the 120th day. We found that the reduction in seizures by the treated group was confirmed by EGG. Likewise, the electrophysiological recordings by Paired Pulse showed that the treated group a decreased neuronal excitability compared to the knockout group. In the same way, the simultaneous recordings of multiple action potentials by conditioning stimulus and consequent depolarization of postsynaptic sites could reinforce the idea of a therapeutic effect by transplantation of BMMCs.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Instituto de Pesquisa Biomédica (IPB) and Instituto do Cérebro (InsCer) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande 569 do Sul (PUCRS).

REFERENCES

ANDERMANN E. Multifactorial inheritance of generalized and parcial epilepsy. In: Anderson VE; Penry JK; Sing CF (Eds). Genetic Basis of the Epilepsies, Raven Press, New York, p.355-374, 1982.

ATON MJ & WHITTEMORE SR. Autocrine BDNF secretion enhances the survival and serotonergic differentiation of raphe neuronal precursor cells grafted into the adult rat CNS. *Exp Neurol* 1996; (2):105-14.

-
- AZIZI AS, Strok SD, Augelli BJ, Digirolamo C., et al. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats-similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl. Acad Sci USA* 1998; (95): 3908-13.
- BERGADO-ROSADO JA, Almaguer-Melian. Cellular mechanisms in neuroplasticity. *Rev Neurol* 2000; (11):1074-95.
- BERKOVIC SF, Genton P, Hirsch E, Picard F. Genetics of focal epilepsies. Clinical aspects and Molecular biology. John Libbey & Company Ltd. London, p. 229-237, 1999.
- BETZ AL. An overview of the multiple functions of the blood-brain barrier. *NIDA Res Monogr* 1992; (120): p.54-72.
- BLISS TV, Collingridge GL. A Synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993; (361): 31-39.
- CALABRESI P, Maj R, Mercuri NB, Bernardi G. Long-term synaptic depression in the striatum: physiological and pharmacological characterization. *J Neurosci* 1992 a;(12):4224-4233.
- COSTA JC. Influence of electro seizures on the blood brain barrier permeability to the triplan blue. *Arquivos de Neuro-psiquiatria* 30:2-7, 1972.
- COSTA-FERRO ZS, Vitola AS, Pedroso MF, Cunha FB, Xavier LL, Machado DC, et al. Prevention of seizures and reorganization of hippocampal functions by transplantation of bone marrow cells in the acute phase of experimental epilepsy. *Seizure* 2010; 19(2):84-92.
- CHEN J, Li Y, Katakowski M, Chen X, Wang L, Lu D, Lu M, Gautam SC, Chopp M. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *Journal of Neuroscience Research* 2003 (6):778-786.
- CHU K, Kim M, Jung KH, Jeon D, Lee ST, Kim J, Jeong SW, Kim SU, Lee SK, Shin HS, Roh JK. Human neural stem cell transplantation reduces spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus in adult rats. *Brain Research* 2004; 1023(2):213-221.
- DEZAWA M, Takahashi I, Esaki M, Takano M, Sawada H. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. *Eur J Neurosci* 2001; 14(11):1771-78.
-

