

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA E CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEUROCIÊNCIAS**

**EFEITO DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS E DE  
CÉLULAS LISADAS DA MEDULA ÓSSEA EM RATOS SUBMETIDOS AO  
MODELO LÍTIO-PILOCARPINA**

**TATIANE CAMOZZATO**

**PORTO ALEGRE**

**2009**

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

**TATIANE CAMOZZATO**

**EFEITO DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS E DE  
CÉLULAS LISADAS DA MEDULA ÓSSEA EM RATOS SUBMETIDOS AO  
MODELO LÍTIO-PILOCARPINA**

**PORTO ALEGRE, 2009**

**Tatiane Camozzato**

**Efeito do Transplante de Células Tronco Mesenquimais e de células lisadas da medula óssea em ratos submetidos ao modelo lítio-pilocarpina**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Ciências da Saúde: Neurociências

**ORIENTADOR: PROF. DR. Jaderson Costa da Costa**

**CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. Denise Cantarelli Machado**

**Porto Alegre, 2009**

C185e Camozzato, Tatiane.

Efeito do transplante de células tronco mesenquimais e de células lisadas da medula óssea em ratos submetidos ao modelo lítio-pilocarpina / Tatiane Camozzato ; orient. Jaderson Costa da Costa, co-orient. Denise Cantarelli Machado. Porto Alegre: PUCRS, 2009.

112 f.: gráf. il. tab.

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. Epilepsia. 2. Epilepsia/Terapia. 3. Células-Tronco. 4. Células-Tronco Mesenquimais. 5. Histologia. 6. Epidemiologia Experimental. I. Costa, Jaderson Costa da. II. Machado, Denise Cantarelli. III. Título.

CDD 616.853

NLM WL 385

Bibliotecária Responsável:  
Sabrina Caimi Silva da Costa  
CRB10/1606

Para Flávio por todo amor e companheirismo.

Para a nossa bebezinha “Alice” que está  
para chegar esse ano.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, professor Jaderson Costa da Costa, por transmitir seu entusiasmo e paixão pela ciência, por partilhar seu conhecimento científico e por desempenhar um papel importante na minha formação e aprendizado na ciência e na vida.

À minha co-orientadora, professora Denise Cantarelli Machado pela disponibilidade em ajudar sempre.

Ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica e Ciências da Saúde: área de concentração: Neurociências – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

À Zaquer Costa-Ferro por me inserir no Neurolab e me dar um grande apoio no início do meu doutorado. À Fernanda Borba Cunha pela ajuda no início dos experimentos.

Aos colegas do Neurolab, obrigada pelo apoio, pela amizade, pelo excelente ambiente de trabalho e pela contribuição inestimável de cada um, pequena ou grande, para a realização desse trabalho.

Agradeço especialmente a Gleice e Zuzete, meus dois braços direitos na realização desse trabalho; Ricardo, Samuel, Mariana, Daniela e Simone pela força na resolução

de problemas e pela constante disposição em ajudar; Gianina pelo grande apoio na reta final.

Aos colegas do laboratório de Pneumologia/IPB-PUCRS, em especial Christian Viezzer e Daniel Marinowik.

Aos colegas do Centro do Memória por possibilitar a realização dos testes comportamentais.

Aos colegas do CEFET/SC, obrigada por todas as trocas de horários de aula e por entenderem a minha ausência em muitas atividades porque eu precisava estar em Porto Alegre.

À Profa. Rita de Cássia Flôr por ter garantido a minha capacitação apesar de alguns colegas terem se posicionado contrários a essa decisão. Obrigada pela coragem! Essa tese é o resultado da sua decisão acertada.

Ao Prof. Giovani Nogueira por nunca ter me dito não!!! Sempre aceitou fazer trocas comigo e muitas vezes dar aula ou fazer visitas no meu lugar. Sempre me tranquilizando que estava tudo bem.

Ao meu esposo Flávio pela ajuda desde os experimentos até a correção final da tese.

À minha Irmã Diuline por estar sempre presente. À minha Mãe Eronita por existir na minha vida.

À Elisa Winkelmann-Duarte por abrir portas assim possibilitando a realização da parte de histologia na UFSC.

## RESUMO

A epilepsia atinge cerca de 1% da população mundial, sendo que aproximadamente 30% desses pacientes não respondem ao tratamento medicamentoso. Por sua vez, as células tronco representam uma esperança de tratamento da epilepsia, porquanto têm grande capacidade de proliferação, diferenciação e regeneração de tecidos, podendo restaurar circuitos neurais e restabelecer a excitabilidade neuronal fisiológica. O objetivo deste estudo foi verificar se as células tronco mesenquimais (CTM) ou se células lisadas (Lise Celular) obtidas da medula óssea apresentam potencial terapêutico no controle das crises epiléticas e do dano neuronal progressivo induzido pela epilepsia experimental. Os animais foram injetados com lítio-pilocarpina (127 mg/kg e 60 Mg/kg i.p., respectivamente) para indução de status epilepticus (SE). As crises comportamentais foram classificadas de acordo com a escala de Racine e a duração do SE foi controlada com diazepam (10 mg/kg, i.p., 90 minutos). Os animais controle receberam solução salina. Após 22 dias, o total dos animais foi dividido em cinco grupos: PILO; PILO+CTM, PILO+Lise, Salina e Salina+CTM. Os grupos CTM receberam transplante de células tronco mesenquimais, obtidas da medula óssea de camundongos EGFP C57BL/6. O grupo PILO+Lise recebeu células também provenientes da medula óssea desses animais, mas que passaram previamente por um processo de lise celular. Os animais dos grupos Salina e PILO receberam solução salina. Todos os transplantes foram feitos via veia da cauda ( $10^{4-6}$  células, 200 $\mu$ L). Os animais tratados com pilocarpina (PILO) foram monitorados por vídeo durante sete dias pré-transplante, e outros catorze dias após o procedimento, para observação e computação de crises espontâneas recorrentes (CERs). Ainda, 45 dias depois da injeção das células os animais foram avaliados nas seguintes tarefas: labirinto aquático de Morris (LAM), reconhecimento de objetos, campo aberto e labirinto em cruz elevado. Decorridos 24 horas, 07 dias, 14 dias, 21 dias, 60 dias e 135 dias do transplante os animais foram sacrificados, e foram coletados os hipocampos direito e esquerdo para análise da presença de EGFP por PCR. Para a avaliação histológica, os animais foram sacrificados 04 meses após o transplante, tendo sido analisados o volume hipocampal, o volume dos núcleos CA1, CA2, CA3 e CA4, bem como a densidade e o número total de células nestes núcleos. Finalmente, as células provenientes da medula óssea de

camundongos C57/BL6 antes e após serem cultivadas foram avaliadas por citometria de fluxo. Nossos resultados demonstram que as células mesenquimais injetadas não reduzem as CERs. Já para os animais tratados com lisado celular, verificamos que há redução na frequência de crises. A administração de CTM aos animais tratados com PILO promoveu melhora cognitiva no paradigma do reconhecimento de objetos, sem, porém, melhorar a performance destes animais no LAM. O tratamento com lisado celular, por sua vez, não levou a melhor desempenho em quaisquer dos paradigmas cognitivos citados acima. Por meio da análise histológica podemos observar que os animais tratados com lítio-pilocarpina apresentavam contagem total de células, densidade e volume inferiores aos animais controle. Ainda, CTM ou Lise não produziram aumento significativo em nenhuma das variáveis analisadas, com exceção do volume hipocampal, que se apresentou maior nos grupos PILO+CTM no hemisfério direito e PILO+Lise em ambos os hemisférios. Por outro lado, a análise dos dados obtidos na citometria de fluxo revelou que as CTM são positivas para os seguintes marcadores de superfície CD45, CD19, CD34, CD117 e Sca-1. Finalmente, detectamos a presença de EGFP em amostras obtidas do hipocampo de animais transplantados com CTM, resultado que demonstra que as células administradas intravenosamente migram ao sistema nervoso central. Nos últimos anos, estudos que buscam tratamentos baseados em células tronco para as mais diversas doenças neurodegenerativas foram vistos com muito interesse. Este tipo de tratamento pode, no futuro, ser útil também no tratamento da epilepsia crônica, embora ainda seja preciso estabelecer com mais clareza o tipo de célula tronco ideal.

Palavras-chave: Epilepsia, células tronco, testes comportamentais, histologia, células tronco mesenquimais.

## ABSTRACT

Epilepsy affects 1% of the world population and 30% of these patients are refractory to medication now available. Stem cells host hope in the treatment of epilepsy. Given their ability to proliferate, differentiate and regenerate tissues they could fix neural circuits and reestablish the physiological excitability of neurons. This study aimed to verify the therapeutic potential of mesenchymal stem cells (MSC) and cells that underwent a process of lysis obtained from the bone marrow on seizure control and on progressive neuronal loss induced by experimental epilepsy. Experimental *status epilepticus* (SE) was induced by lithium-pilocarpine injection (127 mg/kg; ip and 60 mg/kg; ip respectively). Seizures were scored by Racine's scale. The duration of SE was controlled with diazepam (10mg/kg; ip; 90 minutes after SE onset). Control animals received saline other than pilocarpine. Twenty-two days after SE, rats were randomly assigned into five groups: PILO; PILO+MSC; PILO+Lysis, Control and Control+MSC. MSC groups received cell transplantation (obtained from EGFP C57BL/6 mice). PILO+Lysis rats also received cells obtained from the bone marrow of EGFP C57BL/6 mice, but that previously underwent lysis. The other groups received saline in the same volume. All transplants were via tail vein ( $10^{4-6}$  cells, 200 $\mu$ L). Pilocarpine-treated animals were monitored for the presence of spontaneous seizures for 21 days (7 prior to cell transplant and 14 afterwards). Forty-five days later rats were evaluated in: the Morris water maze (MWM), the object recognition task, open field and the elevated plus maze. Twenty-four hours, 7, 14, 21, 60 and 135 days after the transplant rats were sacrificed. The hippocampi were collected in order to verify the presence of EGFP using PCR. Rats included in the histological evaluation were sacrificed 4 months after transplantation. The hippocampal volume, volumes of CA1, CA2, CA3 and CA4, as well as density and total of cells were evaluated. Finally, MSC bone marrow cells were evaluated via flow cytometry before and after culture. Our results show that MSC do not reduced the frequency of spontaneous seizures. On the other hand, animals given lysed cells had reduced seizure frequency. In addition, epileptic rats treated with MSC had improved performance in the object recognition task, but not in the MWM. On the other hand, the treatment with lysed cells did not lead to improvement in any of the

aforementioned tasks. We also observed that lithium-pilocarpine-treated animals showed lower cell count, density and hippocampal volume when compared to control rats. Furthermore, neither MSC or Lise led to significant changes in any of the analysed variables, except for hippocampal volume, which was increased in PILO+MSC and PILO+Lysis when compared to PILO animals. The flow cytometry analysis of the samples revealed that MSC were positive to CD45, CD19, CD34, CD117 and Sca-1. Finally, we detected EGFP in samples obtained from the hippocampus of transplanted animals. During the last years much has been done to study the application of stem cells in several neurodegenerative diseases. In the future, this kind of approach can also be valid in the treatment of chronic epilepsy, although the ideal stem cell type remains to be established. .

Key-words: Epilepsy, stem cells, behavioral tests, histology, mesenchymal stem cells.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Comparação entre hipocampo humano normal versus hipocampo com esclerose .....	27
Figura 2. Diferenças no posicionamento anatômico dos hipocampos de ratos e tecido humano.....	30
Figura 3. Comparação entre ressonância magnética e histopatologia 24 h, 14 dias e 9 semanas após administração de lítio-pilocarpina.....	36
Figura 4. Plasticidade das células-tronco da medula óssea.....	40
Figura 5. Diagrama hierárquico das células tronco. ....	44
Figura 6. Delineamento do estudo .....	54
Figura 7. Escala de Racine .....	55
Figura 8. Obtenção de CTM de camundongos C57BL/6-EGFP.....	57
Figura 9. Fotomicrografia de uma cultura de células-tronco mesenquimais .....	57
Figura 10. Demonstração do controle dos animais durante o SE (A-B) e durante a vídeo-monitoração (C-D).....	60
Figura 11. Vista geral do labirinto aquático. ....	62
Figura 12. Animal durante treino na tarefa de reconhecimento de objetos. ....	64
Figura 13. Campo aberto.....	66
Figura 14. Labirinto em cruz elevado. ....	67
Figura 15. Média de CREs durante o período pré-transplante.....	77
Figura 16. Média de CERs durante o período pós-transplante. ....	78
Figura 17. Média de CERs durante os períodos pré e pós-transplante para os animais do grupo PILO.....	78
Figura 18. Média de CERs durante os períodos pré e pós-transplante para os animais do grupo PILO+CTM.....	79
Figura 19. Média de CERs durante os períodos pré e pós-transplante para os animais do grupo PILO+Lise. ....	79
Figura 20. O tratamento com lítio-pilocarpina compromete a aquisição da memória do LAM e o tratamento com CTM e Lise Celular não interfere na aquisição de memória espacial em ratos epilépticos.. ....	81

Figura 21. Animais epilépticos tratados com células lisadas não têm preferência pelo quadrante alvo.....	82
Figura 22. Animais epilépticos tratados com CTM ou Lise não alcançam a plataforma virtual mais rapidamente do que não-tratados. ....	83
Figura 23. Animais do grupo Salina apresentam memória de reconhecimento de longa duração.....	84
Figura 24. Animais do grupo Salina+CTM apresentam memória de reconhecimento de longa duração.....	85
Figura 25. O tratamento com lítio-pilocarpina impede a consolidação de memória de reconhecimento de longa duração .....	85
Figura 26. CTM revertem o déficit de memória de reconhecimento de longa duração associado ao lítio-pilocarpina. ....	86
Figura 27. Animais tratados com preparo de lisado celular não apresentam memória de reconhecimento de longa duração .....	87
Figura 28. O tratamento com lisado celular promove o aumento dos volumes hipocâmpais direito e esquerdo e o tratamento com CTM aumenta o volume hipocâmpal direito médio de ratos submetidos ao modelo lítio-pilocarpina.....	90
Figura 29. O tratamento com lítio-pilocarpina diminui o volume de CA1, CA2 e CA3, mas não CA4 no hemisfério direito.. ....	91
Figura 30. O tratamento com lítio-pilocarpina diminui o volume de CA1, CA2 e CA3, mas não CA4 no hemisfério esquerdo. ....	92
Figura 31. O tratamento com lítio-pilocarpina reduz a densidade numérica em CA1, CA2, CA3 e CA4 no hemisfério direito. ....	93
Figura 32. O tratamento com lítio-pilocarpina reduz a densidade numérica em CA1, CA2, CA3 e CA4 no hemisfério esquerdo. ....	94
Figura 33. O tratamento com lítio-pilocarpina reduz o número total de células em CA1, CA2, CA3 e CA4 no hemisfério direito .....	95
Figura 34. O tratamento com lítio-pilocarpina reduz o número total de células em CA1, CA2, CA3 e CA4 no hemisfério esquerdo .....	96
Figura 35. Detecção molecular de EGFP em amostras do hipocampo esquerdo 14 dias e 24 horas após o transplante. ....	97
Figura 36. Expressão de marcadores de superfície para células da medula óssea de camundongos C57/BL6 antes e após a cultura (células mesenquimais).. ....	98

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Constituição dos grupos a partir do tratamento com pilocarpina (PILO), lise celular (LISE) e/ou células mesenquimais da medula óssea (CTM).. .....	53
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados, reagentes e condições de amplificação.. .....	70
Tabela 3. Comportamento de ratos controle e tratados com lítio-pilocarpina, CTM ou lise, no labirinto em cruz elevado e no campo aberto.. .....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS

CA	Corno de Ammon
CA1	Corno de Ammon 1
CA2	Corno de Ammon 2
CA3	Corno de Ammon 3
CA4	Corno de Ammon 4
CE	Córtex entorrinal
CERs	Crises espontâneas recorrentes
CMMO	Células mononucleares da medula óssea
CTMO	Células tronco da medula óssea
CTM	Células tronco mesenquimais
CMO	Células da medula óssea
EEG	Eletro-encefalograma
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGFP	Proteína verde fluorescente
ELT	Epilepsia do lobo temporal
EMT	Esclerose mesial temporal
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FH	Formação hipocampal
GD	Giro denteado
HIPO	Hipocampo
ILEA	Liga Internacional contra a Epilepsia
INOS	Óxido nítrico sintase
LAM	Labirinto aquático de Morris
MO	Medula óssea
NO	Óxido nítrico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PILO	Grupo de animais epiléticos
PILO+CTM	Grupo de animais epiléticos e transplantados com células-tronco mesenquimais

PILO+Lise	Grupo de animais epilépticos e transplantados com lisado celular
Salina	Grupo de ratos não epilépticos e não transplantados
Salina+CTM	Grupo de ratos não epilépticos e transplantados com células-tronco mesenquimais
SNC	Sistema nervoso central
SE	Status epilepticus
SG	Stratum granulosum
SLM	Stratum lacunosum-moleculare
SL	Stratum lucidum
SM	Stratum moleculare
SO	Stratum oriens
SP	Stratum pyramidale
SR	Stratum radiatum

# SUMÁRIO

<b>1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>21</b>
1.1 Epilepsia .....	21
1.1.1 Classificação das Epilepsias.....	23
1.1.2 Epilepsia do Lobo Temporal (ELT).....	24
1.2 Anatomia do Hipocampo.....	28
1.2.1 Delimitação das Subdivisões do Hipocampo .....	30
1.3 Modelos Experimentais de Epilepsia .....	31
1.3.1 Modelo Experimental de Epilepsia Induzida por Pilocarpina .....	33
1.3.2 Modelo de Epilepsia Induzida por Lítio-Pilocarpina .....	35
1.4 Células Tronco (CT).....	37
1.4.1 Células Tronco da Medula Óssea (CTMO).....	41
1.4.2 Células Tronco Mesenquimais (CTM).....	42
1.4.3 Células tronco no tratamento de doenças do sistema nervoso .....	45
1.4.4 Terapia celular no tratamento da epilepsia .....	46
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>49</b>
2.1 Objetivo Geral .....	49
2.2 Objetivos Específicos.....	49
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>51</b>
3.1 Animais .....	51
3.2 Delineamento Experimental.....	52
3.3 Indução da Epilepsia com o Uso do Modelo Lítio-Pilocarpina .....	54
3.4 Preparação das Células Mesenquimais de Medula Óssea.....	55
3.5 Caracterização das Populações Celulares Presentes .....	58
3.6 Lise Celular .....	58
3.7 Monitoramento das Crises Espontâneas Recorrentes.....	59
3.8 Avaliação Comportamental .....	60
3.8.1 Labirinto Aquático de Morris.....	61
3.8.2 Paradigma de Reconhecimento de Objetos.....	63

3.8.3 Campo Aberto .....	65
3.8.4 Labirinto em Cruz Elevado .....	66
3.9 Obtenção das Amostras de Regiões Encefálicas de Ratos Controles e Epilépticos.....	67
3.10 Identificação de DNA EGFP das CTM de Camundongos .....	68
3.10.1 Extração de DNA .....	68
3.10.2 Detecção Molecular das CTM Transplantadas .....	69
3.10.3 Teste de Sensibilidade.....	70
3.11 Procedimento Histológico.....	71
3.11.1 Estimativa da Densidade Numérica de Células por Volume do Disector .....	72
3.11.3 Cálculo do Volume das Estruturas Analisadas.....	73
3.11.3 Estimativa do Número Total de Células .....	74
3.12 Considerações Éticas.....	74
3.13 Análise Estatística .....	75
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>76</b>
4.1 O tratamento com células lisadas, mas não com CTM reduz CERs induzidas pelo lítio-pilocarpina. ....	76
4.2 O tratamento com CTM ou lisado celular não reverte o déficite cognitivo associado ao dano hipocampal produzido pelo lítio-pilocarpina no LAM .....	80
4.3 O tratamento com lítio-pilocarpina bloqueia a memória de longa duração no paradigma de reconhecimento de objetos e CTM revertem o déficite cognitivo associado a esta tarefa .....	83
4.4 O tratamento com lítio-pilocarpina, CTM ou células lisadas não influencia o desempenho dos animais no campo aberto ou labirinto em cruz elevado.....	87
4.5 Resultados obtidos nos estudos histológicos.....	89
4.5.1 O tratamento com lítio-pilocarpina reduz o volume hipocampal direito e esquerdo e a administração de CTM reverte esse processo .....	90
4.5.2 O tratamento com lítio-pilocarpina reduz a densidade numérica em CA1, CA2, CA3 e CA4 e a administração de CTM não reverte esse processo .	92
4.5.3 O tratamento com lítio-pilocarpina reduz o número total de células em CA1, CA2, CA3 e CA4 e a administração de CTM ou lisado celular não reverte esse processo .....	94

4.6 Detecção molecular positiva do gene EGFP em amostras do hipocampo obtidas de animais transplantados 24 horas e 14 dias após a administração das células .....	96
4.7 Caracterização celular por citometria de fluxo .....	97
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>99</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>109</b>
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>111</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>112</b>

# 1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

## 1.1 Epilepsia

A epilepsia compreende uma ampla categoria de síndromes caracterizadas por crises espontâneas e recorrentes, resultantes de um disparo intenso, sincronizado e rítmico de populações neuronais no sistema nervoso central (SNC), e de excitabilidade excessiva, na ausência de condição tóxico-metabólica ou febril (Gastaut 1973; Rogawski e Porter 1990; McNamara 1994). Este conceito destaca a entidade clínica, descrita como crise epiléptica, que é definida como resultado das descargas súbitas e excessivas de neurônios numa região do cérebro (crises focais) ou de áreas extensas envolvendo os dois hemisférios (crises generalizadas) (Meldrun e Rogawski 2007). Outra situação importante é o *status epilepticus* (SE), no qual o indivíduo apresenta “crises epilépticas suficientemente prolongadas, ou repetidas em intervalos curtos, que resultam num estado epiléptico contínuo e duradouro” (Gastaut 1973).

O desenvolvimento da epilepsia é resultado de um insulto prejudicial, podendo ser um trauma crânio-encefálico, doença cerebrovascular, tumor cerebral, infecções do SNC, convulsões febris, anóxia, distúrbios metabólicos ou SE. Quase todas as doenças que atingem a substância cinzenta, algumas patologias de substância branca (como por exemplo, doenças metabólicas) e numerosas doenças

sistêmicas podem causar crises epilépticas. Três fatores causais podem estar envolvidos: predisposição individual, presença de lesão epileptogênica cerebral e alterações bioquímicas ou elétricas cerebrais (Guerreiro *et al.* 2000).

Apesar da variabilidade dos dados acerca da frequência de ocorrência de epilepsia – são muitas as dificuldades metodológicas, desde definição de epilepsia até a fonte de obtenção dos dados – estima-se que a epilepsia atinja cerca de 1% da população nos países desenvolvidos e cerca de 2% nos países em desenvolvimento (Engel 2001; Sander e Hart 1999). Em estudo realizado em Porto Alegre, Fernandes e colaboradores determinaram prevalências de 10,8/1000, 12,7/1000 e 16,5/1000 para epilepsia ativa respectivamente, comparadas às definições que consideraram pelo menos duas crises nos últimos doze meses, ou nos últimos dois anos ou cinco anos (ou uso de fármaco antiepilépticos). Assim como 26/1000, 24,1/1000 e 20,03/1000 para epilepsia inativa, definida complementarmente à ativa (Fernandes 1993). No entanto, de acordo com a Organização Mundial da Saúde, aproximadamente 0,8% da população mundial (50 milhões) é portadora de epilepsia (Pitkanen *et al.* 2007). As faixas etárias com maior incidência são crianças com menos de 2 anos e idosos com mais de 65 anos (Guerreiro *et al.* 2000). Ocorre um ligeiro predomínio do sexo masculino (Sander & Hart 1999).