-
- EGLITIS MA, Dawson D., et al. Targeting of marrow-derived astrocytes to the ischemic brain. *Neuroreport* 1999; 10(6): 1289-92.
- ENGEL JR., J. ILAE classification of epilepsy syndromes. *Epilepsy Research* 2006; (70):5-10.
- ELLIOTT RC, Lowenstein DH. Gene expression profiling of seizure disorders. *Neurochem Res* 2004; 29(6):1083-92.
- GASTAUT H. "Letter: 'Epileptic seizures'." *Dev Med Child Neurol* 1973; 15(5): 688-9.
- GIBBS RA. DNA amplification by the polymerase chain reaction. *Analytical Chemistry* 1990; 62(13):1202-14.
- GREENWOOD J. Mechanisms of blood-brain barrier breakdown. *Neuroradiology* 1991; (33): p.95-100.
- JOSEPH T, King Jr. and Carole C LaMotte. El Mouse as a Model of Focal Epilepsy: A Review. *Epilepsia* 1989; 30(3):257-65.
- KIM JY, Koh HC, Lee JY, Chang MY., et al. Dopaminergic neuronal differentiation from rat embryonic neural precursors by Nurr1 overexpression. *J Neurochem* 2003; 85(6):1443-54.
- KODA M, Okada S, Nakayama T, Koshizuka S, Kamada T, Nishio Y., et al. Hematopoietic stem cell and marrow stromal cell for spinal cord injury in mice. *Neuroreport* 2005; (16):1763-67.
- Li Y CJ, Chopp M. Adult bone marrow transplantation after stroke in adult rats. Adult bone marrow transplantation after stroke in adult rats. *Cell Transplant* 2001; 10(31):31-40.
- MURASHIMA YL, Suzuki J, Yoshii M. Molecular mechanism of DNA fragmentation without cell loss in the epileptic mutant EL mice brain. *Neurology Asia* 2004;9(1):82-84.
- MORRISON SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 1997; (88):287-98.
- MIMURA T, Dezawa M, Kanno H, Sawada H, Yamamoto I. Peripheral nerve regeneration by transplantation of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in adult rats. *J Neurosurg* 2004; 101(5):806-12.
- MCLLMWAIN H, Buddle HL. Techniques in tissue metabolism.1. a mechanical chopper. *Biochemical Journal* 1953; (53): 412-20.
-

NOMURA T, Honmou O, Harada K, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD. I.v. infusion of brain-derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. *Neuroscience* 2005; (1):161-169.

OKABE M, Ikawa M, Kominami K., et al. Green mice as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Letters* 1997; (407):313-19.

PIVOVAROVA NB, Andrews SB. Calcium-dependent mitochondrial function and dysfunction in neurons. *FEBS J* 2010, Jul 26.

RISE ML, Frankel WN, Coffin JM and Seyfried TN. Genes for epilepsy mapped mouse. *Science* 1991; (253):669-673

ROMCY-PEREIRA RN, Gitaí DL, Gitaí LL, Leite JP, Garcia-Cairasco N, Paço-Larson ML. Genes and epilepsy II: differential gene expression in epilepsy. *Rev Assoc Med Bras* 2008; 54(5): 461-6.

RUSCHENSCHMIDT C, Koch PG, Brustle O et al. Functional properties of ES cell-derived neurons engrafted into the hippocampus of adult normal and chronically epileptic rats. *Epilepsia* 2005; 46 (suppl 5):174–183.

SANABRIA ERG, Cavalheiro EA. Epileptogênese: Experimental modeling contribution. In: *Epilepsia*. Guerreiro GMM; Cendes CAM; Lopes-Cendes F. Lemos editorial & Gráficos Ltda. São Paulo, p.29-57, 2000.

SANDER JV, Hart YMA. Epilepsy's epidemiology. In: *Epilepsy: A Practical Guide*. Merit-Publishing International, Sao Paulo, p.43-50, 1999.

SUZUKI J, Nakamoto Y. Abnormal plastic phenomena of sensory-precipitated epilepsy in the mutant El mouse. *Exp Neurol* 1982; (75):440-52.

SUZUKI J, Nakamoto Y. Seizure patterns and electroencephalograms of El mouse. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 1977; 43(3): 299-311.

SUZUKI J. Investigations of epilepsy with a mutant animal (EL mouse) model. *Epilepsia* 2004; 45(8):2-5.

SCHWARTZKROIN PA. Cellular electrophysiology of human epilepsy. *Epilepsy Res* 1994;17(3):185-92.

SHETTY A, Hattiangady K. Prospects of Stem Cell Therapy for Temporal Lobe Epilepsy. *Stem Cells* 2007, June 28.

VENTURIN GT, Greggio S, Marinowic DR, Zanirati G, Cammarota, Machado DC, Dacosta JC. Bone marrow mononuclear cells reduce seizure frequency and improve cognitive outcome in chronic epileptic rats. *Life Sciences* 2011; (89):229–234.