O tratamento medicamentoso das epilepsias é sintomático, isto é, visa primariamente ao controle das crises. É realizado com fármacos antiepilépticos, mas, infelizmente, aproximadamente 30% dos pacientes não respondem a esta terapêutica, tornando-se refratários ao tratamento (Löscher 2002b). Estes podem ser candidatos à intervenção cirúrgica da epilepsia. No entanto, o risco de perda de funções cerebrais limita o número de pacientes que podem receber este tratamento. Dentro desse panorama, torna-se fundamental que sejam estudadas e

disponibilizadas novas alternativas terapêuticas, entre elas a terapia com células tronco.

### **1.1.1 Classificação das Epilepsias**

A característica principal da epilepsia é a presença de crises recorrentes. Estima-se que entre 1 a 8% dos pacientes epiléticos apresentaram, em algum período da sua doença, pelo menos um episódio de SE (Pitkanen *et al.* 2007). Porém, há muitos tipos de crises epiléticas, algumas das quais podem ser facilmente confundidas com sintomas de outras doenças. Assim, são muito importantes a classificação e descrição detalhada das crises epiléticas. A classificação das epilepsias e das síndromes epiléticas é baseada nas semelhanças em relação ao tipo de crise, idade de início, sinais clínicos ou neurológicos associados, histórico familiar, padrões eletroencefalográficos e prognóstico. Assim, são descritos vários tipos diferentes de epilepsias, somando em torno de 40 tipos distintos que constam no quadro de classificação internacional da epilepsia e síndromes epiléticas (Engel 2001; Engel 2006).

Existem muitas classificações das epilepsias: de acordo com a etiologia, com a idade de início das crises, com a topografia das descargas elétricas, com as manifestações clínicas, com os achados eletroencefalográficos ou tipos de crises epiléticas. O problema da classificação é controverso e ainda não existe um consenso sobre o melhor modo de fazê-la. Apesar disto a classificação mais usada é a proposta pela Liga Internacional contra a Epilepsia (*ILEA*- [www.ilae-epilepsy.org](http://www.ilae-epilepsy.org)).

A Classificação das crises epiléticas de acordo com a ILEA baseia-se nas manifestações clínicas não levando em consideração a etiologia e anatomia. Ela

divide as crises em dois grupos principais, de acordo com a origem da descarga neuronal primária: 1- as originadas em áreas corticais localizadas nos focos epiléticos (crises parciais) e 2- as caracterizadas por descargas sincrônicas, provenientes de ambos os hemisférios (crises generalizadas). Além disso, existem crises que não se enquadram em nenhuma categoria acima, sendo consideradas “não classificáveis”.

As crises focais ou parciais originam-se de um foco epilético, que representa uma região cortical localizada, onde ocorre uma descarga neuronal excessiva. As manifestações clínicas de uma crise parcial dependem da posição do foco no córtex, da propagação ou não dos fenômenos elétricos, e das vias corticais envolvidas. A localização mais comum de origem das crises epiléticas é nos lobos temporais. ([www.ilae-epilepsy.org](http://www.ilae-epilepsy.org)).

### **1.1.2 Epilepsia do Lobo Temporal (ELT)**

Entre as epilepsias refratárias, aquelas com origem no lobo temporal são as mais freqüentes (Valério *et al.* 1995; Blümcke *et al.* 1996; Jorge *et al.* 1996). A ELT é caracterizada clinicamente pelo desenvolvimento gradativo de crises espontâneas e recorrentes (CERs) – crises parciais complexas, com ou sem generalização secundária, associadas à perda neuronal e ao declínio do desempenho cognitivo progressivos, independentemente da patologia subjacente. Na maioria das vezes, antes da apresentação de CERs, os pacientes experimentam SE nos primeiros anos de vida, seguido de período livre de crises que perdura por um longo tempo. As crises freqüentemente iniciam-se na última metade dos 10 primeiros anos de vida, quando respondem apropriadamente aos fármacos anti-epiléticos, mas recorrem

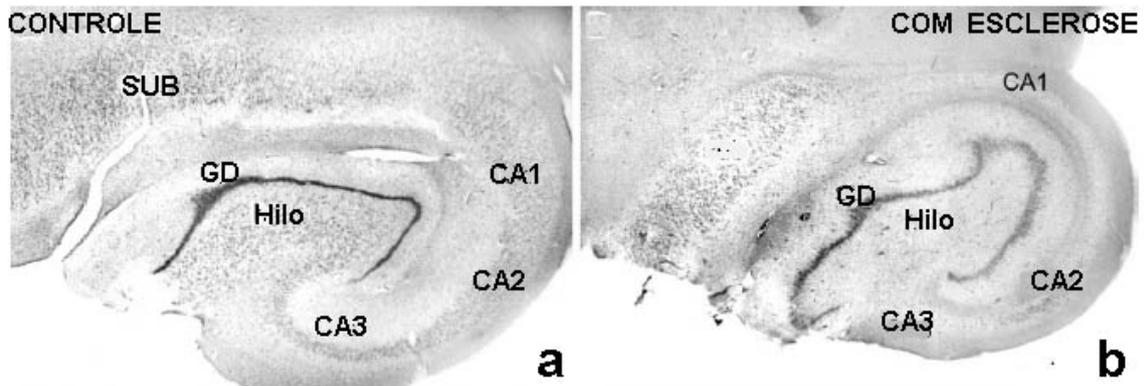
durante a adolescência, ou mais tarde, quando, em geral, passam a não mais responder adequadamente ao tratamento medicamentoso (Engel 1996).

As crises do lobo temporal tendem a seguir uma seqüência de eventos relativamente fixa. Um fenômeno clínico bastante comum nos pacientes com ELT é a presença da aura na fase ictal, ou seja, imediatamente antes do início da crise epiléptica. Esta consiste de uma sensação de mal epigástrico ascendente, sensações dismnésticas (*déjà vu*) e psíquicas – medo súbito desproposital, alucinações olfatórias e gustativas. As manifestações decorrentes das crises parciais complexas, que geralmente duram 1 a 2 minutos, iniciam com parada de atividade, olhar fixo não responsivo, postura distônica, automatismos oroalimentares e motores estereotipados. Após a remissão da crise, o paciente pode apresentar desorientação, amnésia do evento, déficit de memória recente e afasia. Uma avaliação neuropsicológica do paciente com ELT pode revelar distúrbios de memória. Esta disfunção é proporcional ao grau de atrofia das estruturas mesiais, sobretudo do hipocampo (Yacubian 1998).

Na maioria das ELT (60-65%) há comprometimento das estruturas mesiais do lobo temporal, estabelecendo-se a esclerose mesial temporal (EMT, Leite e Cavalheiro 1998), sendo esse tipo de epilepsia a causa mais freqüente (em torno de 50-70%) de epilepsia refratária na idade adulta (Babb & Brown 1987; Engel *et al.* 2001b). As principais modificações fisiopatológicas da EMT incluem morte neuronal, gliose reativa, brotamentos de colaterais axônicas das células granulares (fibras musgosas) na região da camada molecular interna do giro denteado, alterações na morfologia e localização dos dendritos, e neurogênese na camada subgranular do giro denteado (Guedes 2006; Blümcke *et al.* 1999, Blümcke *et al.* 2002).

A perda de sub-populações neuronais específicas é uma característica de diversos distúrbios neurológicos, e em grande parte dos casos de epilepsia do lobo temporal, ocorre extensiva perda neuronal dentro de regiões específicas do hipocampo. Em estudos sobre a EMT, observou-se uma perda neuronal gradual nos vários subcampos hipocampais (Figura 1) atingindo em ordem decrescente: CA1 e setor de Sommer (pró-subículo); hilo do giro denteado (GD) e CA3; células granulares do GD e CA2 (Blümcke *et al.* 1999). Também aparece perda neuronal em outras áreas mesiais temporais como na camada III do córtex entorrinal (DU *et al.* 1993) e no núcleo lateral da amígdala (Pitckamen *et al.* 1998). Na maioria das vezes a ELT envolve as estruturas mesiais citadas acima, mas também pode haver crises com origem no neocórtex lateral (Hauser, 1991)

Os principais sintomas, da epilepsia do lobo temporal, podem estar associados a lesões do sistema límbico temporal, em especial do hipocampo, da amígdala e parahipocampo (Blümcke *et al.* 1999; Chang e Lowenstein 2003; Sloviter 2005, Avoli *et al.*, 2005). Desde 1825 - quando Bouchet e Cazauvieilh, através da análise de necrópsias, observaram alterações patológicas no cérebro de pacientes epiléticos, as quais Sommer (Fisher *et al.* 1998) chamou de esclerose hipocampal as identificando como possível causa da epilepsia (Falconer *et al.* 1964) - a presença de esclerose hipocampal tem sido identificada como uma característica marcante na maioria dos casos de ELT (Sloviter 2005, Cohen *et al.* 2003).



**Figura 1.** Comparação histológica de um hipocampo controle versus hipocampo com esclerose. Em a) hipocampo obtido de autópsia em b) hipocampo obtido na cirurgia. Notar em “b” perda neuronal extensa no hilo do giro denteado CA1 e CA3 e preservação nas áreas de CA2 e subiculum (SUB) (adaptado de Sloviter, 2005)

Existem teorias que tentam explicar como a estrutura hipocampal está envolvida com o início das CERs, sendo que a morte das células musgosas da região hilar parece ser um mecanismo fundamental para o quadro epileptogênico. A teoria das “células em cesto dormentes” postula que a morte neuronal do hilo do giro denteado promove uma perda da excitação das células GABAérgicas em forma de cesto, que por sua vez deixam de inibir as células granulares e estas passam a apresentar maior saída excitatória. Já a hipótese do “brotamento sináptico” propõe que a perda do alvo das células granulares, provocada pela morte das células musgosas, induz uma reorganização sináptica e axonal destas em direção à camada molecular interna do hilo do giro denteado, criando um circuito recorrente monossináptico excitatório entre as células granulares. A veracidade destas teorias tem sido contestada tanto do ponto de vista fisiológico como anatômico. No entanto, acredita-se que estas hipóteses não são excludentes, e que tanto os mecanismos de reorganização axonal, como os de desinibição poderiam estar envolvidos no processo de epileptogênese da EMT (Sloviter 1991; Leite e Cavalheiro 1998).

## **1.2 Anatomia do hipocampo**

Em vista dos fatores mencionados acima, uma breve descrição anatômica da formação hipocampal parece relevante para a compreensão do envolvimento desta estrutura nas epilepsias.

Os principais componentes do sistema límbico são os córtices límbicos associativos, a formação hipocampal, o complexo amigdalóide, os núcleos septais, o hipotálamo e o bulbo olfatório. O complexo amigdalóide e a formação hipocampal estão localizados na região medial do lobo temporal, adjacentes ao giro parahipocampal que é constituído pelo complexo subicular e os córtices entorrinal e parahipocampal (Van Hoesen, 1995; O'Mara *et al*, 2001).

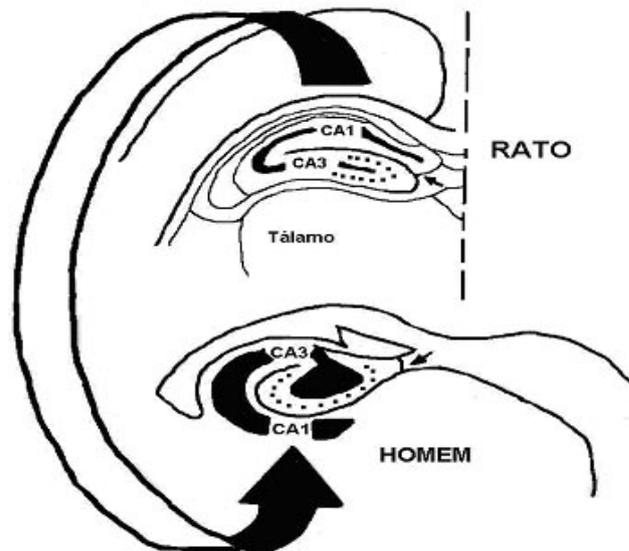
A formação hipocampal (FH) é constituída pelo hipocampo (HIPO), giro denteado, complexo subicular e córtex entorrinal (CE) (revisado por Amaral e Witter 1989; Knowles, 1992, Van Hoesen 1995). O HIPO é denominado *Cornus Ammonis*, ou corno de Ammon (CA) - por sua forma lembrar a de um chifre de carneiro presente na cabeça do “Deus Egípcio Ammon” – e conforme a descrição de Lorente de Nó (LORENTE de NÓ, 1934), subdivide-se em CA1 (a, b, c), CA2, CA3 (a, b, c) e CA4, e é composto principalmente por células piramidais, que constituem a camada piramidal.

A lâmina contínua de neurônios principais que origina o corno de Amon e o giro denteado dobra-se sobre si mesma e separa-se ao longo do desenvolvimento, obliterando a fissura hipocampal e formando duas estruturas interdigitadas em forma de C, ambas constituindo um arqueocórtex em três camadas ou *strata* denteado (Knowles 1992; Affifi e Bergman 1998).

Os neurônios piramidais do CA e granulares no GD são encontrados no *stratum pyramidale* (SP) e *stratum granulosum* (SG), respectivamente. Os dendritos apicais dos neurônios piramidais do CA constituem o *stratum radiatum* (SR) e seus dendritos basais, o *stratum oriens* (SO). Os dendritos apicais dos neurônios granulares do GD constituem o *stratum moleculare* (SM) e seus dendritos basais misturam-se em um estrato polimórfico, com interneurônios, denominado hilus. Outros *strata* do hipocampo são o *stratum lucidum* (SL), formado pelos dendritos apicais proximais dos neurônios piramidais de CA3, e o *stratum lacunosum-moleculare* (SLM), formado pelos dendritos apicais distais dos neurônios granulares do GD.

Na região do CA, existe grande variedade de interneurônios. Estes incluem as células em cesto, localizadas próximas ao SP e fazem inibição via sinapse axossomáticas, *oriens/alveous* interneurônios (O/A interneurônios), *moleculare-lacunosum* interneurônios (M/L interneurônios), e as células em candelabro que inibem as células piramidais em segmento inicial do axônio (Knowles 1992; Turner *et al.* 1998).

A citoarquitetura da FH e as conexões entre as diversas regiões são bastante similares ao longo da escala filogenética, entretanto existem variações na posição dos hipocampos entre as espécies. Em roedores, por exemplo, a rotação hemisférica é parcial e o hipocampo é predominantemente dorsal. Podendo ser dividido em duas regiões distintas: superior (com a região de CA1) e inferior (com CA3). Na espécie humana a rotação hemisférica é completa, o hipocampo encontra-se posicionado ventralmente e a relação CA1 e CA3 é invertida quando comparada ao de rato (Figura 2).



**Figura 2.** Diferenças no posicionamento anatômico dos hipocampus de ratos e tecido humano. As pequenas setas indicam o sulco hipocampal. A seta grande indica a inversão no posicionamento do hipocampo com a rotação hemisférica. (*adaptado de Duvemoy, 1988*)

### 1.2.1 Delimitação das Subdivisões do Hipocampo

As células piramidais e granulares são os principais tipos de neurônios da formação hipocampal, e são encontradas nos cornos de Ammon e giro denteado, respectivamente. As células piramidais estão localizadas na curva da camada de células “C-shape” (*stratum pyramidale*) no corno de Amon. A *stratum pyramidale* é frequentemente dividida nas regiões CA1, CA2 e CA3. A região CA1 é também denominada “regio superior”, sendo as regiões CA2 e CA3 descritas como “regio inferior” do hipocampo (Amaral e Witter 1995). A região de CA2 consiste de uma área de células localizada entre CA1 e CA3, e sua diferenciação pode ser relativamente fácil (Amaral e Witter, 1995; Paxinos e Watson 1998). O giro denteado é uma estrutura simples, do ponto de vista histológico, sendo organizado em três camadas de células morfologicamente distintas das demais camadas do hipocampo.

As células granulares estão dentro do giro denteado, que tem forma de C, sendo que abertura do C do giro denteado está em oposição direta com a abertura do C do *stratum pyramidale*. O hilo do giro denteado contém muitos tipos celulares, mas o tipo predominante são as células musgosas. Essas células são grandes neurônios que têm uma similaridade com neurônios piramidais da região de CA3, mas podem ser distinguidas deles pela sua localização espacial e abrupta mudança na densidade celular (Amaral e Witter, 1995). O hilo aqui definido corresponde à definição de Lorente de Nó (1934) para CA4.

As glias são diferenciadas dos neurônios por apresentarem o corpo celular menor e mais denso, tendo o núcleo mais largo e o citoplasma esparso (Ling e Leblond 1973; Souza *et al.* 1998; Winkelman-Duarte *et al.* 2007).

### **1.3 Modelos Experimentais de Epilepsia**

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 recorrem a intervalos variados de tempo após a indução, podendo acompanhar toda a vida do animal (Cavalheiro *et al.* 1991; Sanabria e Cavalheiro 2000).

Entre os 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. Já os modelos genéticos podem ser subdivididos em aqueles que empregam animais com mutações espontâneas ou animais com mutações induzidas, como camundongos transgênicos ou *knockout* (Suzuki 2004).

Os modelos de epilepsia adquirida são muito usados no estudo da fisiopatologia da epilepsia, bem como na pesquisa de alvos para prevenção dessa doença. Da mesma forma, as crises induzidas por estes modelos podem ser usadas para a busca de tratamentos mais eficazes para epilepsias refratárias. Em comparação com os modelos de epilepsia adquirida, a maioria dos modelos genéticos são modelos de epilepsia generalizada que têm sido mais úteis para a compreensão dos mecanismos básicos da epilepsia do que para o estudo de novas possibilidades terapêuticas (Löscher 2002a).

Os principais modelos experimentais de epilepsia do lobo temporal envolvem condições nas quais a epilepsia é consequência de um dano encefálico induzido por um episódio agudo de SE, desencadeado seja por aplicação de convulsivantes químicos como pilocarpina ou cainato, seja por estimulação elétrica (*kindling*). Nesses modelos, o SE é interrompido depois de determinado tempo e os animais têm aparência normal por um período que varia de duas semanas a vários meses. Ao final desse tempo, passam a apresentar CERs que persistem por toda a vida (Coulter *et al.* 2002). Assim, em geral, estes modelos reproduzem melhor a epilepsia humana, porque apresentam CERs precedidas por uma fase de latência e alterações neuropatológicas semelhantes às aquelas encontradas em indivíduos com ELT.

### 1.3.1 Modelo Experimental de Epilepsia Induzida por Pilocarpina

Dentre os modelos farmacológicos disponíveis, o da epilepsia induzida por pilocarpina (PILO; um agonista colinérgico muscarínico) é um dos que mais se aproxima da ELT. Inicialmente descrito por Turski e colaboradores (Turski *et al.* 1983), este modelo crônico de epilepsia tem sido utilizado com o intuito de avaliar os mecanismos envolvidos na epilepsia da infância bem como as consequências imediatas e tardias das crises epiléticas. Este modelo reproduz as condições necessárias para a indução de uma sintomatologia semelhante àquela observada durante uma crise epilética, bem como alterações morfológicas idênticas às observadas em tecido epilético humano (Cavalheiro *et al.* 1991).

Extraída das folhas das plantas sul-americanas *Pilocarpus jaborandi* e *Pilocarpus microphyllus*, a PILO é um alcalóide que induz um estado comportamental crônico que parece depender da facilitação de descargas em salva em neurônios hipocampais, por meio do bloqueio de correntes iônicas de potássio, que são dependentes da ativação muscarínica ( $I_M$ ) (Sanabria e Cavalheiro 2000). A ativação dos receptores colinérgicos muscarínicos do subtipo m1 nos neurônios da camada II do córtex entorrinal é ampliada pelo influxo de cálcio, causando uma despolarização amplificada da membrana e o disparo repetitivo dos neurônios quando acompanhada de atividade da célula pós-sináptica (Klink e Alonso 1997).

A partir da ativação de muitos neurônios durante o SE induzido pela PILO, ocorre uma ativação secundária do sistema glutamatérgico e assim, excitotoxicidade no hipocampo e demais estruturas. O hilo do giro denteado, CA1 e CA3 são ricos em receptores glutamatérgicos. Assim, as regiões de CA1 têm maior concentração de receptor do tipo NMDA, enquanto o hilo e CA3 são ricos em receptores do tipo

cainato (Geddes e Cotman 1986; Fisher *et al.* 1998). Estes receptores, quando ativados, permitem influxo de cálcio que, em altas concentrações, podem levar à morte neuronal (Sloviter 1991)

Portanto o dano neuronal excitotóxico agudo associado a outras alterações moleculares leva à morte neuronal, mecanismos de reorganização sináptica, sinaptogênese e neurogênese no giro denteado, bem como mudanças nas propriedades eletrofisiológicas neuronais. O aumento da suscetibilidade do tecido nervoso às crises epiléticas tem sido relacionado à anormalidade de neurotransmissão do SNC, por um aumento na transmissão excitatória ou diminuição na transmissão inibitória, ou por ambos os mecanismos (Meldrum, 1984). Alterações decorrentes na circuitaria hipocampal compõem um quadro permanente de epileptogênese (Sanabria e Cavalheiro 2000).

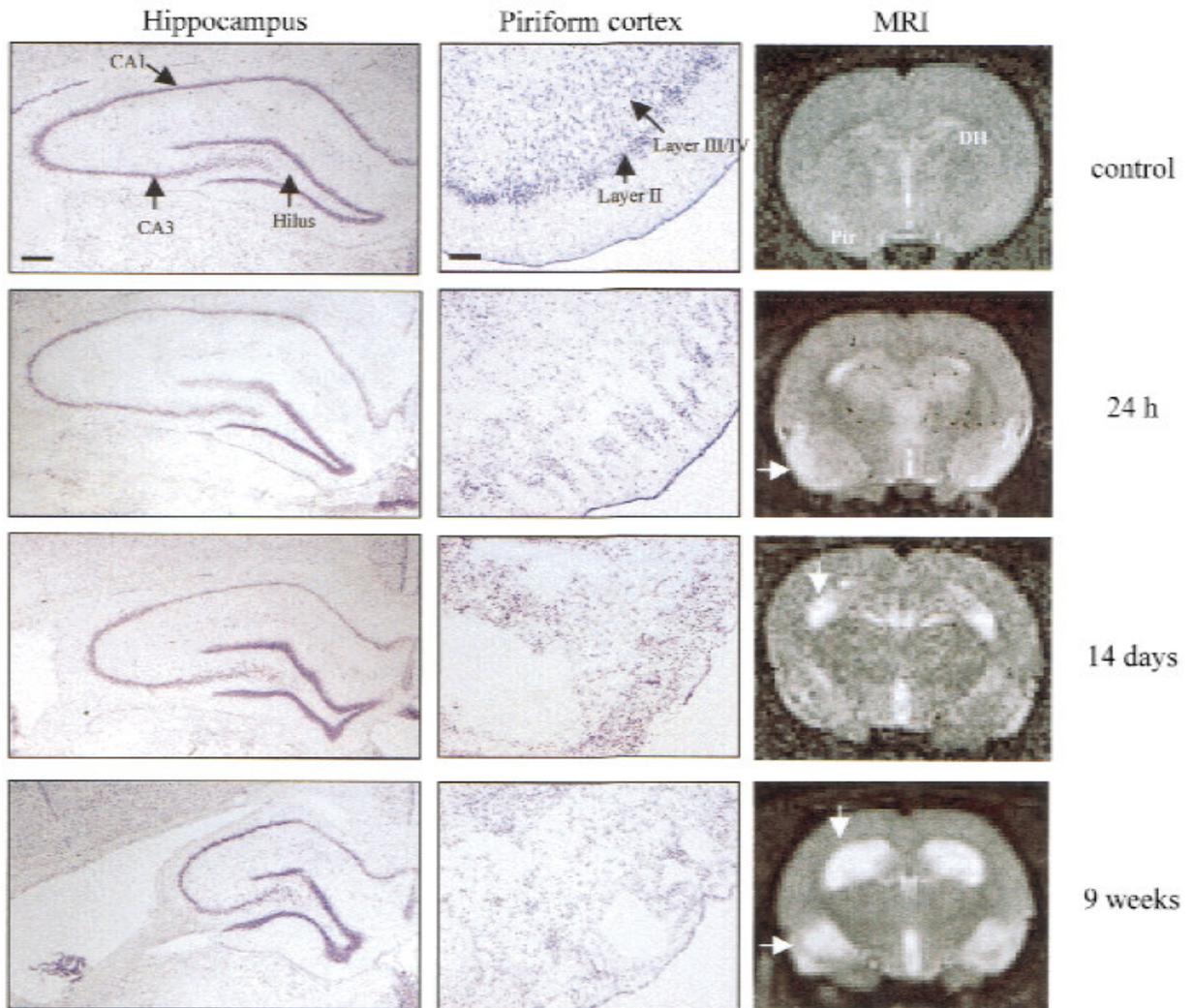
Ao receber PILO, os animais ficam em SE duradouro, ou seja, há persistência de crises contínuas durante, no mínimo, 30 minutos. Os ratos apresentam crises epiléticas de intensidade variável, caracterizadas por imobilidade, tremor, automatismo bucofaciais, abalos de extremidades, ataxia e crises tônico-clônicas. Esta crise aguda é seguida por um período silencioso, com normalização progressiva do EEG, sendo uma fase em que o animal permanece sem crises comportamentais e que dura em média de 14 a 25 dias. A partir daí, surgem crises epiléticas espontâneas recorrentes, caracterizando a fase crônica (Cavalheiro *et al.* 1991).

Neste modelo, a perda neuronal está localizada principalmente no hipocampo, córtex piriforme e entorrinal, tálamo, amígdala e neocórtex (Turski *et al.* 1983). Além disso, a extensão da lesão hipocampal está diretamente relacionada com a duração do SE (Lemos e Cavalheiro 1995).

Tanto na epilepsia do lobo temporal humana quanto em modelos experimentais de epilepsia crônica, a perda progressiva de neurônios correlaciona-se com o acometimento de estruturas importantes na memória e aprendizagem, comprometendo estas funções (Sarkisian *et al.* 1997). Evidências clínicas, complementadas por estudos em laboratório sugerem que há um grande déficit cognitivo após o SE, inferido através de medidas de aprendizagem ou memória. Em particular, há relatos do comprometimento tanto da memória explícita, quanto da memória implícita (Holmes 1997; Liu *et al.* 1994).

### **1.3.2 Modelo de Epilepsia Induzida por Lítio-Pilocarpina**

Ao modelo epileptogênico da PILO tem sido acrescido lítio, uma vez que este é responsável por potencializar a habilidade da PILO na indução do SE, incrementando a morte neuronal seletiva inerente à epilepsia (Figura 3), possivelmente por uma *up-regulation* da síntese dos receptores dopaminérgicos e dos receptores colinérgicos muscarínicos (De Bruin *et al.* 2000). O pré-tratamento com cloreto de lítio antes da injeção de pilocarpina pode reduzir a dose necessária desta em até 10 vezes. Ainda, as manifestações comportamentais agudas e o padrão de lesão induzido pela crise após altas doses de pilocarpina ou pelo modelo lítio-pilocarpina são muito parecidos (Löscher 2002a).



**Figura 3.** Comparação entre ressonância magnética e histopatologia 24 h, 14 dias e 9 semanas após administração de lítio-pilocarpina: a esclerose hipocampal se desenvolve progressivamente acompanhando o hiper-sinal na ressonância magnética. Fonte Roch *et al* 2002.

Chaudhary e colaboradores demonstraram que o cloreto de lítio pode ser administrado em qualquer intervalo de tempo entre 2 e 24 horas antes da injeção de pilocarpina com resultados semelhantes. Ainda, o uso do modelo lítio-pilocarpina reduz a mortalidade e evita muitos efeitos colaterais decorrentes dos efeitos colinomiméticos periféricos associados a altas doses de pilocarpina (Chaudhary *et al.* 1999).

### **1.4 Células Tronco (CT)**

Durante a embriogênese, um único oócito fertilizado dá origem a um organismo multicelular cujas células e tecidos adotam características ou têm destinos diferentes para dar a cada órgão do corpo suas estrutura e funções específicas. À medida que o embrião se desenvolve, as células vão proliferando, permitindo que os tecidos e órgãos cresçam. No entanto, mesmo quando um animal já está completamente desenvolvido, muitos tecidos e células mantêm a homeostase, onde células que morrem, seja por morte natural ou lesão, precisam ser substituídas. Esta característica notável tem origem filogenética muito antiga, e mesmo que pareça que durante a evolução os mamíferos perderam uma parte desta plasticidade, seu fígado, por exemplo, pode regenerar-se parcialmente (se a lesão não for muito grave). Outros exemplos disso são a epiderme e o sistema hematopoiético. A incrível capacidade que certos tecidos têm de regenerar-se durante a vida ou a capacidade de um embrião de diversificar-se é resultado direto da plasticidade das células tronco (Fuchs e Segre 2000).

As CT representam uma unidade natural do desenvolvimento embrionário e da reparação tecidual e constituem um subconjunto de células imaturas, que têm como característica serem indiferenciadas e não-especializadas. Assim, estas células apresentam a capacidade tanto de se auto-regenerar, ou seja, dividir-se e criar outras CT, quanto de se diferenciar através de uma determinada via molecular e originar diferentes linhagens celulares (revisado por Morrison *et al.* 1997).

As CT podem ser classificadas segundo a sua potencialidade de diferenciação, algumas células são mais indiferenciadas que outras. São chamadas de totipotente as células capazes de gerar todos os tipos celulares embrionários e

extra-embrionários, como o zigoto; podem originar todas as células que formam o embrião (propriamente dito) e são provenientes da camada interna do blastocisto, (5° ao 7° dia de vida). As CT totipotentes têm a capacidade de originar células derivadas das três camadas germinativas: mesoderma, endoderma e ectoderma. As CT adultas (pós-natal) são multipotentes capazes de gerar tipos celulares que compõem tecidos e órgãos específicos de seu local de origem, mas também, pluripotentes, ou seja, com capacidade de gerar células de outros órgãos e tecidos. São pluripotentes, mas com a habilidade de diferenciação mais restrita (Krause *et al.* 2001).

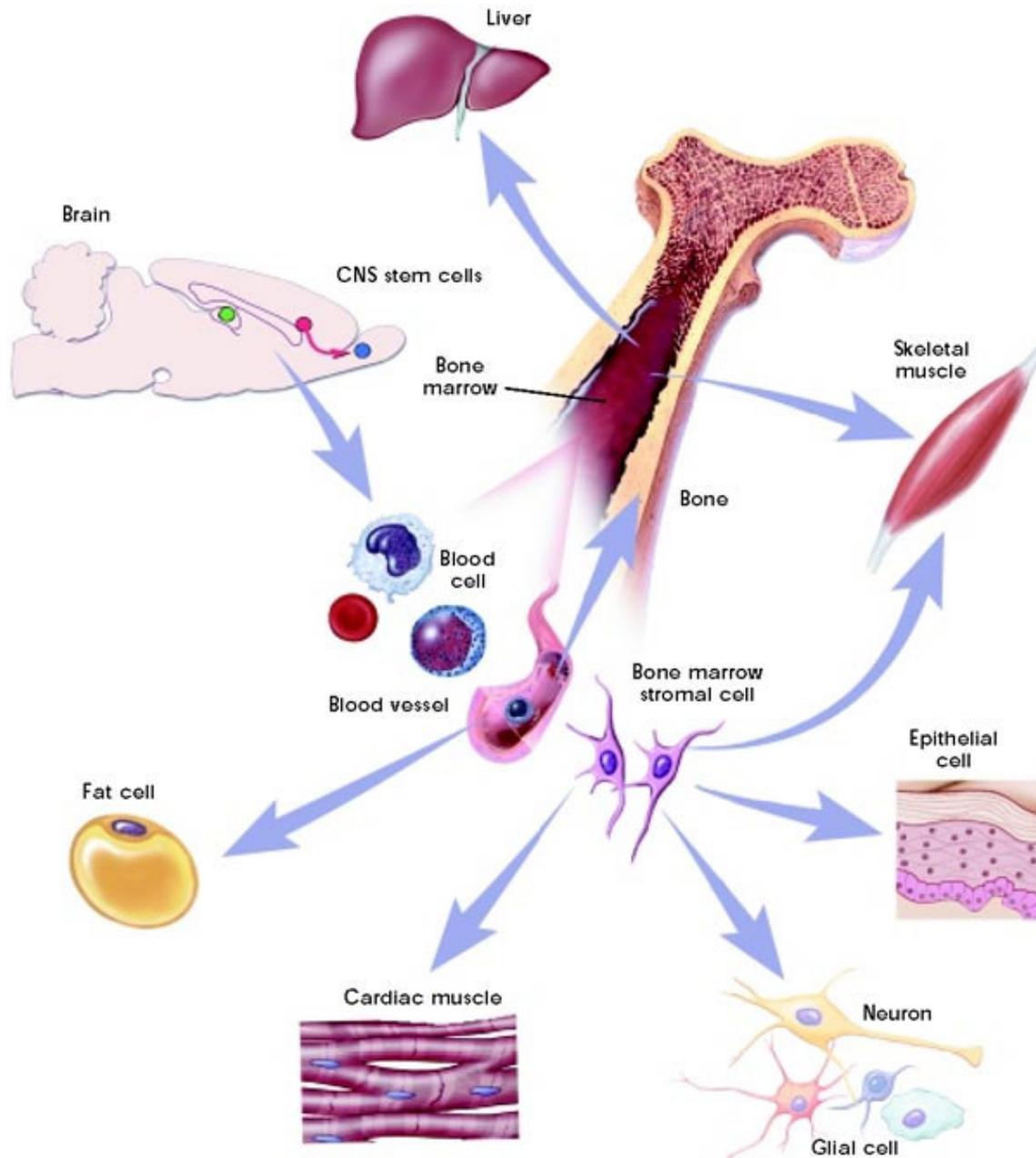
Assim, as CT adultas são células indiferenciadas que, no entanto, se encontram em tecidos diferenciados (especializados). Essas células são responsáveis pelo reabastecimento tecidual ao longo da vida e estão presentes na maioria dos tecidos, tais como, o sangue, a pele, o fígado, o coração e o cérebro (Kaji e Leiden 2001). Tipicamente, as CT geram tipos celulares intermediários antes de se diferenciar completamente. A célula intermediária é chamada célula precursora ou célula progenitora. As células precursoras nos tecidos fetais ou adultos são células parcialmente diferenciadas que se dividem e dão origem a células diferenciadas (revisado por Morrison *et al.* 1997).

As CT “adultas” são melhores denominadas como somáticas por encontrarem-se na intimidade dos tecidos do corpo (soma). Acreditava-se que estas células teriam opções mais restritas de diferenciação, podendo selecionar um programa de diferenciação dentre apenas poucas vias possíveis, ou seja, já comprometidas com determinada linhagem celular, não seriam pluripotentes a exemplo das embrionárias. Atualmente discute-se até que ponto isso é verdade, já que evidências apontam que estas células poderiam sim, ignorar as restrições de

sua linhagem específica, transdiferenciando-se em células com origem germinativa distinta. Exemplos disto são os estudos de Bjornson e colaboradores (Bjornson *et al.* 1999) que demonstraram que células isoladas a partir do encéfalo de camundongos transgênicos podem se diferenciar em células hematopoiéticas bem como os achados de Mezey e col. (Mezey *et al.* 2000), os quais comprovaram que células da medula óssea diferenciam-se em células que expressam marcadores neuronais.

Neste mesmo sentido, muito se tem estudado sobre a plasticidade das células tronco da medula óssea (CTMOs) e sua habilidade em selecionar linhagens atípicas quando colocadas em ambientes não-hematopoiéticos (Figura 4). Por exemplo, quando implantadas no encéfalo de ratos, células da medula óssea humanas não se transdiferenciaram em neurônios, mas perderam algumas de suas características e migraram por vias bem estabelecidas de migração neuronal (Azizi *et al.* 1998).

Entretanto, os estudos realizados até o momento não excluem totalmente explicações alternativas para a possível plasticidade de CT adultas (Frisén 2002). Assim, o debate continua em aberto (Phinney e Prockop 2007) quanto às observações de que essas células se transdiferenciam em células de tecidos diferentes daquele a partir do qual foram obtidas.



**Figura 4.** Plasticidade das células tronco da medula óssea. Fonte: *Stem Cell Information, The National Institutes of Health resource for stem cell research.*

### 1.4.1 Células tronco da medula óssea (CTMO)

A medula óssea (MO) é uma fonte permanente de células tronco (Korbling e Estrov 2003). Uma das populações de células da MO, as células tronco hematopoiéticas, é responsável pela formação de todos os tipos de células sangüíneas do corpo. A população de células estromais da MO pode gerar, entre outros, osso e cartilagem (Korbling e Estrov 2003; Petersen *et al.* 1999). As células tronco mesenquimais encontram-se imersas no estroma medular. Essa população que se diferencia em células endoteliais foi identificada com sendo originária da medula óssea (Shi *et al.* 1998). Assim, a MO parece conter três tipos de populações de células tronco: hematopoiéticas, estromais (mesenquimais) e possivelmente progenitoras endoteliais.

Como já mencionado, muito se tem discutido sobre a plasticidade de células tronco adultas, incluindo as células tronco da medula óssea. Por exemplo, já foi demonstrado que células da medula óssea de camundongos podem dar origem a microglia (Eglitis *et al.* 1997), e neurônios *in vivo* (Brazelton *et al.* 2000; Mezey *et al.* 2000). Porém, ainda não se sabe qual subpopulação(ões) da MO foi capaz de expressar este desenvolvimento neuronal. Além disso, a transdiferenciação de células da MO em neurônios no sistema nervoso central foi também demonstrada em seres humanos (Cogle *et al.* 2004). Parece que a incorporação destas células no tecido nervoso é intensificada frente a um dano tecidual. Ainda, mesmo que estas células não regenerem 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 (Terada *et al.* 2002).

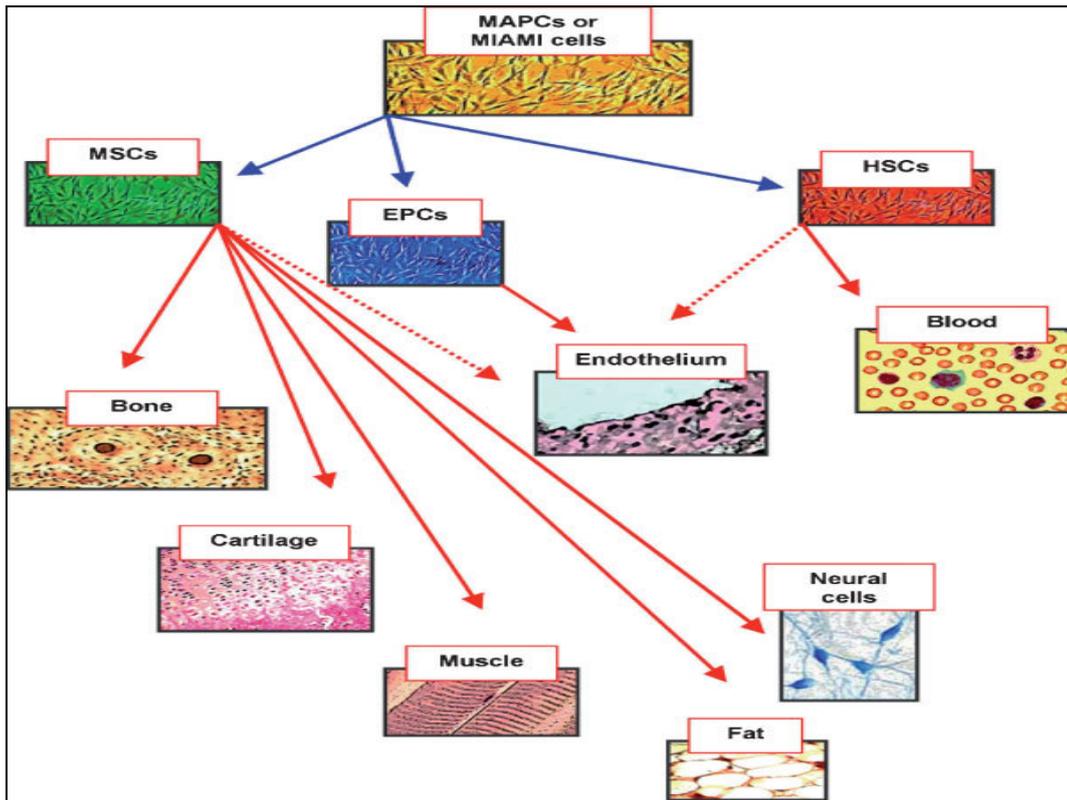
As vantagens em se estudar CT adultas em contraste com as embrionárias incluem a maior facilidade de obtenção das primeiras, sendo que as CT da MO podem ainda ser obtidas em maior quantidade (ideal para aplicação clínica) do que as demais células tronco adultas. Ainda mais, elas podem ser obtidas a partir 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 transplantados. Finalmente, existem questões ético-religiosas que envolvem o uso de células tronco embrionárias, que se anulam no caso de uso de células tronco da medula óssea.

#### **1.4.2 Células Tronco Mesenquimais (CTM)**

A primeira evidência direta de que a medula óssea contém células precursoras de tecidos mesenquimais não hematopoiéticos advém do trabalho de Friedenstein e colaboradores, iniciado em Moscou nos anos 60 - 70 (Phinney 2002). Em seus experimentos, Friedenstein dispensava amostras de medula óssea suspensas em meio de cultura em frascos de cultura de tecidos e a fração aderente era cultivada. Por volta do terceiro ao quinto dia, focos discretos de dois a quatro fibroblastos surgiam nas culturas, entre histiócitos e células mononucleares (Friedenstein *et al.* 1976). Em uma revisão sobre o assunto, Prockop (1997) acrescenta que a característica mais marcante dessas células era sua capacidade de se diferenciarem em colônias que lembravam pequenos depósitos de osso ou cartilagem. Nos anos 80, diversos estudos estabeleceram que células isoladas pelo

método de Friedenstein eram multipotentes e capazes de se diferenciar em osteoblastos, condroblastos, adipócitos, e até mioblastos (Prockop 1997). Em 1991, Caplan, tomando como base modelo do sistema estromal proposto por Owen em 1985, criou o termo célula tronco mesenquimal para designar a célula que dá origem aos diferentes tipos de tecidos mesenquimais da medula óssea.

As CTMs são células primordiais de origem mesodérmica que podem dar origem a células musculares esqueléticas, tecido sanguíneo, sistemas vascular e urogenital (Prockop 1997; Beyer Nardi 2006; Sethe *et al.* 2006). As células em questão são consideradas células do tipo tronco, capazes de se diferenciar nas linhagens mesenquimais e não-mesenquimais, na verdade, em: ossos, cartilagem, tecido adiposo e mioblastos, entre outros (Figura 5) (Pittenger 1999; Bianco 2000).



**Figura 5.** Diagrama hierárquico das células tronco. Estão indicadas células da linhagem mesenquimal e não-mesenquimal originadas de diferentes tipos de células tronco. As setas pontilhadas indicam rotas possíveis de diferenciação. MSC: *mesenquimal stem cell*; HPC: *hematopoietic stem cell*; EPC: *endothelium stem cell* (Giordano Antonio 2007).

As CTMs isoladas a partir da medula óssea de organismos adultos são caracterizadas como aderentes ao plástico, com aspecto fibroblastóide e com a capacidade de se diferenciarem em osteoblastos, condrócitos e adipócitos *in vitro* (Dominici *et al.* 2006). As populações de CTM obtidas a partir de diversos tecidos comumente expressam determinados receptores de superfície, entre eles, CD29, CD44, CD49a-f, CD51, CD73, entre outros. Além disso, possuem uma expressão diminuída de marcadores de linhagem hematopoética incluindo, CD11b, CD14, e CD45 (Tondreau *et al.* 2005).

Em 1999, Kopen e colaboradores demonstraram pela primeira vez que CTMs injetadas no sistema nervoso central de camundongos recém-nascidos migravam

através do cérebro e eram capazes de adotar características morfológicas e fenotípicas de astrócitos e neurônios (Kopen *et al.* 1999).

As CTMs também têm demonstrado uma alta propensão para melhorar os danos teciduais decorridos do desenvolvimento de doenças. Estas células têm sido eficazes como vetores terapêuticos em modelos animais de dano pulmonar (Ortiz *et al.* 2003; Ortiz *et al.* 2007), doença renal (Kunter *et al.* 2006), diabetes mellitus (Lee *et al.* 2006), infarto do miocárdio (Minguell e Ericas 2006) e várias outras doenças neurológicas (Zappia *et al.* 2005).

#### **1.4.3 Células tronco no tratamento de doenças do sistema nervoso**

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. Em grande parte das doenças neurológicas os danos são freqüentemente irreversíveis, já que mesmo que o sistema nervoso central adulto abrigue inúmeras células com potencial de regeneração, ele não consegue recrutá-las de maneira efetiva. Logo, 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.

O potencial terapêutico das células tronco nas doenças do SNC tem sido intensamente pesquisado. 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 (Haas *et al.* 2005; Dunnet e Rosser 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 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 (Dezawa *et al.* 2001). 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 (Mimura *et al.* 2004). Outros dados indicam que CTMO migram da corrente sanguínea para a área isquêmica e, uma percentagem pequena delas, expressa marcadores neurais (Azizi *et al.* 1998; Eglitis *et al.* 1999; Li e Chopp 2001). Também há relatos de melhora funcional em modelos experimentais da doença de Alzheimer (Wu *et al.* 2008), de Huntington (Lescaudron *et al.* 2003) e de esclerose lateral amiotrófica (Vercelli *et al.* 2008).

#### **1.4.4 Terapia celular no tratamento da epilepsia**

A incapacidade de tratar todos os pacientes portadores de epilepsia refratária constitui-se como um estímulo para que novas opções terapêuticas sejam investigadas. Podem-se aplicar duas estratégias para o uso de células no tratamento

das epilepsias refratárias: as células podem ser transplantadas, numa tentativa de repor os neurônios perdidos, ou ainda, através da manipulação das células endógenas do próprio paciente para que estas interfiram no processo patológico (Raedt *et al.* 2007).

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. Esta observação vem estimulando a pesquisa que objetiva repor seletivamente os neurônios perdidos durante o processo da doença, bem como os mediadores fisiológicos que eles produzem. Estratégias terapêuticas envolvendo o transplante de células tronco e terapia gênica começam a ser estudadas em modelos experimentais de epilepsia. Entre elas está o uso células neurais fetais (Zaman *et al.* 2000), células liberadoras de adenosina (Huber *et al.* 2001), células produtoras de GABA (Gernet *et al.* 2002) e células tronco neurais (Chu *et al.* 2004).

Em estudos sobre a EMT, sugeriu-se a existência de uma perda gradual e intensa de neurônios nas várias regiões hipocâmpais. Modelos celulares que mimetizam a neuropatologia humana sugerem que a EMT é uma consequência da atividade epiléptica crônica. Isto implica também, numa perda dos interneurônios do hipocampo propriamente dito e GD, além de modificações morfológicas progressivas das células piramidais remanescentes (Blümcke *et al.* 1996; Blümcke *et al.* 1999; Jorge *et al.* 1996). Assim, acredita-se que estratégias que permitam a restauração do micro ambiente neuronal, bem como de populações ou circuitos neurais, propiciando, com isto, o re-estabelecimento da excitabilidade neuronal fisiológica, possam contribuir para o tratamento dos distúrbios epilépticos.