ZIELINSKI JJ. Epidemiology of epilepsy. In: Laidlaw J; Richens A; Oxley J (Eds). A textbook of Epilepsy, Third edition, Churchill Livingstone, New York, p.21-48, 1988.

LEGENDS

Figure 1. Photographer of the PCR products for the GFP gene after electrophoresis on 2% agarose gel. 24: PCR product with primers for a segment of the GFP gene 24 hours after transplantation of mononuclear cells, 30d, 60d and 90d, the PCR product with primers for a segment of the GFP gene 30 days, 60 days and 90 days, respectively, after transplantation of mononuclear cells, PC: positive control using DNA sample from C57/BL6 mice transgenic for the GFP gene; RC: Control of the reaction without the presence of DNA, Marq: molecular weight marker 100 bp.

Figure 2. Photographer of the PCR products of the GFP gene after electrophoresis on 2% agarose gel 120 days after transplantation of mononuclear cells. Marq: molecular weight marker 100bp; SS: PCR product with primers for a segment of the GFP gene in animals that received saline solution; SC: PCR product with primers for a segment of the GFP gene in animals that received stem cells (mononuclear cells), ISC: the PCR product with primers for a segment of the GFP gene in animals that received stem cells (mononuclear cells) inactivated, PC: positive control using DNA sample from C57/BL6 mice transgenic for the GFP gene; RC: Control reaction without the presence of DNA.

Figure 3. Counting on the number of seizures by rhythmic vestibular stimulation during the 240 days of observation. We used ANOVA following by Tukey, showing that the BMMCs group was significantly different (**P=0.0001). * Control vs. BMMC; # Saline vs. BMMC; † Inactivated BMMC vs. BMMC. During 240 days of observation the group treated with BMMCs showed decrease in the average number of seizures ($2,7 \pm 0,49$) compared to the control groups ($3,9 \pm 0,05$), saline ($3,9 \pm 0,05$) and deactivated BMMCs ($3,8 \pm 0,1$).

Figure 4. The average of seizures evaluated monthly in the 4 groups during 240 days of observation. We used ANOVA followed by Tukey test showed in 30 days p=0,0023, 60 days p=0,0249; 90 days p=0,0001; 120 days p=0,0356; 150 days p=0,0071; 180 days p=0,0001; 210 days p= 0,0001; 240 days p=0,0002; * Control vs. BMMC; # Saline vs. BMMC; † Inactivated BMMC vs. BMMC.

Figure 5. Seizures behavior in comparison to the treatment time before and after BMMCs transplants in the EL/SUZ mice.

Figure 6. Seizures decrease percentage on the treated group with BMMCs over time within 240 days of observations was gradually reaching 50%.

Figure 7. Registration post ictal stimulation of mouse EL + saline after transplantation with 37 points ictal frequency (A) and 36 points ictal (B) 1min. Mean EL+Saline 4.970, 0.300 \pm standard error.

Figure 8. Registration post ictal stimulation of EL + mice after BMMC transplantation, with 18 points ictal frequency (A) and 7 points (B) 1min. Mean EL + BMMC 3.956, 0.0992 \pm standard error. Using t-test statistical difference, * P = 0.0404 between groups EL + BMMC vs EL+Saline.

Figure 9. Paired Pulse protocol showing EPSP to study neuronal excitability. Here we used ANOVA followed by Tukey to compare the groups: Control vs. Saline*** e Saline vs. BMMC*** (***P= 0,0001). Each point on the graph represents the mean of amplitudes of the spikes population of 3 minutes \pm Standard error, with current intensity of 60 μ A (Figure 10).

Figure 10. Increase of the excitatory postsynaptic potentials immediately after high frequency conditioning stimulus (arrow) as well as on the maintenance phase. Using ANOVA followed by Turkey we found statistical differences, ***P= 0,0018 between the groups: control vs. saline*; Saline vs. BMMC**. Each point on the graph represents the mean of amplitudes of the spikes population of 3 minutes \pm Standard Error.