Dado que a medula óssea é uma fonte permanente de CT 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 CT no tratamento das epilepsias refratárias, principalmente para aquelas que têm um curso progressivo pela frequência de crises associada à polifarmácia.

Considerando que aproximadamente 1/3 dos pacientes com epilepsia são refratários ao tratamento medicamentoso (Löscher 2002b) pode-se afirmar que há um potencial muito grande para a terapia com células tronco mesenquimais no tratamento das epilepsias refratárias, principalmente para aquelas que têm um curso progressivo pela frequência de crises associada à polifarmacoterapia. Estas observações estimulam pesquisas que objetivem repor seletivamente os neurônios perdidos durante o processo da doença, bem como restaurar as funções danificadas. Visando explorar este potencial, nosso estudo se propôs a verificar o efeito das células tronco da medula óssea, no tratamento da epilepsia por meio de injeção periférica de células da porção mononuclear da MO submetidas à cultura (CTM) de camundongos C57BL/6-EGFP e do lisado de células da medula óssea, em ratos com epilepsia induzida por lítio-pilocarpina.

## **2 OBJETIVOS**

### ***2.1 Objetivo Geral***

Verificar se o xenotransplante de células mesenquimais e lise celular da medula óssea de camundongos apresenta potencial terapêutico no controle das crises epiléticas, e do dano neuronal progressivo induzido pela epilepsia experimental, através da restauração da população e/ou conexões neurais perdidas em ratos tratados com lítio-pilocarpina.

### ***2.2 Objetivos Específicos***

Em ratos com epilepsia induzida pelo modelo do lítio-pilocarpina:

1. Avaliar a frequência de crises epiléticas após o transplante das células mesenquimais e lise celular da medula óssea.
2. Avaliar o desempenho cognitivo dos animais após o transplante das células mesenquimais e lise celular da medula óssea.

3. Avaliar a densidade neuronal de CA1, CA2, CA3 e CA4 em ambos os hemisférios após o transplante das células mesenquimais e lise celular da medula óssea.
  
4. Avaliar o volume dos núcleos: hipocampo, CA1, CA2, CA3 e CA4 em ambos os hemisférios após o transplante das células mesenquimais e lise celular da medula óssea.
  
5. Avaliar o número total de células existentes nas áreas: CA1, CA2, CA3 e CA4 em ambos os hemisférios após o transplante das células mesenquimais e lise celular da medula óssea.
  
6. Avaliar se as células EGFP transplantadas migraram até o sistema nervoso central.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Durante este estudo foram utilizados ratos, da linhagem Wistar, pesando entre 90 e 120 gramas, com 30 dias de vida. Todos os animais eram procedentes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Durante os experimentos, os animais foram mantidos em caixas apropriadas com capacidade para 05 animais, forradas com maravalha no alojamento do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS), sob iluminação e temperatura controladas (ciclo claro-escuro de 12 horas e aproximadamente 24°C), ração e água *ad libitum*.

Também foram utilizados camundongos C57BL/6N transgênicos machos e adultos (C57BL/6-EGFP), pesando entre 25 e 30 gramas, com 30 a 60 dias de vida. Estes animais foram doadores de CTM e expressam EGFP (*enhanced green fluorescent protein*), proteína verde fluorescente (Okabe *et al.* 1997) que serviu como marcador das células transplantadas. Estes animais eram provenientes da Fundação Oswaldo Cruz – Bahia, e foram mantidos no Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, sob as mesmas condições citadas acima.

### **3.2 Delineamento Experimental**

Foram estabelecidos cinco grupos de estudo (Tabela 1) segundo o protocolo descrito abaixo (Figura 6).

**Grupo I – PILO:** Neste grupo foi induzido SE mediante aplicação do modelo lítio-pilocarpina. Para isto, os ratos receberam primeiramente cloreto de lítio (127 mg/kg; i.p.; Sigma). Vinte e quatro horas depois receberam via intraperitoneal PILO (60 mg/kg, Sigma) conforme previamente descrito (Cavalheiro *et al.* 1991). Para cessar as manifestações comportamentais da PILO (Priel *et al.* 1996) os ratos receberam diazepam (10 mg/kg, i.p., 90 minutos após a instalação do SE). Os ratos foram pré-tratados com metilscopolamina (1mg/kg, i.p.) para atenuar as manifestações periféricas da pilocarpina. Durante toda a semana seguinte ao tratamento com pilocarpina, os animais receberam Hidrafix® por gavagem (Composição: cloreto de sódio, 4,68 mg; citrato de potássio, 2,16 mg; citrato de sódio, 0,98 mg; e glicose, 20,0 mg) para reposição de água e sais. Ao completarem-se 21 dias da injeção de PILO os animais receberam 200 µL de solução salina via veia da cauda.

**Grupo II – PILO+CTM:** Os animais receberam tratamento idêntico ao do grupo I, exceto que ao completarem 21 dias da injeção de PILO, receberam transplante de CTM no lugar de salina (200 µL contendo  $10^{4-6}$  células mesenquimais EGFP<sup>+</sup>), via veia da cauda.

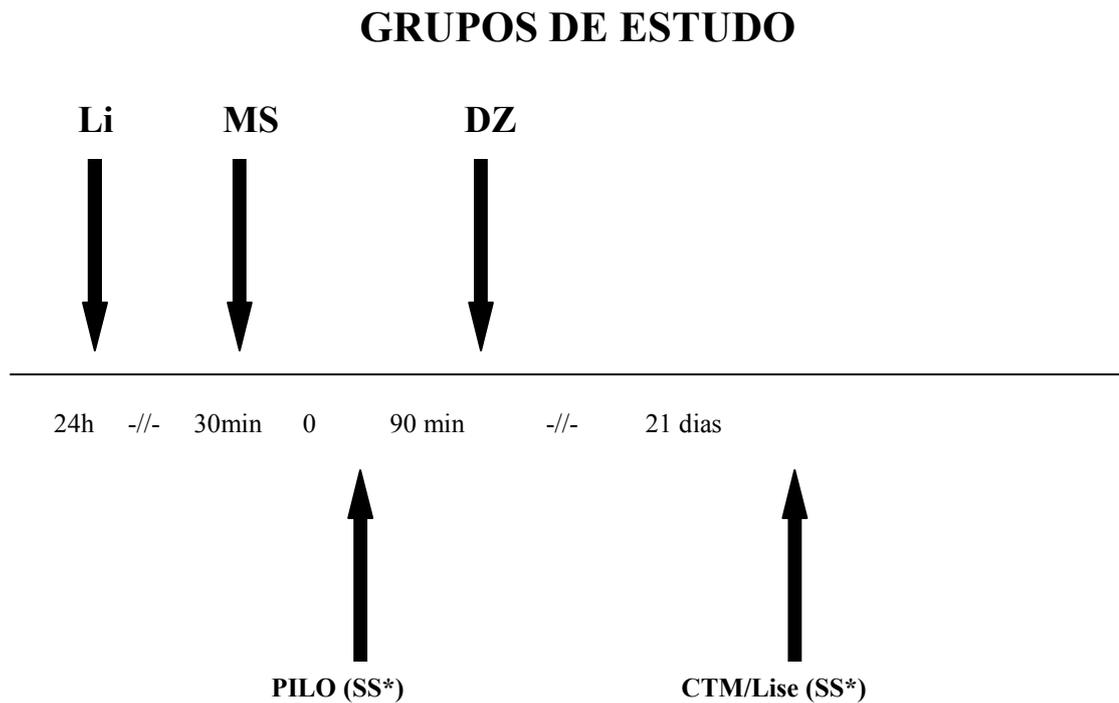
**Grupo III – Salina:** Estes animais receberam solução salina em substituição à PILO aos 30 dias de vida, e 200 µL de solução salina via veia da cauda após completarem 21 dias da injeção de salina.

**Grupo IV – Salina+CTM:** Estes animais receberam solução salina em substituição à PILO aos 30 dias de vida, e CTM (200 µL contendo  $10^{4-6}$  células mesenquimais EGFP+) após completarem 21 dias da injeção de salina.

**Grupo V – PILO+Lise:** Estes animais receberam solução de lise celular, em um volume de 200µl, e número total de células EGFP+ de  $10^7$ , que foram submetidas a uma temperatura negativa de  $196^{\circ}\text{C}$  em nitrogênio líquido e por isso tiveram o rompimento de suas membranas celulares.

**Tabela 1.** Constituição dos grupos a partir do tratamento com pilocarpina (PILO), lise celular (LISE) e/ou células mesenquimais da medula óssea (CTM).

<b>GRUPOS</b>	<b>INJEÇÃO PILO</b>	<b>INJEÇÃO CTM</b>	<b>INJEÇÃO LISE</b>
Grupo I	Sim	–	–
Grupo II	Sim	Sim	–
Grupo III	–	–	–
Grupo IV	–	Sim	–
Grupo V	Sim	–	Sim



**Figura 6.** Delineamento do estudo. Legenda: Li: Cloridrato de Lítio; MS: Mestilescopolamina; PILO: Pilocarpina; DZ: Diazepam; CTM: Células mesenquimais da medula óssea; Lise: Células da medula óssea que foram submetidas ao nitrogênio líquido; SS: Solução salina.

### ***3.3 Indução da Epilepsia com o Uso do Modelo Lítio-Pilocarpina***

Após a injeção de PILO, os ratos permaneceram em caixas de acrílico transparentes (Figura 10) e observadores treinados acompanharam as manifestações destes animais, utilizando a escala de Racine para classificá-las (Racine 1972) (Figura 7). Foram incluídos no estudo somente os animais que atingiram os graus 4 e 5 desta escala.

<p style="text-align: center;"><b>ESCALA DE RACINE (1972)</b></p> <p style="text-align: center;"><b>0 - Imobilidade</b></p> <p style="text-align: center;"><b>1- Automatismos faciais</b></p> <p style="text-align: center;"><b>2- Mioclonias de cabeça e pescoço</b></p> <p style="text-align: center;"><b>3- Clonias de patas anteriores</b></p> <p style="text-align: center;"><b>4- Clonias de patas posteriores</b></p> <p style="text-align: center;"><b>5- Elevação e queda</b></p>
--

**Figura 7.** Escala de Racine contendo os graus de resposta dos animais à injeção de PILO. Fonte: Racine 1972.

### ***3.4 Preparação das Células Mesenquimais de Medula Óssea***

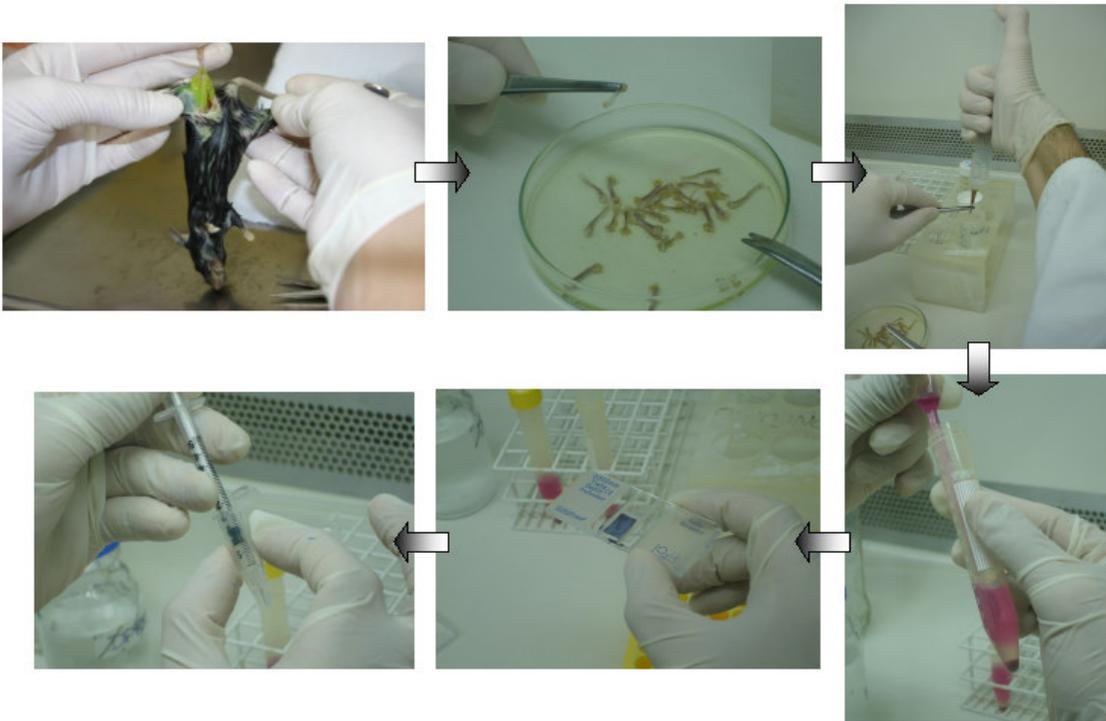
Para a obtenção das células de medula óssea, os camundongos transgênicos para a proteína fluorescente verde EGFP+ (C57BL/6EGFP) foram anestesiados com 0,4-0,6 ml de uma solução contendo quetamina (0,8%) e clorpromazina (0,2%), conforme o peso do animal e sacrificados com dose letal de Tiopental. A seguir, a tibia o fêmur e o úmero dos animais foram dissecados e, tendo então sido feitos dois cortes na região das epífises, removendo-as, possibilitando a entrada da agulha na cavidade medular, onde foram injetados 10 mL de DMEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium - GibcoBRL) sem soro.

O material obtido foi ressuspenso e centrifugado a 1.500 rpm durante 10 minutos. O pellet foi ressuspenso em DMEM sem soro, num volume de cerca de 4 mL e transferido para um outro tubo de 15 mL contendo 4 mL de Ficoll-Paque (densidade 1.077 g/mL – Sigma Aldrich) (diluição Ficoll:meio de 1:1), evitando que as duas fases líquidas se misturem. Centrifugou-se a 400 g por 30 minutos à

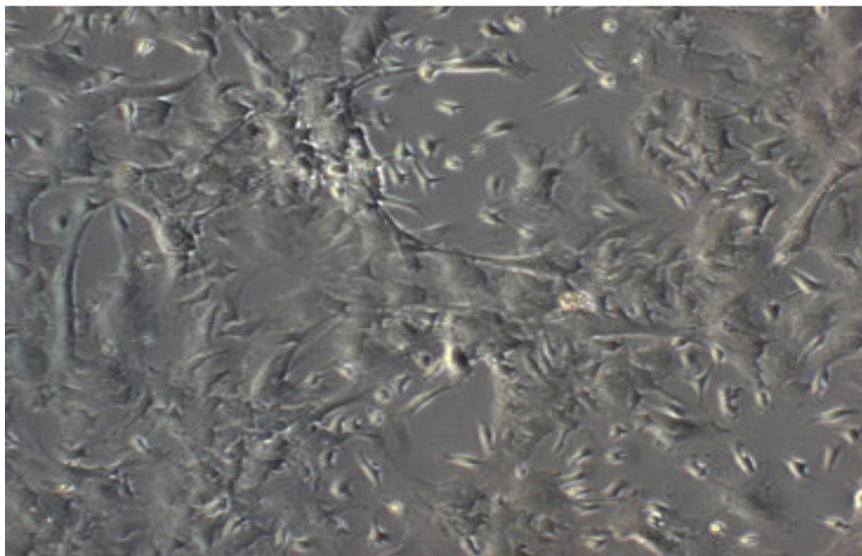
temperatura ambiente. A seguir, foi coletado o anel de células mononucleares na interface Ficoll-meio de cultura e as células foram lavadas com 15 ml de DPBS por duas vezes. Centrifugou-se novamente a 1.500 rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente, desprezando o sobrenadante.

As células foram ressuspensas com 1 ml de DPBS e foi realizada contagem e avaliação da viabilidade pelo método de exclusão com azul de Tripan em câmara de Neubauer. Por fim, as células foram cultivadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup>, com 5 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (inativado) (FBS, Invitrogen Inc, USA), 1% de estreptomicina-penicilina (10.000 g/ml, 10.000 U/ml, Invitrogen Inc, USA) e 0,1% de gentamicina(10 mg/ml, Invitrogen Inc, USA),

Quando as células em cultivo alcançaram confluência de aproximadamente 80% foi feita a passagem para um recipiente maior de cultura. O meio de cultura foi removido e as células mesenquimais permaneceram aderidas ao frasco. Essas células foram lavadas com DPBS sem soro para remover o soro fetal bovino (SFB) residual e incubadas com 5 mL de Tripsina/EDTA tripsina (0,5%)/EDTA 5,3 mM (Invitrogen Inc, USA), a 37°C até se destacarem (cerca de 4 minutos). Um volume igual de meio DMEM suplementado com SFB foi adicionado para neutralizar a ação da tripsina. As células foram centrifugadas a 1.500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas com DMEM suplementado e transferidas para garrafas de 75 cm<sup>2</sup>, a cultura de células sofreu duas passagens.



**Figura 8.** Obtenção de CTM de camundongos C57BL/6-EGFP. Os animais foram sacrificados e dissecados, isolam-se os ossos longos, e procede-se a lavagem das cavidades ósseas. O material coletado foi colocado sob um gradiente de ficoll, e as células mononucleares observadas foram contadas em câmara de Neubauer e aliquotadas.



**Figura 9.** Fotomicrografia de uma cultura de células tronco mesenquimais aderidas ao plástico (aumento de 200x).

### **3.5 Caracterização das Populações Celulares Presentes**

As células provenientes da medula óssea de camundongos C57/BL6 antes das células serem cultivadas e as células mesenquimais após, pelo menos, duas passagens foram avaliadas por citometria de fluxo com os seguintes anticorpos: CD19, CD45, CD19/CD45, CD117, Sca-1, CD117/Sca-1, CD34 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 centrifugada 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 em citômetro de fluxo. 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.

### **3.6 Lise Celular**

As células mononucleares da medula óssea ( $10^7$  células) obtidas dos camundongos transgênicos para EGFP<sup>+</sup> foram rompidos (200µl) a uma temperatura de -196C° em nitrogênio líquido, para verificar o possível efeito do conteúdo citoplasmático dos mesmos.

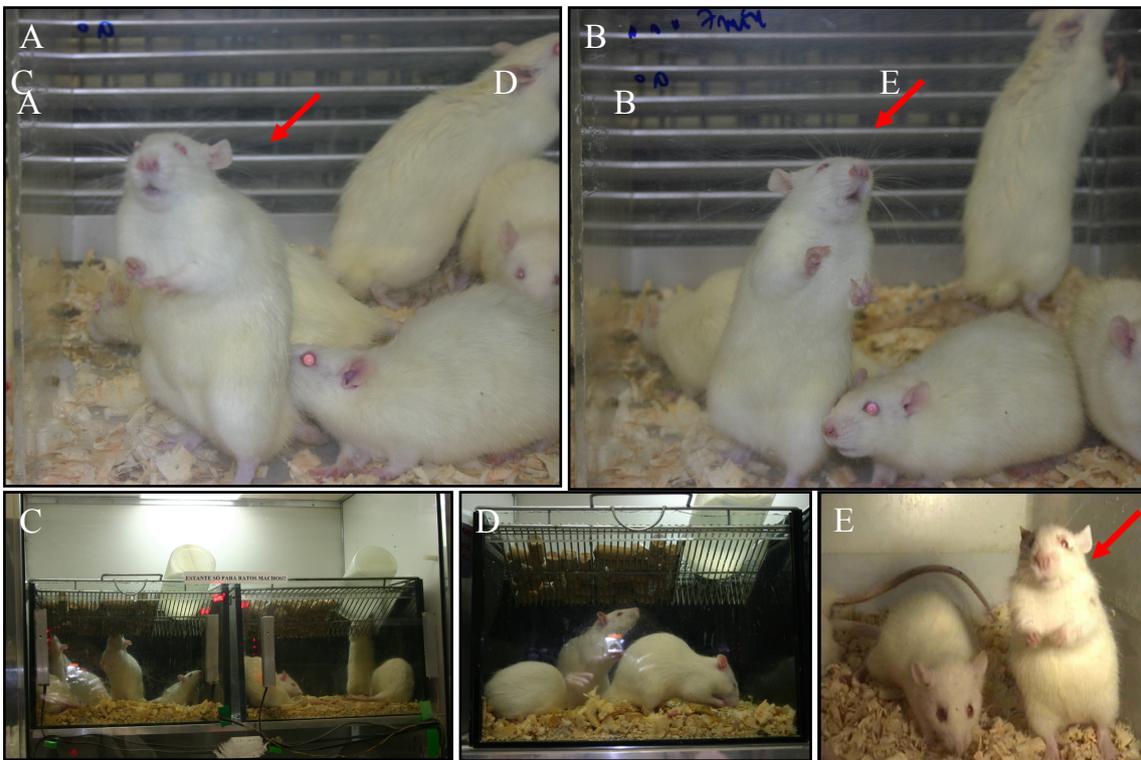
### **3.7 Monitoramento das Crises Espontâneas Recorrentes.**

Passados 13 dias da indução do SE (correspondentes ao período latente, no qual há ausência de crises comportamentais), os animais foram previamente marcados com tinta preta em diferentes locais do corpo, e alojados em gaiolas de frente transparente para que pudessem ter suas crises filmadas sem a necessidade de remoção do seu ambiente. Os animais foram filmados por um período de 12 horas (6 horas do ciclo claro e 6 horas do ciclo escuro) ao longo de sete dias e após receberam o transplante de CTM. A partir daí, estes grupos continuaram sendo monitorados por vídeo durante mais 14 dias seguidos.

Como mencionado, para o registro das imagens dos animais foi utilizada gaiola cuja parte da frente era transparente possibilitando assim a visualização dos animais a serem filmados. Estas gaiolas foram instaladas em armário com circulação interna de ar, através de um ventilador de entrada que o abastece com ar do ambiente externo e exaustor, que retira todos os odores. Em frente, foi instalada uma câmera de vídeo preto e branco, com 0,3 lux (lux: unidade de medida da intensidade de luz), que é sensível ao comprimento de onda da luz infravermelha, assim, sendo possível capturar a imagem durante a noite. Completando o sistema, existem refletores de luz infravermelha para iluminar o ambiente e viabilizar o monitoramento no escuro. A câmera foi conectada a dois vídeos cassetes, e uma televisão, instalados dentro de um segundo armário específico.

Através desta tecnologia nos tornamos aptos a monitorar a frequência e tipo de crises epiléticas, as quais foram posteriormente quantificadas no período basal. Foram identificadas crises com manifestações comportamentais visíveis e

graduadas conforme a escala de Racine, sendo que se determinou e contou-se como crise toda manifestação comportamental que tinha correspondência com os graus 4 e 5 da escala de Racine (Figura 10). A contagem do número de crises convulsivas foi feita por observadores cegos e independentes. Os animais tratados com lítio-pilocarpina que não apresentaram crises espontâneas nos primeiros sete dias de filmagem foram excluídos do estudo.



**Figura 10.** Demonstração do controle dos animais durante o SE (A-B) e durante a vídeo-monitoração (C-D). Em A, B e E a seta (vermelha) indica um dos animais em crise (grau de Racine 5).

### **3.8 Avaliação Comportamental**

O tratamento com lítio-pilocarpina leva à atrofia hipocampal, e é sabido que o hipocampo desempenha um papel fundamental na formação e evocação de distintos tipos de memória incluindo aquelas com alto conteúdo emocional e de localização

espacial. Para avaliar se o déficit cognitivo causado pelas crises recorrentes neste modelo pode ser revertido pelo transplante de CTM, utilizamos a tarefa do labirinto aquático de Morris, que requer integridade hipocampal. Os animais também foram submetidos às tarefas de exploração ao Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado para avaliarmos respectivamente o efeito das CTM sobre a locomoção e a orientação espacial, ou ainda sobre a ansiedade.

### **3.8.1 Labirinto Aquático de Morris**

O teste de aprendizagem espacial no labirinto aquático foi introduzido por Morris (Morris 1984) e tem sido muito utilizado no estudo da memória. Nesta tarefa o animal aprende a localizar uma plataforma submersa numa piscina utilizando para isto dicas espaciais distribuídas na sala de treino. Experimentos realizados recentemente em nosso laboratório demonstram que ratos que foram induzidos à epilepsia, apresentam sérios problemas na aquisição da memória associada com o aprendizado da versão espacial da tarefa do labirinto aquático de Morris (LAM) (Costa-Ferro 2008). É bastante provável que o deterioro mnemônico produzido pelo tratamento com lítio-pilocarpina seja devido à perda neuronal progressiva que acontece no hipocampo em decorrência das sucessivas crises epiléticas.

Para a realização da tarefa do LAM, foi utilizado um tanque circular preto (180 cm de diâmetro e 55 cm de altura) com 25 cm de água a 21-24° Celsius, dividido em quatro quadrantes imaginários. A plataforma, de acrílico, pintada de preto, quadrada (20 cm de lado, superfície áspera), foi posicionada no centro de um dos quatro quadrantes virtuais do tanque, à mesma distância da parede e do centro do tanque, e ficou submersa a 2 cm abaixo do nível da água, invisível aos animais. Além disso,

as paredes da sala continham dicas visuais, com diferentes formatos e cores, visíveis de qualquer ponto de dentro do tanque (Figura 11).



**Figura 11.** Vista geral do labirinto aquático.

Assim, após receberem transplante de CTM, lise celular ou solução salina, os animais foram treinados nesta tarefa como descrito em (Santos 1999). Brevemente, colocou-se o animal na piscina e se lhe permitiu nadar livremente até que encontrasse a plataforma submersa. Caso não a encontrasse em 60 segundos, coube ao experimentador conduzi-lo até a plataforma. Os animais permaneceram na plataforma por 30s. Na avaliação da memória de referência, a plataforma permaneceu no mesmo lugar durante os vários dias de treino, quando foi analisada a latência.

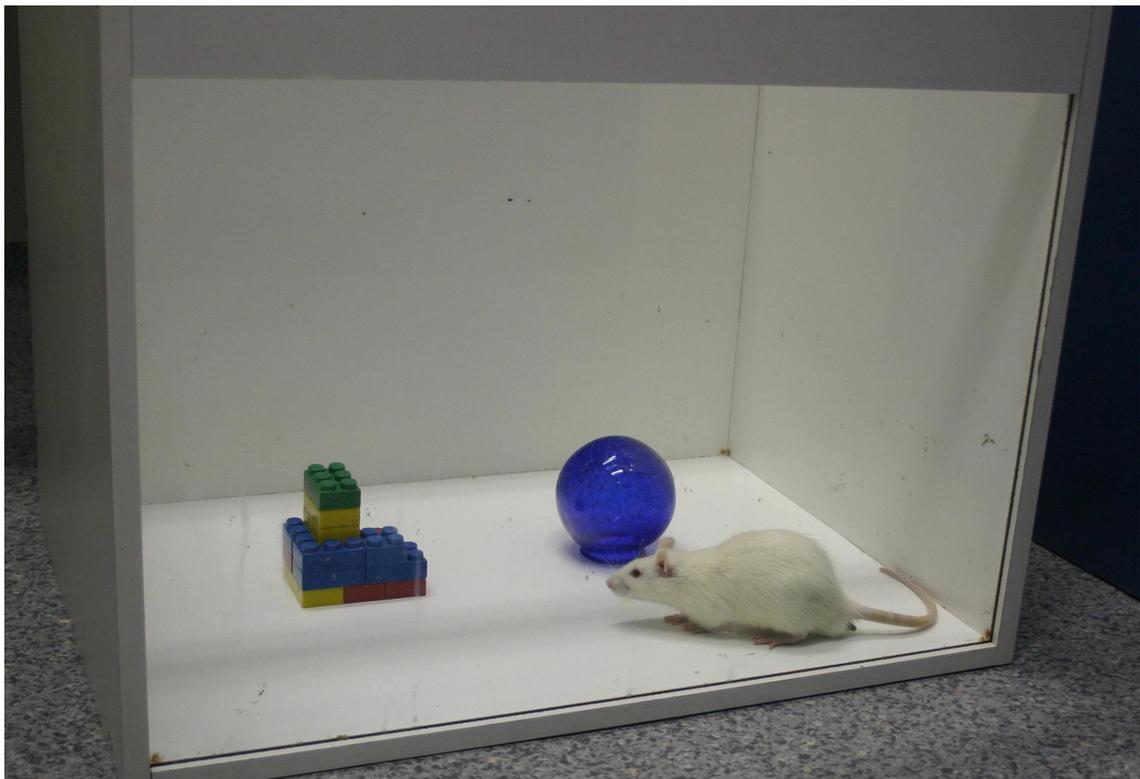
Foram realizadas sessões com oito largadas diárias durante cinco dias, sendo que no sexto dia, a retenção de memória dos animais foi testada (24 horas após término do treino). Para isto a plataforma foi retirada, e o animal permaneceu na piscina por 60 segundos. Analisou-se a velocidade de natação, o número de cruzamentos através de um aro imaginário localizado na região onde estava à plataforma, a latência e o tempo que o animal passou no quadrante onde estava a plataforma durante o treino, mediante monitoramento por vídeo e um software especializado. Os animais foram manipulados por dois dias consecutivos antes do início do período de treinos. Os animais foram posicionados no tanque manualmente, virados para a parede, no centro de um dos quadrantes determinados. No treino, em cada tentativa o animal foi largado de uma posição cardinal diferente, que foi randomizada entre as sessões e as tentativas. Durante o teste na ausência da plataforma, o animal foi largado da posição sul.

### **3.8.2 Paradigma de Reconhecimento de Objetos**

O paradigma de reconhecimento de objetos utiliza a tendência natural que os roedores têm de explorar objetos novos para medir sua memória (Ennaceur e Delacour 1988). A tarefa consiste em um treino no qual são apresentados dois objetos, seguido de um teste em que um dos objetos introduzidos durante o treino é substituído por um objeto novo. Roedores tendem a explorar o objeto novo por mais tempo, demonstrando assim memória do objeto familiar.

Para estes experimentos, os animais foram expostos a um campo aberto (60x40x50 cm, comprimento x profundidade x altura), feito de madeira, com frente de vidro durante 20 minutos por 4 dias consecutivos para habituação, na ausência de

objetos. No quinto dia, foram dispostos no campo aberto, de maneira equidistante, dois objetos que diferiam entre si quanto a sua cor, altura, formato e textura, presos ao campo aberto pela base. Os objetos e o campo aberto foram limpos com etanol 70% após cada treino para remover dicas olfativas. Foram consideradas atividades exploratórias do animal: farejar o objeto ou tocá-lo com as patas dianteiras ou focinho, mas não virar o objeto ou sentar-se nele. Durante o treino, os animais foram colocados no campo aberto durante 5 minutos. O tempo percentual gasto explorando cada objeto foi calculado e expresso como percentual do tempo total de exploração em segundos. (Figura 12). Os observadores eram cegos ao tratamento.



**Figura 12.** Animal durante treino na tarefa de reconhecimento de objetos.

O teste de retenção foi feito 24 horas após a sessão de treino. Durante este teste, os animais foram novamente colocados no campo aberto onde um dos objetos

foi previamente trocado por outro com características de cor, formato, textura e alturas diferentes, e o tempo percentual gasto explorando cada objeto foi novamente calculado com intuito de avaliar a memória de longa duração. Durante o teste os animais permaneceram no campo aberto durante o mesmo tempo (5 minutos) do treino.

### **3.8.3 Campo Aberto**

O aparato da tarefa de exploração ao campo aberto era uma caixa retangular com dimensões de 40 x 30 x 50 cm (comprimento x profundidade x altura) com uma parede frontal de vidro. O assoalho da caixa foi dividido por linhas que formam 12 retângulos idênticos (figura 13). Durante o experimento, o animal foi colocado gentilmente na caixa e deixado ali para explorá-la livremente por 5 minutos. Durante este tempo, foi computado o número de cruzamentos das linhas e o número de elevações (rearings), para avaliar a atividade locomotora e o comportamento exploratório dos animais (Bonini *et al.* 2006).



**Figura 13.** Campo aberto.

#### **3.8.4 Labirinto em Cruz Elevado**

Para avaliar o estado de ansiedade dos animais, utilizou-se a tarefa do labirinto em cruz elevado. O labirinto em cruz elevado consistiu em um aparato em forma de cruz, elevado 1 metro do chão e formado por quatro braços de 40 cm de comprimento e 10 cm de largura (figura 14). Dois braços opostos eram fechados por paredes de 26 cm de altura, enquanto os outros dois permaneciam abertos. Os animais foram colocados na arena central e permitiu-se que explorassem o aparato por 5 minutos durante os quais foram contabilizadas as entradas e o tempo despendido nos braços abertos e fechados além das respostas de elevação (rearings). Quanto mais ansioso estiver o animal, maior é o tempo de permanência nos braços fechados e maior é o número de entradas nestes braços (da Silva et., 2006).



**Figura 14.** Labirinto em cruz elevado.

### ***3.9 Obtenção das Amostras de Regiões Encefálicas de Ratos Controles e Epilépticos***

Passadas 24 horas, 7 dias, 14 dias, 21 dias, 60 dias e 135 dias do tratamento com CMT ou salina, os ratos dos quatro grupos foram sacrificados de forma randômica e sistemática. Os ratos foram previamente pesados, anestesiados com xilasina (0,1ml/g peso corporal, i. m.) e quetamina (0,1ml/g peso corporal, i.m.) e imediatamente decapitados com uma guilhotina. Após a decapitação foi feita a craniotomia para a remoção do encéfalo. Com auxílio de uma pinça, os ossos parietais foram afastados a partir da sutura sagital e o encéfalo foi removido utilizando-se uma espátula curva.

Posteriormente, foi coletado separadamente o hipocampo direito e esquerdo. Todo o material foi congelado em nitrogênio líquido e mantido em refrigerador a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o início do preparo das amostras para a PCR.

### **3.10 Identificação de DNA EGFP das CTM de Camundongos**

#### **3.10.1 Extração de DNA**

A extração de DNA foi realizada com fenol/clorofórmio baseado no método descrito por Isola *et al.* (1994). Os tecidos foram macerados em microtubos contendo 300  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato. A seguir, foram adicionados 600  $\mu\text{L}$  de Brazol e 120  $\mu\text{L}$  de clorofórmio. O conteúdo foi homogeneizado utilizando vórtex e centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e foram adicionados 0,7x seu volume de isopropanol gelado. O conteúdo foi ressuspenso e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Procedeu-se com nova centrifugação em 14.000 rpm, por 20 minutos, o sobrenadante foi desprezado por inversão. Por fim, o *pellet* foi ressuspendido em 50  $\mu\text{L}$  água MilliQ autoclavada. Os frascos contendo as amostras de DNA foram armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Previamente à reação de PCR, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria utilizando comprimento de onda de 260 nm=1=50  $\mu\text{l/ml}$  de DNA. As amostras foram diluídas para obter um padrão concentração de 1  $\mu\text{g}$  de DNA por reação.

### 3.10.2 Detecção Molecular das CTM Transplantadas

Para verificar a presença de CMT transplantadas utilizamos a técnica da PCR. Esta 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. (Gibbs 1990). A amplificação foi realizada em termociclador MJ Research PTC-200.

Como a presença da EGFP serve de indicativo de que as células migraram a partir da sua via de administração e estão presentes nos tecidos dos animais transplantados, utilizamos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) complementares à seqüência de DNA correspondente a uma seqüência específica do gene que codifica a proteína EGFP, gerando um produto de 100 pb. Os *primers* específicos para o gene EGFP foram desenhados de modo a amplificar especificamente o gene desejado, com cuidado para não amplificar regiões homólogas nos ratos, o que foi confirmado através de alinhamento junto ao banco de dados do Blast, no website do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Os primers, reagentes e condições de PCR estão descritas na tabela 2.

**Tabela 2.** *Primers* utilizados, reagentes e condições de amplificação.

<b>Primers</b>	<b>Reagentes</b>	<b>Condições de PCR</b>
F - 5'-gggcacaagctggagtaca-3"	35,5 µl H <sub>2</sub> O	95°C - 5 min.
R - 5'-atgttggtggcggatcttga-3"	5 µl Tampão (10x)	95°C – 30 s
	3 µl MgCl <sub>2</sub> (1,5 mM)	57°C - 30 s
	1 µl dNTP (200 µM)	72°C - 20 s
	1 µl Primer F (10 pmol)	72°C - 10 min.
	1 µl Primer R (10 pmol)	4°C
	0,5 µl Taq (2,5 U)	
	5 µl DNA	

30 x

F= primer direto; R= primer reverso

Como controle positivo da reação, foi utilizado o DNA de animais C57BL/6-EGFP, e no controle negativo de reação foi omitido o seu uso.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TAE 1x, contendo brometo de etídio por 30 min aplicando uma voltagem de 100 V e uma amperagem de 400 mA. Os géis foram visualizados em transiluminador ultravioleta. O resultado foi considerado positivo para a presença de DNA de células EGFP+ quando visualizada a banda correspondente ao fragmento de 100 pb. As imagens foram capturadas utilizando equipamento de fotodocumentação através do programa Quantity One™.

### 3.10.3 Teste de Sensibilidade

Para estabelecimento de um padrão de sensibilidade da técnica de PCR, foi realizado um teste da sensibilidade analítica em que uma concentração de 0,57 µg

de DNA EGFP positivo foi adicionado a extração de DNA de rato controle a qual foi submetido ao mesmo protocolo de PCR.

Para reação de PCR foi utilizado 3,0 µl de amostra contaminada, resultando na presença da banda correspondente ao gene EGFP no gel.

### **3.11 Procedimento Histológico**

Os ratos foram anestesiados com xilasina (0,1ml/g peso corporal, i.m.) e ketamina (0,1ml/g peso corporal, i.m.), perfundidos com solução salina heparinizada, seguido por paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M (pH 7.4) em 4° C. A velocidade da condução das soluções usadas na perfusão intracardíaca foi de aproximadamente 6,6 mL/min.

Após a perfusão, o cérebro foi retirado do crânio sendo pós-fixado na mesma solução fixadora por aproximadamente 72 h. Depois de fixado, o cérebro foi lavado por 1 h em água corrente e desidratado em diferentes concentrações de álcool (70%, 80%, 90%, 95% e álcool absoluto), diafanizado em xilol e incluído em resina. Utilizando-se um micrótomo (Leica) foram realizadas secções coronais seriadas (5 µm espessura). Esses cortes foram corados com cresil violeta, e montados com Entellan. Foram analisadas as seguintes estruturas do hipocampo: CA1, CA2, CA3 e CA4 em ambos os lados, e identificados de acordo com atlas de Paxinos & Watson (1998).

### 3.11.1 Estimativa da Densidade Numérica de Células (Nv) por Volume do Disector (mm<sup>3</sup>)

A densidade numérica das células piramidais de CA1, CA2, CA3 e CA4 dos lados direito e esquerdo foi estimada pelo método do disector óptico (Sterio, 1984; Gundersen, 1988; Cruz-Orive, 1987). Foi utilizado um microscópio Olympus Bx41 com uma câmara de vídeo acoplado a uma câmara digital colorida refrigerada 3.3 m Pixel Ocolor 3C (Q imaging) Olympus a um computador e o sistema de análise de imagens (Programa de captura de imagens o Q Capture Pro 5.1 da Qimaging).

A contagem de neurônios de todas as áreas analisadas foi realizada dentro de uma área teste de 2958  $\mu\text{m}^2$ . Esta área teste apresentava duas linhas proibidas (exclusão) e duas linhas aceitáveis (inclusão). As células que tocavam as linhas proibidas não foram contadas, porém as células que tocavam as linhas aceitáveis e que se encontravam dentro da área teste foram contadas (Howard e Reed 1998). As células foram observadas num plano superior (*look up*) e um plano inferior (*look down*). A altura do *look up* e do *look down* foi determinada pelo método descrito por Korkmaz e Tümkaya, 1997. Por razão de eficiência, o núcleo da célula foi considerado a representação de um neurônio, por isso as células que apresentavam um núcleo evidente no *look up* e que não fossem visualizadas no *look down* eram contadas.

Portanto, o número dos neurônios contados na área teste ( $\Sigma Q^-$ ) foi o número de núcleos neuronais visto em somente um foco (*look up*), quando eles estão totalmente ou parcialmente dentro da área teste (Schmitz e Hof 2005, Bonthius *et al.* 2004). Analisamos 10 cortes por animal resultando em 50 amostras por grupo (n=5). Essa quantificação foi realizada separadamente por dois experimentadores, utilizando-se uma objetiva de 100 x.

A estimativa da densidade numérica foi realizada a partir da equação  $N_v = (\sum Q^-) / (V_{dis})$ , que representa o número total de células contadas ( $\sum Q^-$ ) dividido pelo volume ( $V_{dis}$ ) em que as células eram contadas. O volume do disector ( $V_{dis}$ ) foi o produto da área ( $A_T$ ) onde foi realizada a contagem e a distância entre os dois planos do disector. A fórmula utilizada foi:  $V_{dis} = A_T \times h$  (Gundersen *et al.* 1988; Mandarim-de-Lacerda, 2003)

### 3.11.2 Cálculo do Volume das Estruturas Analisadas

Foi utilizado um microscópio com uma câmara de vídeo acoplado a um computador e o sistema de análise de imagens Q Capture Pro 5.1 da Qimaging. A área das secções amostradas foram medidas através do sistema de análise de imagem, com objetiva de 4X. As imagens seriadas foram identificadas, digitalizadas e apresentadas em um monitor de computador.

As bordas do hipocampo direito e esquerdo, CA1 direito e esquerdo, CA2 direito e esquerdo, CA3 direito e esquerdo, CA4 direito e esquerdo, foram traçadas com o uso do mouse do computador. O volume das estruturas citadas anteriormente foi determinado utilizando o princípio de Cavalieri.

A estimativa de volume foi obtida através do somatório das áreas da estrutura inerente a cada secção multiplicada pela distância entre as secções que foi de 200  $\mu\text{m}$ , representada por  $V = \sum A.T$  e apresentado em  $\text{mm}^3$ .

$$V(\text{est}) = \sum A.T$$

$V(\text{est})$  = (Estimativa do volume);  $\sum A$  = (somatório das áreas);  $T$  = (distância entre as secções); (Gundersen e Jensen 1987; Cruz-Orive 1987).

### **3.11.3 Estimativa do Número Total de Células**

A partir dos dados obtidos na avaliação da densidade numérica (Nv) de células e do volume de cada área analisada (determinado por meio do princípio de Cavalieri) obtivemos o número total de neurônios do lado direito e esquerdo de CA1, CA2, CA3 e CA4 por meio da seguinte fórmula.

$$N = Nv \times V$$

Onde N= (número total de células); V= (estimativa de volume); Nv= (densidade numérica, West e Gundersen, 1990).

### **3.12 Considerações Éticas**

Esta pesquisa seguiu os princípios éticos estabelecidos de acordo com o capítulo XIV, art.94-99, das Normas de Pesquisa em Saúde da PUCRS e do conselho Nacional de Saúde - Resolução nº 1, de 13 de junho de 1998, e em observância da lei 6688, de 08 de maio de 1979.

Os protocolos experimentais para a utilização de ratos e camundongos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

### **3.13 Análise Estatística**

Para análise dos dados obtidos nos testes comportamentais de reconhecimento de objetos, LAM, campo aberto e labirinto em cruz foram utilizados testes de estatística paramétrica (ANOVA de uma ou duas vias seguidas do contraste adequado ou teste *t* de Student). O teste *t* de *Student* também foi aplicado para análise da frequência de crises. Na análise dos dados obtidos a partir dos procedimentos de histologia foi utilizado ANOVA de uma via seguido de teste de Tukey ou Newman-Keuls.

Valores com  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Toda a análise estatística foi realizada com auxílio do *software* estatístico *GraphPad Prism4*.

## 4 RESULTADOS

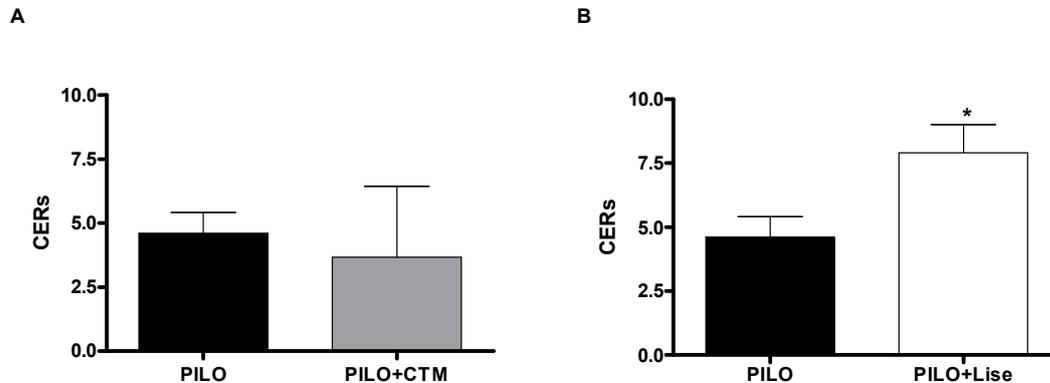
### ***4.1 O tratamento com células lisadas, mas não com CTM reduz CERs induzidas pelo lítio-pilocarpina.***

Para verificar o efeito da administração de CTM ou lisado celular na frequência de CERs, os animais foram monitorados por vídeo, sendo 41 que apresentaram CERs incluídos no estudo. Estes animais correspondem àqueles dos grupos I, II e V (PILO (n=18); PILO+CTM (n=12), e PILO+Lise (n=11)), e foram monitorados durante 21 dias. Destes, 7 dias foram anteriores à injeção de CTM, lisado celular ou solução salina (período pré-transplante), e os outros 14 dias posteriores ao transplante (período pós-transplante). A filmagem se deu a partir do 14º dia após a injeção de pilocarpina. Foram observadas e computadas as crises correspondentes aos graus 4 e 5 da Escala de Racine. Os animais que não apresentaram crises comportamentais durante o período pré-transplante foram excluídos do estudo.

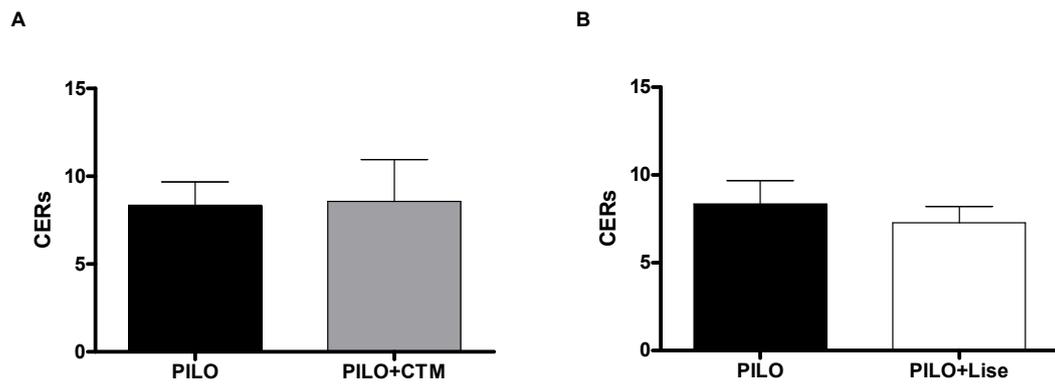
No período pré-transplante não houve diferença significativa entre os grupos PILO e PILO+CTM com relação à frequência de crises (figura 15). Entretanto, a mesma figura mostra que quando analisamos a frequência de crises nos grupos PILO e PILO+Lise, também no período pré-transplante, verificamos que o grupo PILO+Lise teve frequência de CERs significativamente maior ( $p < 0,05$ , teste  $t$  de

Student). Já no período pós-transplante, quando comparamos os grupos PILO versus PILO+CTM ou grupo PILO versus PILO+ Lise, não encontramos diferença estatística entre eles, como demonstram os dados na figura 16 (teste *t* de Student).

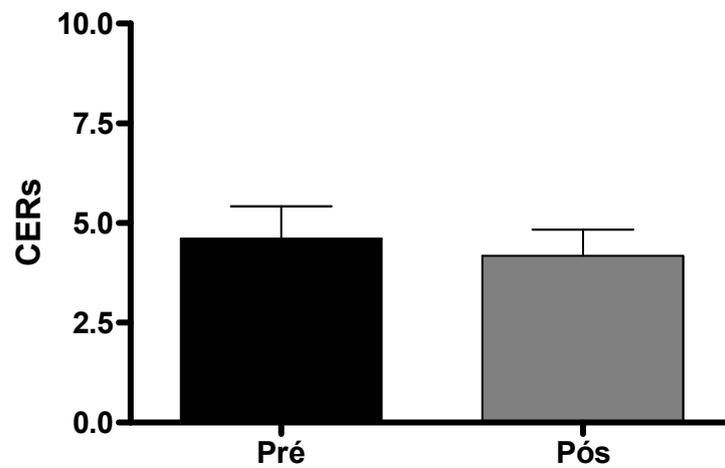
Ainda, quando comparamos os períodos pré e pós-transplante para os animais de um mesmo grupo, observamos que para os grupos PILO (Figura 17) e PILO+CTM (Figura 18) não há diferença significativa entre os períodos. Entretanto, quando analisamos a frequência de crises durante o período anterior ao transplante e a comparamos àquela do período pós-transplante para os animais do grupo que recebeu células lisadas (Figura 19), verificamos que a frequência de CERs foi significativamente menor no período pós-transplante ( $p < 0,01$ , Teste *t* de Student).



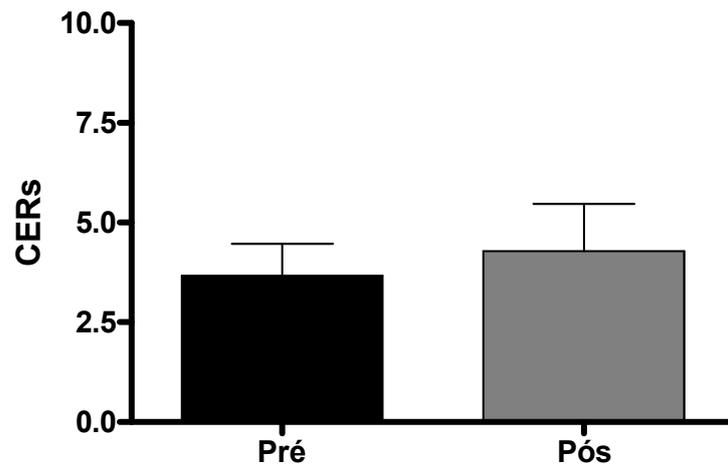
**Figura 15.** Média de CERs durante o período pré-transplante. Em A: não houve diferença entre os grupos I (PILO) e II (PILO+CTM) no período, mas em B: houve diferença estatística entre os grupos PILO e PILO+Lise. Teste *t* de Student,  $p < 0,05$ .



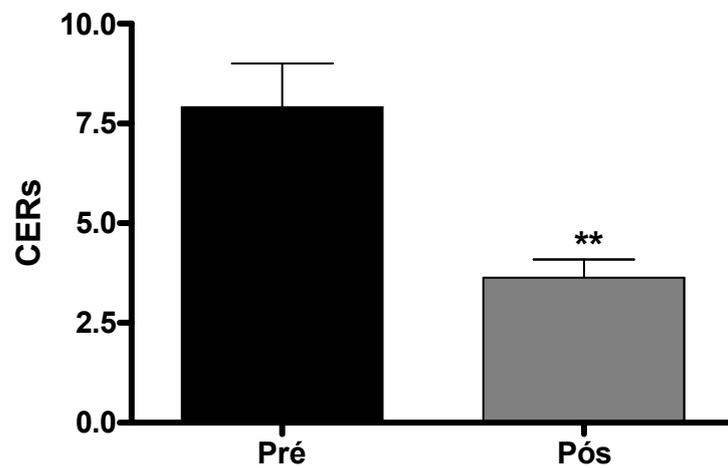
**Figura 16.** Média de CERs durante o período pós-transplante. Não houve diferença entre os grupos PILO e tratados. Em A: PILO+CTM e em B: PILO+Lise. Dados representam média de CERs  $\pm$  DP. Teste *t* de Student.



**Figura 17.** Média de CERs durante os períodos pré e pós-transplante para os animais do grupo PILO. Não houve diferença entre os períodos. Dados representam média de CERs  $\pm$  DP. Teste *t* de Student,  $p < 0,05$ .



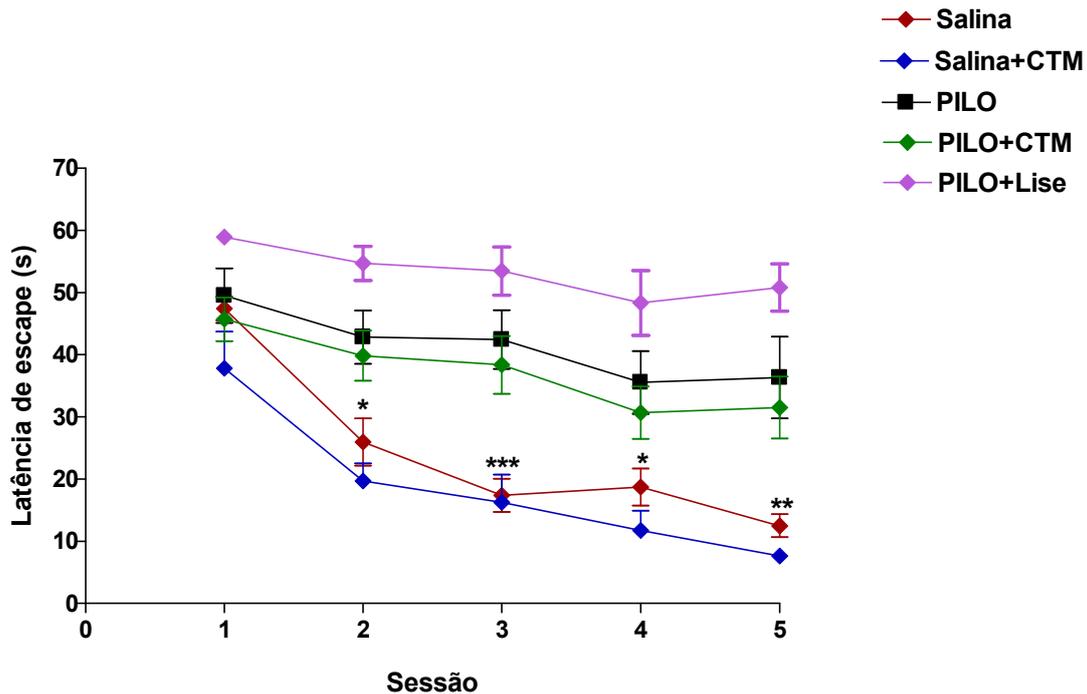
**Figura 18.** Média de CERS durante os períodos pré e pós-transplante para os animais do grupo PILO+CTM. Não houve diferença entre os períodos. Dados representam média de CERS  $\pm$  DP. Teste *t* de Student.



**Figura 19.** Média de CERS durante os períodos pré e pós-transplante para os animais do grupo PILO+Lise. A frequência de crises é menor durante o período pós-transplante. Dados representam média de CERS  $\pm$  DP. Teste *t* de Student,  $p < 0,01$ .

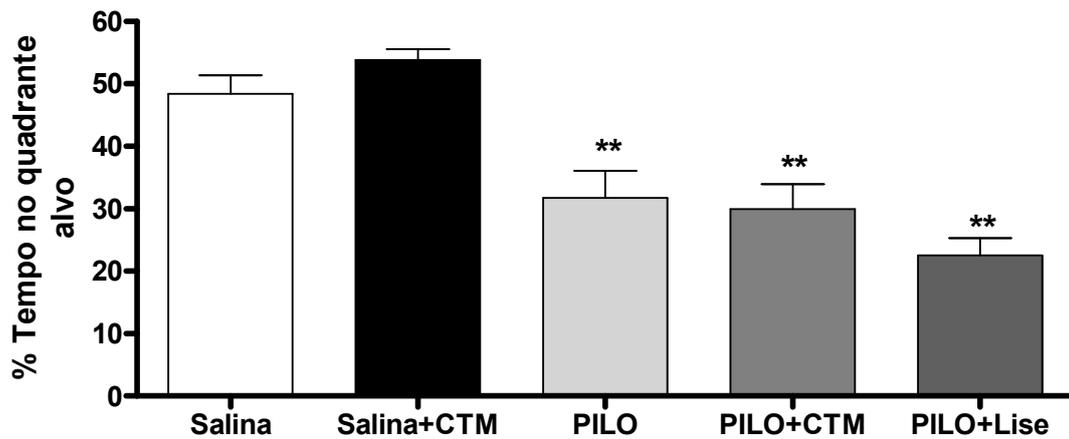
**4.2 O tratamento com CTM ou lisado celular não reverte o déficit cognitivo associado ao dano hipocampal produzido pelo lítio-pilocarpina no LAM.**

Para analisar se a administração endovenosa de CTM ou células que passaram por processo de lise influencia a aquisição de memória espacial de ratos Wistar normais e com epilepsia, estes animais foram treinados no LAM, como descrito em Materiais e métodos. Como se pode observar na figura 20 o tratamento com PILO aumentou a latência de escape ( $p < 0,05$  nos dia 2 e 4,  $p < 0,01$  no dia 5,  $p < 0,001$  vs PILO). A administração de CTM 45 dias antes do início dos treinos não promoveu uma diminuição na latência de escape. Observamos também que o transplante de CTM não influenciou significativamente o desempenho dos animais controles (salina+CTM, Figura 20).



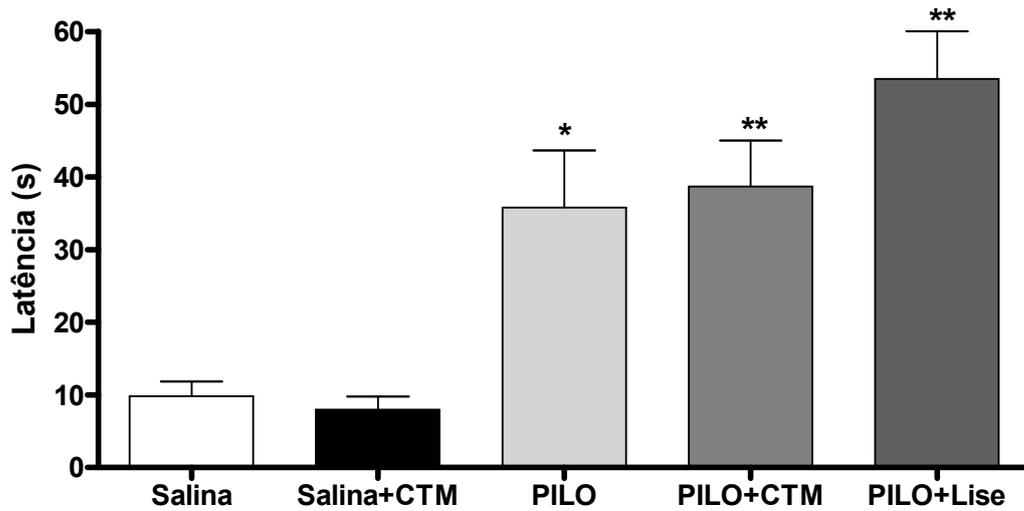
**Figura 20.** O tratamento com lítio-pilocarpina compromete a aquisição da memória do LAM e o tratamento com CTM e Lise Celular não interfere na aquisição de memória espacial em ratos epiléticos. O gráfico expressa as latências médias para encontrar a plataforma durante cinco dias de treino no LAM de ratos controle e com epilepsia que receberam transplante de CTM, Lise ou injeção de solução salina. Os dados estão expressos como a média  $\pm$  EP de cada sessão. Teste de Bonferroni após ANOVA de duas vias.

Quando realizamos um teste na ausência da plataforma de escape 24 horas após a última sessão de treino observamos que os animais controles (tanto grupo III quanto grupo IV) passaram mais tempo nadando no quadrante alvo (QA) do que aqueles que receberam PILO ( $p < 0,01$  vs PILO, PILO+CTM e PILO+Lise), os quais não mostraram preferência por nenhum quadrante (Figura 21). Conseqüentemente, o tratamento com PILO prejudica a consolidação da memória espacial associada à aprendizagem no LAM, e as CTM e Lise Celular não revertem esse quadro (Teste de Dunnet após ANOVA de uma via).



**Figura 21.** Animais epiléticos tratados com células lisadas e CTMs não têm preferência pelo quadrante alvo. Média do tempo gasto no QA durante um teste de 60s na ausência da plataforma de escape realizado 24 horas após o último dia de treino para ratos epiléticos e controles tratados com CTM, solução salina, ou células lisadas. Os dados estão representados como a média  $\pm$  EP; Dunnet após ANOVA de uma via; \*\*  $p < 0,01$  vs Salina.

No teste, ainda avaliamos a latência de escape. De maneira semelhante ao observado para os parâmetros anteriores, os animais dos grupos III e IV alcançaram a posição da plataforma mais rapidamente do que os animais epiléticos do grupo I (Figura 22). Os animais epiléticos tratados com CTM ou lisado celular tiveram desempenho comparável ao grupo I (PILO).

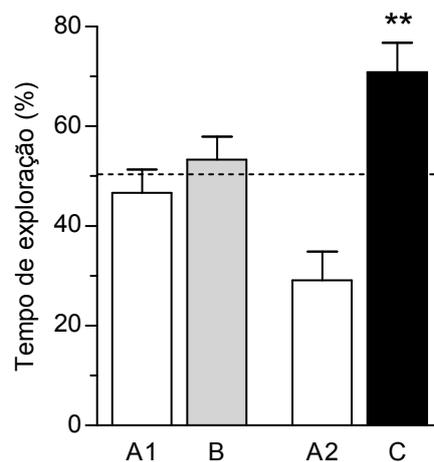


**Figura 22.** Animais epilépticos tratados com CTM ou Lise não alcançam a plataforma virtual mais rapidamente do que não-tratados. O gráfico expressa as latências médias de ratos controle e com epilepsia que receberam transplante de CTM, injeção de solução salina ou células lisadas, para encontrar a plataforma durante teste 24h após a última sessão de treino no LAM. Os dados estão representados como a média  $\pm$  EP. Dunnet após ANOVA de uma via \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$  vs Salina.

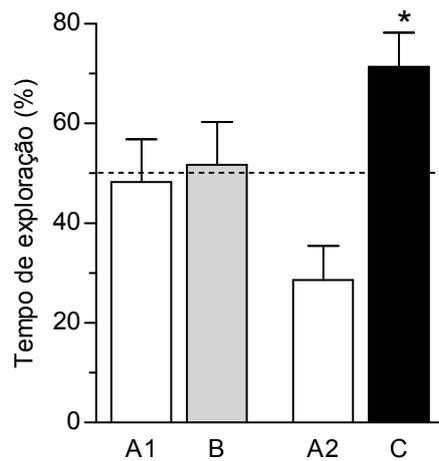
#### ***4.3 O tratamento com lítio-pilocarpina bloqueia a memória de longa duração no paradigma de reconhecimento de objetos e CTM revertem o déficit cognitivo associado a esta tarefa.***

Com o intuito de analisar se o tratamento com PILO impede a formação da memória de reconhecimento e se as CTM ou células lisadas administradas a ratos epilépticos interferem positivamente nesse quadro, 60 dias após a injeção de CTM ou células lisadas os animais foram treinados na tarefa de reconhecimento de objetos. Passadas 24 horas do treino, a retenção da memória foi avaliada durante uma sessão de teste, em que um dos objetos familiares foi substituído por um novíssimo.

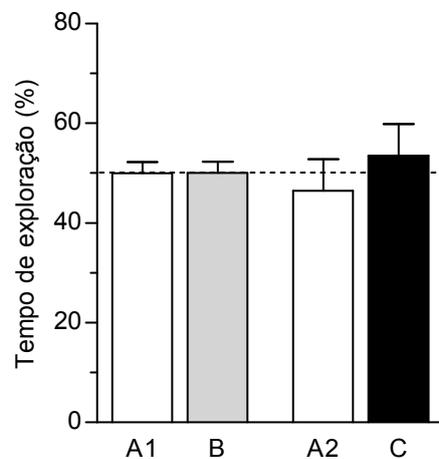
Observamos que tanto os animais do grupo Salina e Salina+CTM quanto os do grupo PILO+CTM, conseguiram identificar o novo objeto (teste *t* de Student para amostra única, valor de referência=50,  $**p<0,01$  e  $*p<0,05$ ; respectivamente) como observado nas figuras 23, 24 e 26. Enquanto que os animais submetidos ao modelo de epilepsia induzida por lítio-pilocarpina e tratados com salina e lise celular não conseguiram identificar o objeto novidoso, explorando ambos com a mesma magnitude ( $p=0,59$  e  $p=0,71$ ; respectivamente) figuras 25 e 27.



**Figura 23.** Animais do grupo Salina apresentam memória de reconhecimento de longa duração. Desempenho do grupo Salina na tarefa de reconhecimento de objetos, mostrando que estes animais exploram igualmente os objetos A e B no treino (A1 *versus* B;  $p=0,50$ ), e que conseguem identificar o novo objeto (C) no teste (A2 *versus* C;  $**p < 0,01$ ).



**Figura 24.** Animais do grupo Salina+CTM apresentam memória de reconhecimento de longa duração. Desempenho do grupo Salina+CTM na tarefa de reconhecimento de objetos, mostrando que estes animais exploram igualmente os objetos A e B no treino (A1 versus B;  $p=0,85$ ), e que conseguem identificar o novo objeto (C) no teste (A2 versus C;  $*p < 0,05$ ).

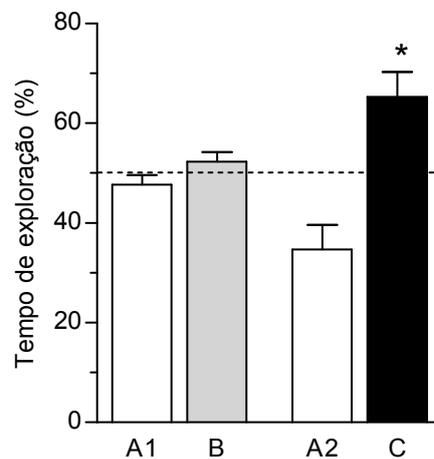


**Figura 25.** O tratamento com lítio-pilocarpina impede a consolidação de memória de reconhecimento de longa duração. Desempenho do grupo PILO na tarefa de reconhecimento de objetos, mostrando que estes animais exploram igualmente os objetos A e B no treino (A1 versus B;  $p=0,99$ ), e que não conseguem identificar o novo objeto (C) no teste (A2 versus C;  $p = 0,59$ ).

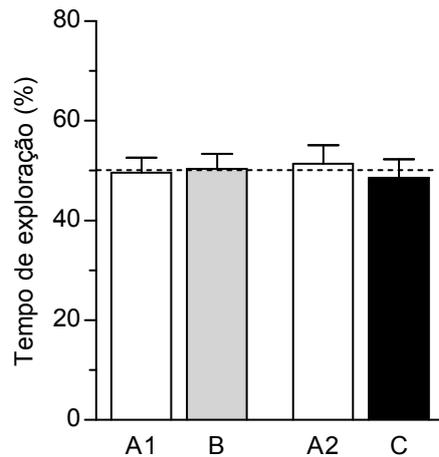
Já os animais submetidos ao modelo de epilepsia crônica e que receberam o transplante de CTM, obtiveram um bom desempenho no teste de reconhecimento de

objetos, ou seja, identificaram que estavam diante de um objeto novidoso no dia do teste ( $p=0,01$ ; Figura 26).

Embora os ratos epilépticos tratados com CTM demonstraram poder identificar o objeto novidoso, animais tratados com lítio-pilocarpina e administrados com células que passaram por um processo de lise não apresentaram reversão do déficit promovido pelo modelo de lítio-pilocarpina ( $p=0,71$ ; Figura 27).



**Figura 26.** CTM revertem o déficit de memória de reconhecimento de longa duração associado ao lítio-pilocarpina. Desempenho do grupo Pilo+CTM na tarefa de reconhecimento de objetos, mostrando que estes animais exploram igualmente os objetos A e B no treino (A1 *versus* B;  $p=0,27$ ), e que conseguem identificar o novo objeto (C) no teste (A2 *versus* C;  $*p < 0,05$ ).



**Figura 27.** Animais tratados com preparo de lisado celular não apresentam memória de reconhecimento de longa duração. Desempenho do grupo Pilo+Lise na tarefa de reconhecimento de objetos, mostrando que estes animais exploram igualmente os objetos A e B no treino (A1 versus B;  $p=0,90$ ), e que não conseguem identificar o novo objeto (C) no teste (A2 versus C;  $p=0,71$ ).

#### **4.4 O tratamento com lítio-pilocarpina, CTM ou células lisadas não influencia o desempenho dos animais no campo aberto ou labirinto em cruz elevado**

Para avaliar se a amnésia era causada pelo tratamento com lítio-pilocarpina e eliminar a possibilidade de que os resultados obtidos estivessem relacionados com efeitos sobre a ansiedade e a atividade exploratória, capazes de interferir na memória dos animais, os mesmos foram treinados nas tarefas do labirinto em cruz elevado e campo aberto. Estes mesmos testes foram conduzidos com o intuito de verificarmos se o tratamento com CTM ou lisado celular tem algum efeito sobre esses comportamentos nos animais tratados com lítio-pilocarpina.

Durante uma sessão de exploração livre com duração de 5 min no campo aberto, foram computados o total de cruzamentos e de elevações. Os dados apresentados na tabela 3 demonstram que não há diferenças significativas entre os grupos salina e tratados com lítio-pilocarpina, nem entre os grupos PILO e PILO tratado com CTM ou Lise (ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey).

Os animais também foram avaliados no paradigma do labirinto em cruz elevado. Durante esta sessão, observamos que os animais dos grupos tratados com lítio-pilocarpina (tanto grupo I, quanto grupos II e V) entravam mais vezes nos braços abertos do que os animais do grupo Salina ( $p < 0,01$  vs PILO, PILO+CTM e PILO+Lise). Da mesma forma, a tabela 3 mostra que quando avaliamos o tempo percentual gasto pelos animais nos braços abertos, verificamos que aqueles dos grupos PILO, PILO+CTM e PILO+Lise passam um tempo percentual significativamente maior nestas regiões do labirinto em cruz elevado do que os grupos controle (tanto Salina quanto Salina+CTM;  $p < 0,001$  vs PILO, PILO+CTM e PILO+Lise).

**Tabela 3.** Comportamento de ratos controle e tratados com lítio-pilocarpina, CTM ou Lise no labirinto em cruz elevado e no campo aberto.

	Salina	Salina+CTM	PILO	PILO+CTM	PILO+Lise
<b>Número Total de Entradas</b>	0,625±0,12	1,5±0,34	5,438±1,2	3,938±0,54	3,938±0,54
<b>Entradas Braços Abertos</b>	0,5±0,19	1,375±0,56	6,625±2,02*	3,75±0,72*	4,5±0,71*
<b>% Tempo Braços Abertos</b>	2,245±1,09	7,448±3,32	77,14±10,76***	74,73±5,08***	74,73±5,08***
<b>Cruzamentos</b>	65.00±6.12	61.86±8.22	87.78±13.78	87.63±13.30	73.67±11.43
<b>Elevações</b>	25.44±2.68	22.00±2.56	22.67±2.68	22.67±2.68	24.33±4.29

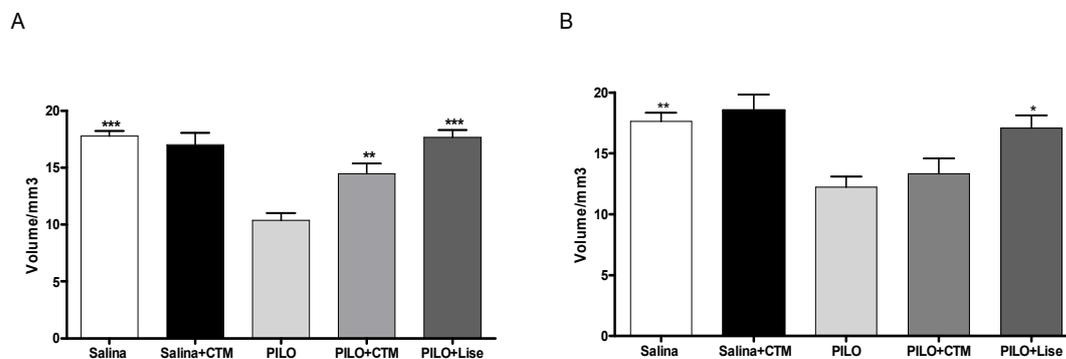
Os dados estão expressos como média ± EP. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. \* $p < 0,05$  vs Salina e \*\*\* $p < 0,001$  vs Salina e Salina+CTM.

#### **4.5 Resultados obtidos nos estudos histológicos**

Para avaliar o impacto do tratamento com lítio-pilocarpina na estrutura hipocampal nós avaliamos em ambos hemisférios: o volume dos núcleos hipocampo, CA1, CA2, CA3 e CA4; densidade neuronal o número total de células em CA1, CA2, CA3 e CA4. Da mesma forma, utilizamos as mesmas medidas para analisar se o tratamento com CTM ou Lise é capaz de reverter os danos estruturais decorrentes da injeção de PILO.

#### 4.5.1 O tratamento com lítio-pilocarpina reduz o volume hipocampal direito e esquerdo e a administração de CTM reverte esse processo.

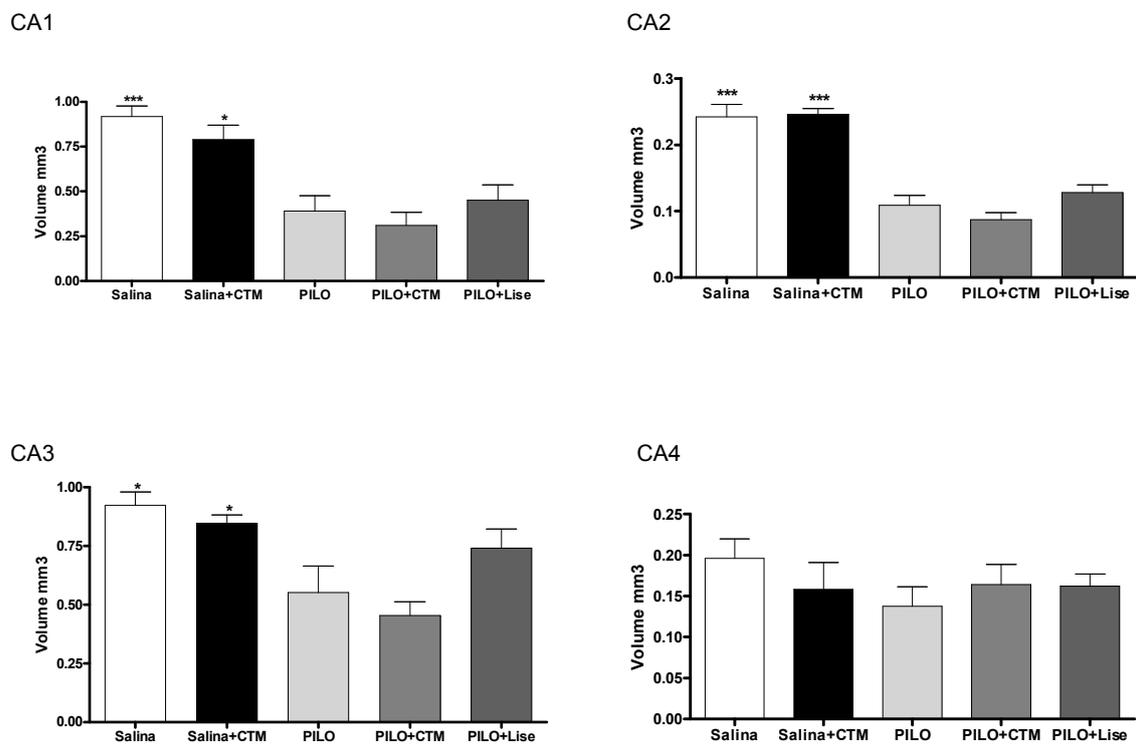
A figura 28 mostra que o volume hipocampal, seja direito ou esquerdo é reduzido nos animais do grupo PILO. Entretanto, observamos que o volume hipocampal direito médio de animais que foram tratados com lítio-pilocarpina, mas transplantados de CTM ou lisado celular, era maior (\*\* $p < 0,01$  PILO vs PILO+CTM; \*\*\* $p < 0,001$  PILO vs PILO+Lise). Quando a variável é a administração de CTM, não observamos o mesmo efeito no hipocampo esquerdo, onde não houve diferença de volume entre os animais dos grupos que receberam lítio-pilocarpina, independentemente do transplante. Porém, para o tratamento com lisado celular, há diferença significativa também neste hemisfério (\* $p < 0,05$  vs PILO).



**Figura 28.** O tratamento com lisado celular promove o aumento dos volumes hipocampais direito e esquerdo e o tratamento com CTM aumenta o volume hipocampal direito médio de ratos submetidos ao modelo lítio-pilocarpina. Em A: hipocampo direito e, em B: hipocampo esquerdo. Os valores estão apresentados como média  $\pm$  DP. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs PILO. ANOVA de uma via seguido de teste de Tukey.

Quando avaliamos os núcleos CA1, CA2, CA3 e CA4 individualmente e por hemisfério observamos que:

No hemisfério direito, o volume de CA1, CA2 e CA3 é significativamente menor nos animais tratados com PILO quando comparados com os animais dos grupos Salina e Salina+CTM ( $p < 0,001$  vs Salina para CA1 e CA2; e  $p < 0,05$  para CA3). Entretanto, não diferença significativa entre os animais do grupo PILO e aqueles tratados com lítio-pilocarpina que receberam transplante de CTM ou lisado celular (Figura 29). No núcleo CA4, não foram observadas diferenças significativas entre quaisquer grupos.

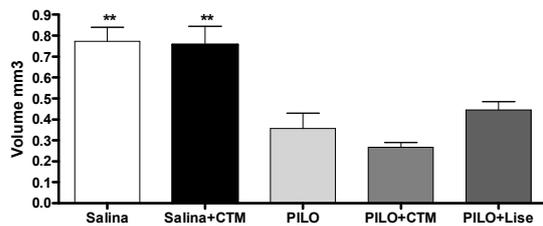


**Figura 29.** O tratamento com lítio-pilocarpina diminui o volume de CA1, CA2 e CA3, mas não CA4 no hemisfério direito. Os valores estão apresentados como média  $\pm$  DP. \* $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  vs PILO. ANOVA de uma via seguido de teste de Tukey.

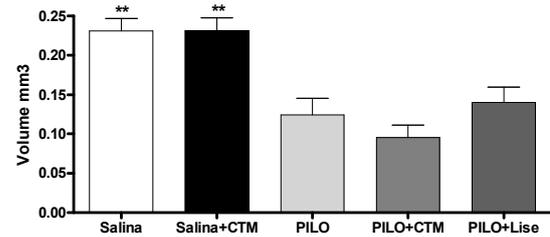
No hemisfério esquerdo, o volume de CA1 e CA2 é significativamente menor nos animais tratados com PILO quando comparados com os animais dos grupos Salina e Salina+CTM ( $p < 0,01$  vs Salina). Em CA3, essa diferença só é observada entre os grupos PILO e Salina ( $p < 0,05$  vs Salina), mas não entre PILO e Salina+CTM. À exemplo do que observamos no hemisfério direito, não diferença

significativa entre os animais do grupo PILO e aqueles tratados com lítio-pilocarpina que receberam transplante de CTM ou lisado celular (Figura 30). No núcleo CA4, não foram observadas diferenças significativas entre quaisquer grupos.

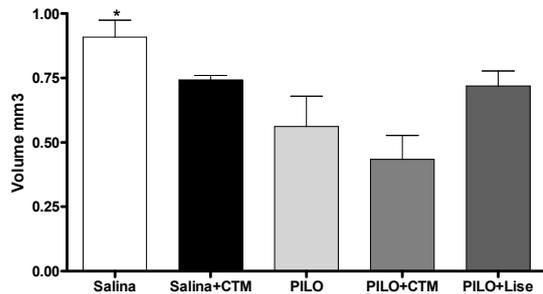
CA1



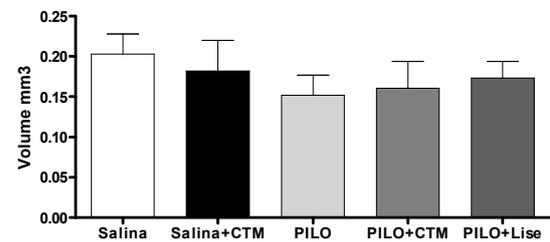
CA2



CA3



CA4

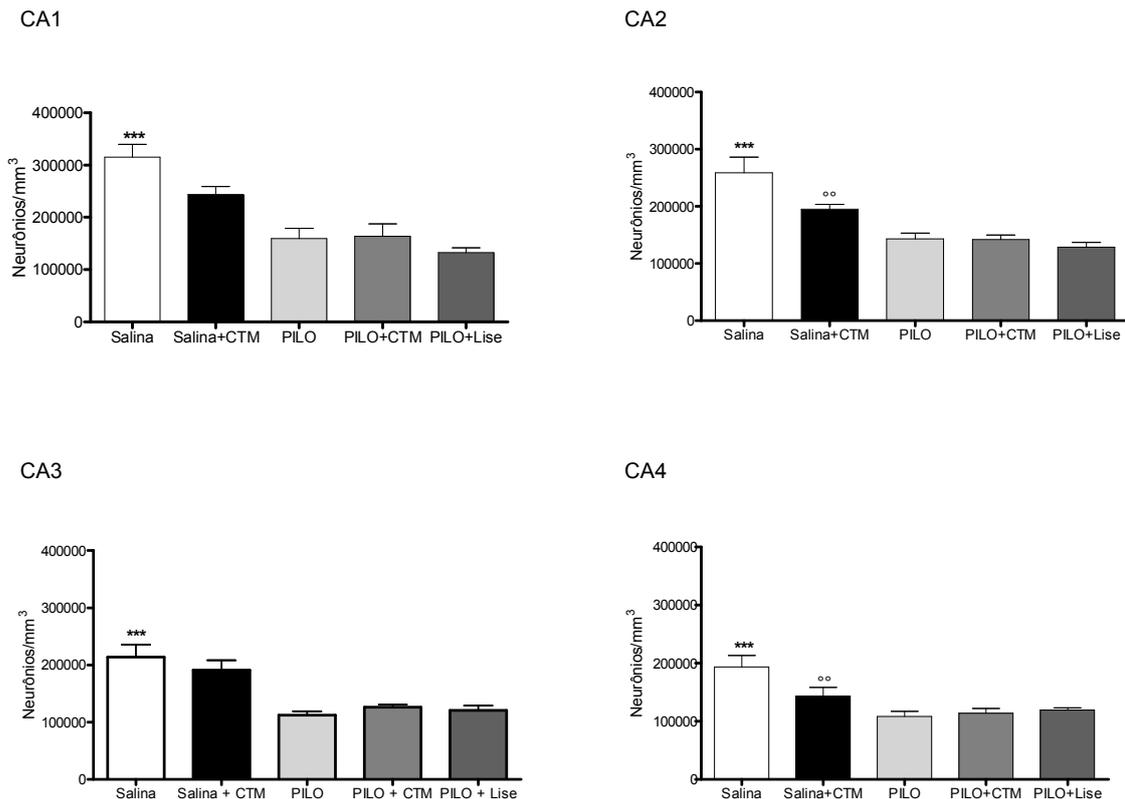


**Figura 30.** O tratamento com lítio-pilocarpina diminui o volume de CA1, CA2 e CA3, mas não CA4 no hemisfério esquerdo. Os valores estão apresentados como média  $\pm$  DP. \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  vs PILO. ANOVA de uma via seguido de teste de Tukey.

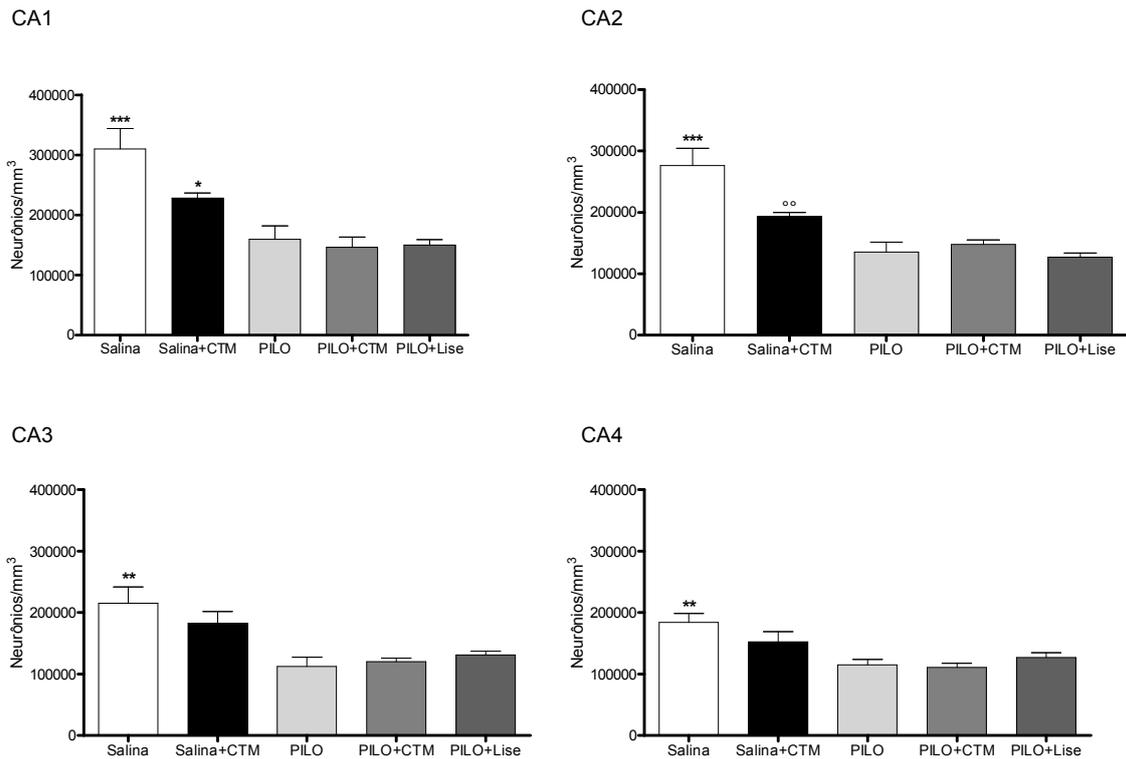
#### 4.5.2 O tratamento com lítio-pilocarpina reduz a densidade numérica em CA1, CA2, CA3 e CA4 e a administração de CTM não reverte esse processo.

As figuras 31 e 32 mostram que a densidade numérica em CA1, CA2, CA3 e CA4 seja no hemisfério direito ou esquerdo é reduzida nos animais do grupo PILO

( $p < 0,001$  ou  $p < 0,01$ ). Observamos também que a densidade numérica nestes núcleos hipocâmpais nos animais que foram tratados com lítio-pilocarpina, mas transplantados de CTM ou lisado celular, era estatisticamente igual à do grupo PILO não tratado. Quando avaliamos o efeito da administração de CTM em animais controles, verificamos que nestes grupos houve diminuição da densidade numérica quando considerados CA2 direito e esquerdo ( $p < 0,01$ ) e CA4 direito ( $p < 0,01$ ) em relação ao grupo controle tratado com salina. Ainda, observamos que na região de CA1 do hemisfério esquerdo, há diferença estatística tanto entre os grupos PILO e Salina, quanto aos grupos PILO e Salina+CTM ( $p < 0,05$ ).



**Figura 31.** O tratamento com lítio-pilocarpina reduz a densidade numérica em CA1, CA2, CA3 e CA4 no hemisfério direito. Os valores estão apresentados como média  $\pm$  DP. Salina \*\*\* $p < 0,001$  vs PILO; Salina+CTM °° $p < 0,01$  vs Salina. ANOVA de uma via seguido de teste de Newman-Keuls.

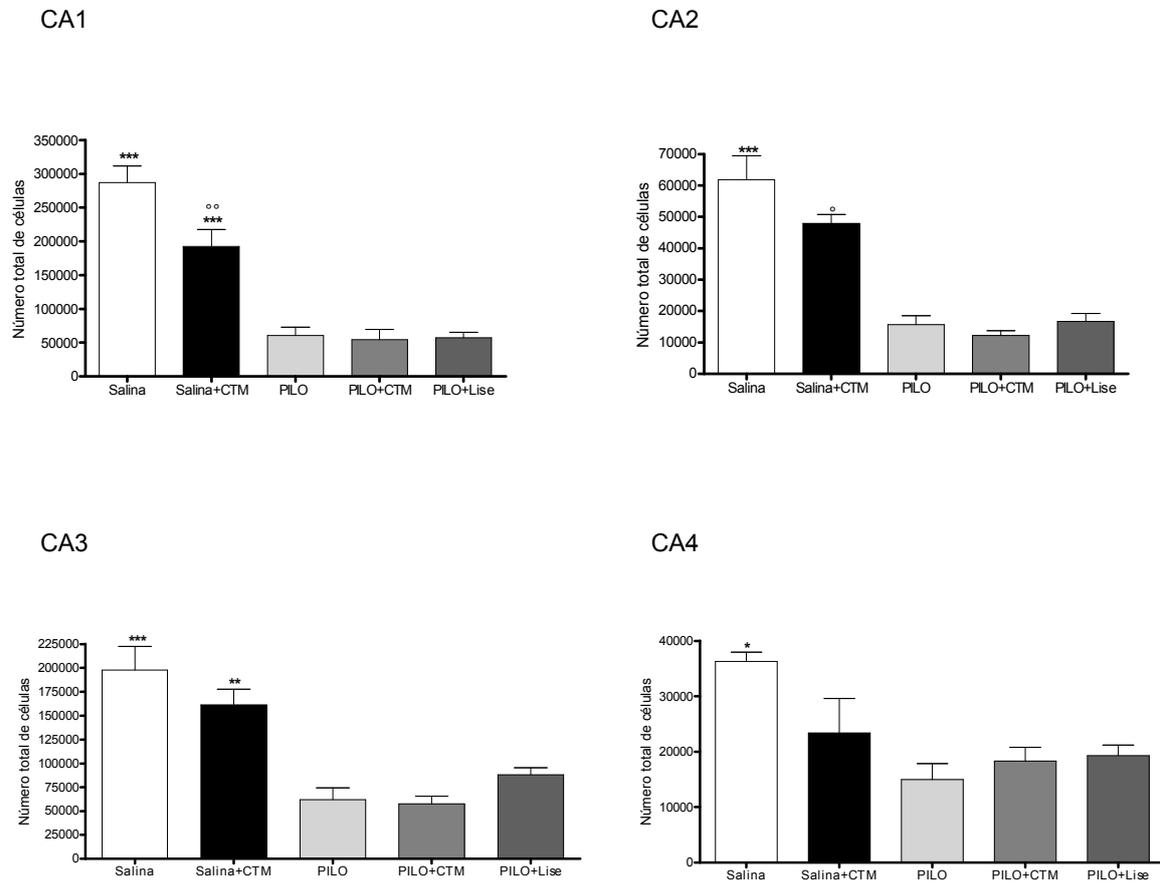


**Figura 32.** O tratamento com lítio-pilocarpina reduz a densidade numérica em CA1, CA2, CA3 e CA4 no hemisfério esquerdo. Os valores estão apresentados como média  $\pm$  DP. Salina \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  vs PILO; Salina+CTM °° $p < 0,01$  vs Salina. ANOVA de uma via seguido de teste de Newman-Keuls.

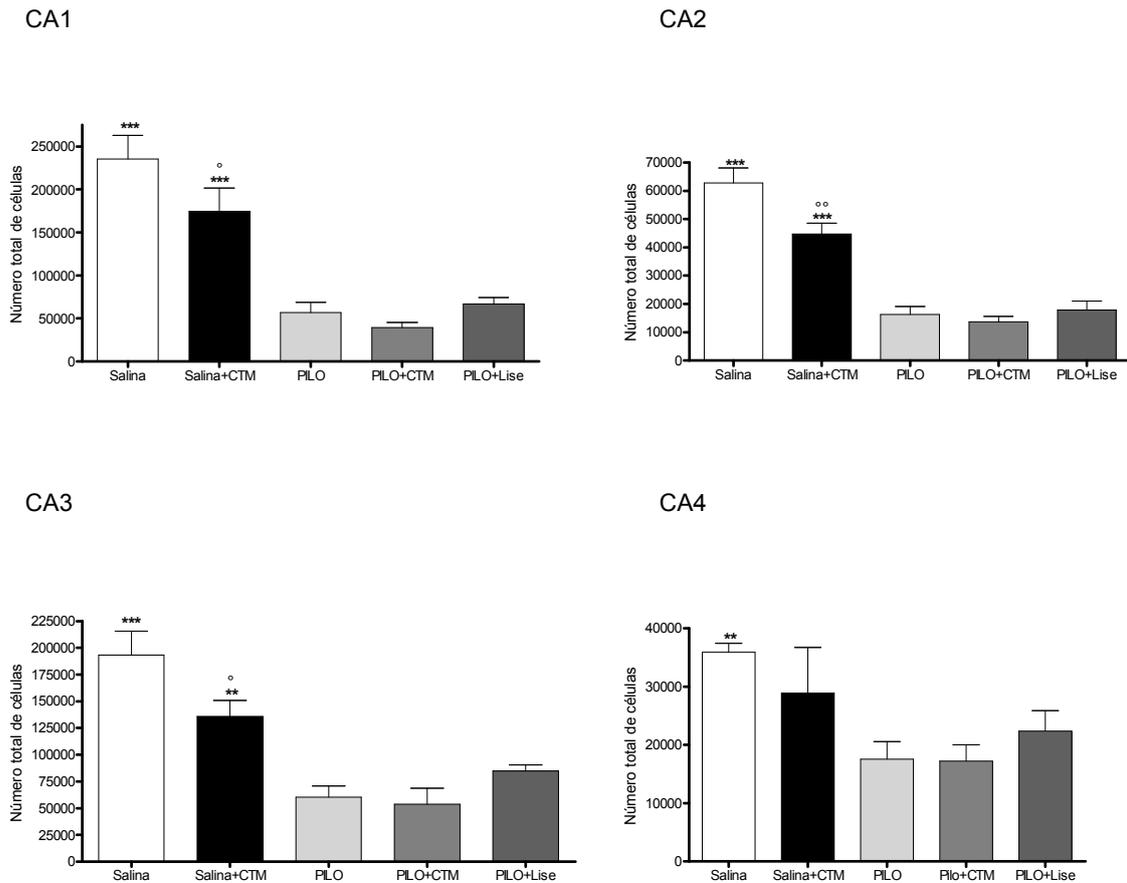
#### 4.5.3 O tratamento com lítio-pilocarpina reduz o número total de células em CA1, CA2, CA3 e CA4 e a administração de CTM ou lisado celular não reverte esse processo

As figuras 33 e 34 mostram que o total de células em CA1, CA2, CA3 e CA4 seja no hemisfério direito ou esquerdo é menor nos animais do grupo PILO ( $p < 0,001$  ou  $p < 0,01$ ) com relação ao grupo controle. Observamos também que a densidade numérica nestes núcleos hipocâmpais nos animais que foram tratados com lítio-pilocarpina, mas transplantados de CTM ou lisado celular, era estatisticamente igual à do grupo PILO não tratado. Por outro lado, as figuras

também mostram que em CA1 e CA2 de ambos hemisférios, há o número total de células é maior no grupo Salina do que no grupo Salina+CTM ( $p<0,01$  ou  $p<0,05$ ). O mesmo é observado em CA3 no hemisfério esquerdo ( $p<0,05$ ).



**Figura 33.** O tratamento com lítio-pilocarpina reduz o número total de células em CA1, CA2, CA3 e CA4 no hemisfério direito. Observar em CA1 e CA2 que o número total de células para o grupo Salina é maior do que para o grupo Salina+CTM. Os valores estão apresentados como média  $\pm$  DP. Salina \*\*\* $p<0,001$ ; \*\* $p<0,01$ ; \* $p<0,05$  vs PILO; °° $p<0,01$ ;  $p<^{\circ}0,05$  vs Salina. ANOVA de uma via seguido de teste de Newman-Keuls.

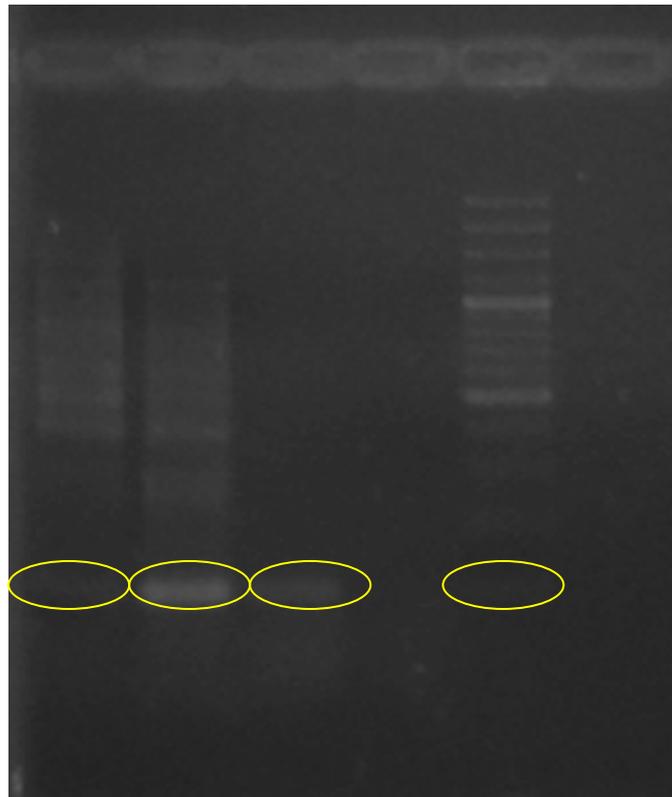


**Figura 34.** O tratamento com lítio-pilocarpina reduz o número total de células em CA1, CA2, CA3 e CA4 no hemisfério esquerdo. Observar em CA1, CA2 e CA3 que o número total de células para o grupo Salina é maior do que para o grupo Salina+CTM. Os valores estão apresentados como média  $\pm$  DP. Salina \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$  vs PILO; °° $p < 0,01$ ; ° $p < 0,05$  vs Salina. ANOVA de uma via seguido de teste de Newman-Keuls.

#### ***4.6 Detecção molecular positiva do gene EGFP em amostras do hipocampo obtidas de animais transplantados 24 horas e 14 dias após a administração das células.***

Com o objetivo de verificar a presença das CTM nas estruturas cerebrais nós avaliamos amostras dos hipocampus direito e esquerdo dos animais transplantados dos grupos II e IV.

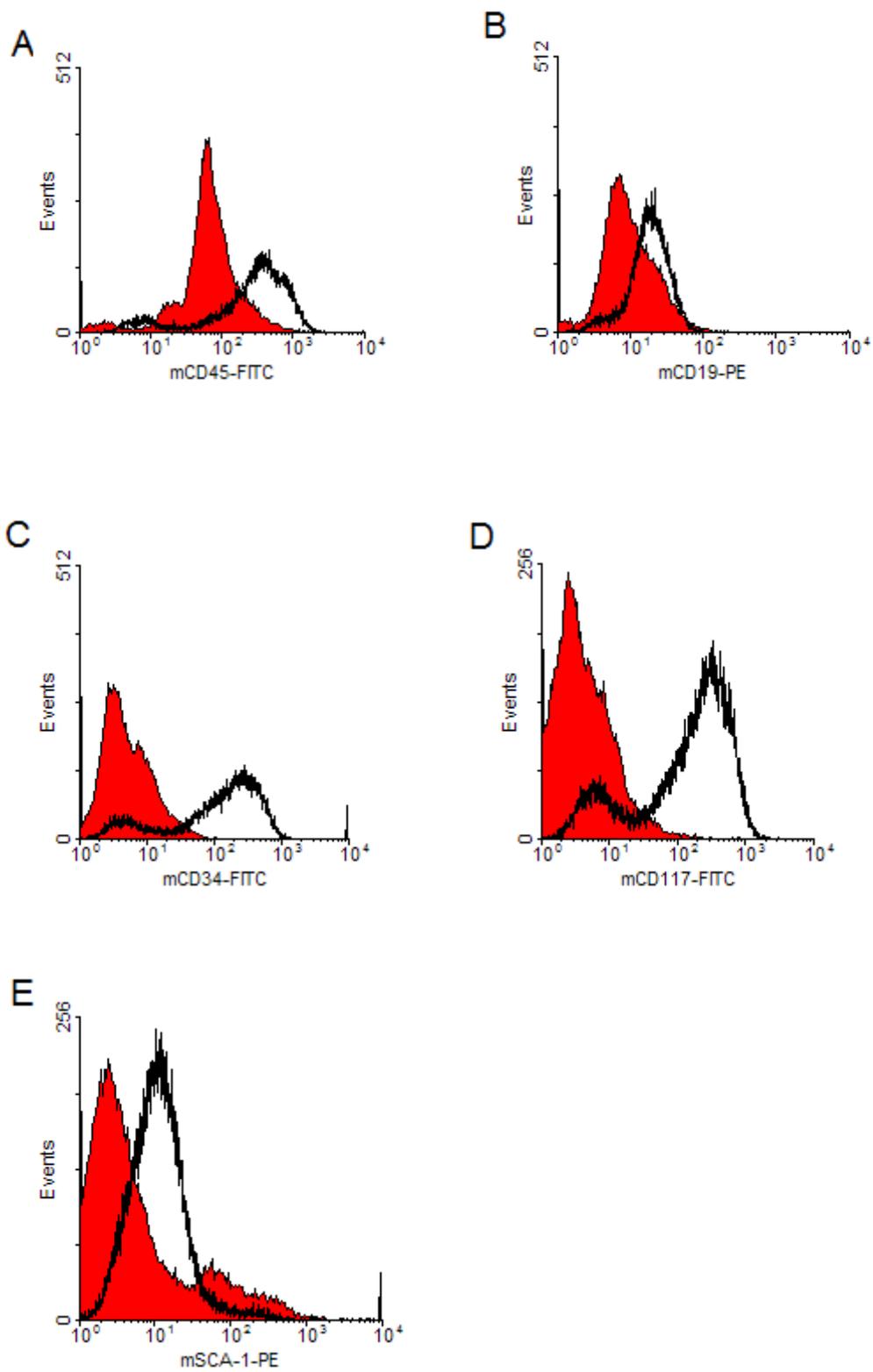
A figura 35 mostra corrida eletroforética em gel de agarose 2% corado com BrEt, na qual pode ser observado o amplicom de 100pb correspondente ao fragmento amplificado de EGFP. O fragmento foi observado para amostras coletadas do hipocampo esquerdo 24 horas e 14 dias após o transplante.



**Figura 35.** Gel de agarose 2%. Canaleta 01: hipocampo esquerdo 24 horas pós CT; canaleta 02: hipocampo esquerdo 14 dias após CT; canaleta 03: controle positivo EGFP+; canaleta 04: mix controle negativo; canaleta 5: marcador de peso molecular 100pb.

#### ***4.7 Caracterização celular por citometria de fluxo***

Adicionalmente, para caracterizar as populações celulares empregamos a técnica de citometria de fluxo utilizando os seguintes anticorpos: CD45, CD19, CD34, CD117 e Sca-1. Os resultados estão expressos na figura abaixo:



**Figura 36.** Expressão de marcadores de superfície para células da medula óssea de camundongos C57/BL6 antes e após a cultura (células mesenquimais). A= CD45, B= CD19, C= CD34, D= CD117, E=Sca-1

## DISCUSSÃO

O objetivo central desse estudo foi verificar se CTM ou células lisadas da medula óssea de camundongos, transplantadas sistemicamente, eram capazes de diminuir crises recorrentes em ratos. Também avaliamos a hipótese desses tratamentos produzirem modificações na citoarquitetura hipocampal, bem como promoverem melhora cognitiva. Paralelamente, investigamos algumas características moleculares das CTM e sua presença no tecido transplantado.

Nesse contexto, foi constatado que as células mesenquimais injetadas não reduziram as CERs. Já para os animais tratados com lisado celular, verificamos que há redução na frequência de crises. A administração de CTM aos animais tratados com PILO promoveu melhora cognitiva no paradigma do reconhecimento de objetos, sem, porém, melhorar a performance destes animais no LAM. O tratamento com lisado celular, por sua vez, não levou a melhor desempenho em quaisquer dos paradigmas cognitivos citados acima. Por meio da análise histológica podemos observar que os animais tratados com lítio-pilocarpina apresentavam contagem total de células, densidade e volume inferiores aos animais controle. Ainda, CTM ou Lise não produziram aumento significativo em nenhuma das variáveis analisadas, com exceção do volume hipocampal, que se apresentou maior nos grupos PILO+CTM no hemisfério direito e PILO+Lise em ambos os hemisférios. Por outro lado, a análise dos dados obtidos na citometria de fluxo revelou que as CTM são positivas para os

seguintes marcadores de superfície: CD45, CD19, CD34, CD117 e Sca-1. Finalmente, detectamos a presença de EGFP em amostras obtidas do hipocampo de animais transplantados com CTM, resultado que demonstra que as células administradas intravenosamente migram ao sistema nervoso central.

O mecanismo no qual as células tronco ou fatores tróficos com injeção sistêmica chegam às áreas lesadas no hipocampo ainda é desconhecido (Chu *et al* 2003; Chu *et al* 2004; Jeong *et al* 2003; Snyder *et al* 2004). Nós optamos por injeção sistêmica, tanto das CTMs quanto do lise celular porque as estruturas cerebrais envolvidas no SE não estão limitadas somente ao hipocampo, assim injeções intrahipocampais não permitiriam a migração das células ou lise para áreas distantes. E o segundo motivo é que o transplante intravenoso parece ser a maneira mais natural, já que dessa forma não estamos incluindo mais uma variável no estudo, que seriam as conseqüências de uma cirurgia estereotáxica. Como as CTMs provaram que são capazes de atravessar a barreira hemato-encefálica, uma vez que 24 h após o transplante já detectamos a presença dessas células no hipocampo, e que o grupo PILO+Lise mostrou uma melhora significativa das CERs, concluímos que ambos CTMs e Lise são atraídos para a área da lesão.

A principal característica da epilepsia é a presença de CERs. Para comprovar que os animais submetidos ao SE agudo desenvolveram as CERs, todos os grupos PILO foram vídeo-monitorados em um período prévio ao transplante com Salina, CTM ou Lise Celular. Os nossos resultados mostraram que os grupos PILO e PILO+CTM se comportaram do mesmo modo, apresentando uma média de quatro crises nesse período. Esses dados estão de acordo com Arida e colaboradores que mostraram que um grupo de ratos adultos submetidos ao modelo de epilepsia

experimental com pilocarpina apresentaram o dobro dessa média quando vídeo-monitorados por 24 horas.

Por outro lado, os animais do grupo PILO+Lise apresentaram uma média de cerca de oito crises nesse período, o que demonstra a grande variabilidade no número de crises desses animais no mesmo período de observação. Dados esses que também estão de acordo com Arida *et al.* 1999.

Ratos que apresentam um número maior de CERs do primeiro ao décimo quinto dia têm um aumento significativo nas crises quando avaliado um período posterior (quadragésimo sexto ao sexagésimo quinto, Arida *et al.* 1999). Por isso, poderíamos pensar que os animais do grupo lise teriam uma tendência natural de aumentar o número de crises ao longo do tempo. No entanto, o grupo PILO+Lise não seguiu essa tendência, mostrando um comportamento justamente contrário.

Quando avaliamos o período pós-transplante a média das CERs, nos grupo PILO, PILO+CTM e PILO+Lise, são muito similares, mostrando que as CTM não tiveram o resultado esperado inicialmente. Porém, num confronto entre o grupo PILO+Lise no período pré e pós-transplante verificamos uma redução no número médio de crises de 45%. Essa mesma redução não é vista nos demais grupos PILO. Portanto, o transplante com o lise celular foi capaz de reduzir as crises a valores similares entre os três grupos que foram submetidos ao tratamento com lítio-pilocarpina.

Evidências na literatura mostram que o SE induzido por lítio-pilocarpina leva à perda neuronal. Foi relatado que 24 horas após o SE, ocorre formação de edema na amígdala, córtices piriforme e entorrinal, juntamente com uma rápida e extensiva perda neuronal. Entretanto, nas regiões hipocampais a perda é mais lenta, porém progressiva (Roch *et al.* 2002), e as crises convulsivas recorrentes provavelmente

estejam vinculadas a grande morte de células hipocampais induzida pelo modelo de lítio-pilocarpina (Wu *et al.* 2001; Hort *et al.* 1999).

Venturin (2008) mostrou que ratos epiléticos que receberam o transplante de células mononucleares da medula óssea de camundongos apresentam uma redução no número de CERs, mesmo sem demonstrar a presença das células EGFP<sup>+</sup> no hipocampo. O grupo PILO+Lise teve as células mononucleares da medula óssea obtidas dos camundongos e suas membranas foram rompidas, assim o efeito esperado está baseado no seu conteúdo citoplasmático. Por esses fatos acreditamos que o lise celular esteja atuando de algum modo que não por de diferenciação em células nervosas provavelmente como um fator trófico. Atualmente, são propostos seis mecanismos pelos quais células tronco adultas poderiam contribuir para o reparo tecidual: transdiferenciação, de-diferenciação, transdeterminação, fusão celular, comportamento de células-tronco pluripotentes verdadeiras e produção de fatores tróficos (Rice e Scolding 2004).

Outros pesquisadores já demonstraram que células tronco neurais humanas têm a capacidade de controlar as CERs, bem como expressar marcadores de interneurônios. Entretanto, esses mesmos pesquisadores não encontraram qualquer melhora no paradigma histológico, especificamente no que tange ao número de neurônios nas subregiões hipocampais. Por isso, eles atrelaram a melhora nas CERs à detecção das células tronco humanas e sua diferenciação em interneurônios GABAérgicos na amígdala e córtex piriforme. Sugerindo assim, que as descargas epileptiformes estendem-se pelo sistema límbico, e que a consolidação do circuito epilético ocorra no hipocampo (Chu *et al* 2004).

Assim, avaliamos as características histológicas do hipocampo em termos de volume hipocampal: mostramos que o grupo PILO+Lise tem o mesmo volume

hipocampal que os ratos do grupo Salina e Salina+CTM, tanto do lado direito quanto do lado esquerdo. Já o grupo PILO+CTM diferiu do grupo PILO somente do lado direito. Inferimos que essa diferença ocorreu porque o grupo PILO mostrou uma redução do volume hipocampal maior no hemisfério direito do que no lado oposto, uma vez que ao compararmos o grupo PILO+CTM dos lados direito e esquerdo não observamos nenhuma alteração. A PILO tem uma ação que depende da ativação dos receptores colinérgicos muscarínicos, que secundariamente ativa o sistema glutamatérgico e esses receptores, quando ativados, permitem influxo de cálcio que, em altas concentrações, pode levar à morte neuronal. Parece que a PILO teve uma ação diferenciada em ambos os hemisférios, causando uma lesão maior do lado direito na amostra analisada. A atrofia unilateral é comum em 60% dos pacientes com epilepsia do lobo temporal (Blümcke *et al.*, 1999). Em ratos o dano hipocampal também é muitas vezes unilateral (Araki *et al.* 2002; Murphy *et al.* 2007; Shinoda *et al.* 2004).

No entanto, quando avaliamos as sub-regiões de CA1, CA2, CA3 e CA4 que possuem maior número de receptores glutamatérgicos parece que a pilocarpina teve uma ação parecida em todas as regiões, já que todas as vezes que comparamos os grupos PILO com o Salina houve uma clara redução na densidade numérica de células e também no número total de neurônios do primeiro grupo.

Nosso estudo mostrou ainda que as perdas celulares relacionadas ao número total de neurônios observadas nas camadas piramidais do grupo PILO comparados ao Salina são da ordem de: CA1 79% e 75% nos hemisférios direito e esquerdo respectivamente; para CA2 esses valores são de 74% em ambos os hemisférios; para CA3 esses valores são de 68% em ambos os hemisférios; já para CA4 são de 51% e 41% nos hemisférios direito e esquerdo respectivamente. Esses valores estão

de acordo com a literatura (Babb *et al*, 1984; Babb, 1991) que confirma a perda de aproximadamente 80% das células de CA1, e que falam de perdas que variam de 50% a 65% nas demais camadas, em humanos com EMT. Achados similares são comuns em animais submetidos à epilepsia experimental (Franke e Kittner 2001; Tamagami *et al*, 2004). Entretanto, na avaliação do volume de CA4 não aconteceu modificação em todos os grupos experimentais. Isso pode ser explicado devido à gliose reativa que ocorre como resultado do insulto da pilocarpina que deve ter sido mais intensa nessa região.

No entanto, observamos que ocorre uma redução na densidade numérica do grupo Salina versus o Salina+CTMs, na região de CA2 em ambos os hemisférios, sendo que em CA4 somente no hemisfério direito. Em relação, ao número total de neurônios essa redução está presente em CA1 e CA2 no hemisfério direito e em CA1, CA2 e CA3 no hemisfério esquerdo. Esses dados nos levam a supor que o efeito das CTMs não foram positivos para a neurogênese nessas regiões.

Evidências recentes indicam que as CTMs possuem propriedades imunossupressoras, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Zhou *et al*. 2008). A função imunossupressora das CTMs é induzida pela ação das citocinas pró-inflamatórias, e essa ação é mediada pela ação da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e do óxido nítrico (NO) (Ren *et a.*/ 2008). Assim, podemos inferir que as CTMs desempenhando essa imunossupressão causam o aumento da iNOS e NO e complementarmente aumentam a liberação de glutamato. As camadas piramidais do hipocampo são ricas em receptores glutamatérgicos. Este fato somado à liberação de glutamato, pode determinar essa perda celular no grupo Salina+CTM.

Além disso, durante a epilepsia experimental também há aumento de citocinas pró-inflamatórias e algumas dessas como a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) têm

efeito neurotóxico (Panegyres e Hughes 1998) e também efeitos pró-convulsivante em modelos experimentais de SE (Vezzani *et al.* 1999; Vezzani *et al.* 2000). Esse mecanismo pode estar contribuindo com um aumento do glutamato ainda maior do que o inerente à pilocarpina nos grupos PILO, resultando em maior neurodegeneração.

Associado com a grande morte de células hipocampais induzida pelo modelo experimental, os animais sabidamente apresentam déficit de memória espacial no LAM (Wu *et al.* 2001; Hort *et al.* 1999). É comum também entre pacientes com epilepsia do lobo temporal a presença de algum tipo de déficit cognitivo similar (Holmes 1997; Liu *et al.* 1994).

Para avaliarmos a memória espacial, treinamos os animais na tarefa do LAM e investigamos se as CMT e Lise celular poderiam reverter o déficit associado à pilocarpina. Durante cinco dias os animais foram treinados, e 24h após o último treino foram testados, na ausência da plataforma, e eles apresentaram a latência de escape no mesmo nível que os animais tratados com CTM ou Lise.

No mesmo contexto, a LTP que é apontada com um processo chave necessário para a formação de memórias (Bliss e Colingridge 1993), tem a sua indução impedida pelo aumento da citocina pró-inflamatória interleucina 6 (IL-6-Jankowsky, 2000). A administração nasal da IL-6 aumenta a gravidade das crises induzidas por pentilenotetrazol em ratos (Kalueff *et al.* 2004). Já o tratamento crônico com ácido valpróico reduz a concentração da citocina pró-inflamatória (IL-6) em pacientes jovens com epilepsia parcial e generalizada. (Zibell *et al.* 2008). Além disso, a redução das citocinas pró-inflamatórias melhoram a função neurológica nos casos de trauma craniano experimental (Lloyd *et al.* 2008). Assim, um possível

aumento das citocinas pró-inflamatórias poderia determinar o baixo desempenho no LAM.

Também avaliamos a memória de reconhecimento de objetos e o resultado obtido não foi o mesmo. Os animais tratados com lítio-pilocarpina e transplantados com CTM demonstraram memória do objeto familiar, diferindo dos animais epiléticos e dos tratados com lise celular. Em primeira análise, nossos dados parecem contraditórios, porque se por um lado apontam que as CTM injetadas em ratos tratados com PILO levam à melhora da memória de reconhecimento de objetos, por outro lado as mesmas células aparentemente não têm efeito sobre a memória espacial associada à aprendizagem do LAM. Porém, se levarmos em consideração as estruturas encefálicas envolvidas com o aprendizado de cada uma destas tarefas é possível explicar essa discrepância. A memória espacial associada à aprendizagem do LAM parece ser dependente de uma ação coordenada de diferentes regiões do encéfalo e de diferentes sistemas de neurotransmissores que constituem uma rede funcional integrada. Lesões em regiões como estriado, prosencéfalo basal, cerebelo e córtex também comprometem a performance nessa tarefa. Além disso, o LAM é particularmente sensível a lesões hipocâmpais (revisado por D'Hooge e Deyn, 2001). Já no paradigma de reconhecimento de objetos, as estruturas chave que modulam esse tipo de memória são o córtex perirrinal, córtex pré-frontal mesial, prosencéfalo basal e *nucleus accumbens*, além do hipocampo, cujo papel e participação ainda são amplamente discutidos (revisado por Dere *et al.* 2007).

Vale mencionar aqui, que outros pesquisadores não encontraram alterações na performance desta tarefa em ratos submetidos ao tratamento com lítio-pilocarpina (Detour *et al.* 2005). Entretanto, nesse estudo, Detour e colegas utilizaram protocolo

de treino e teste diferente do nosso, e empregaram uma dose de pilocarpina equivalente à metade da que utilizamos, o que talvez explique as discrepâncias encontradas. Além disso, o papel do hipocampo na memória de reconhecimento ainda é controverso; enquanto há estudos, a exemplo do de Detour *et al.*, onde lesões hipocampais supostamente não alteram esse tipo de memória (Mumby *et al.* 2002), outros mostram que o hipocampo tem sim papel importante no reconhecimento de objetos (Clark *et al.* 2000; Rossato *et al.* 2007).

Outros experimentos comportamentais foram realizados para complementar os dados comportamentais. Para verificar se os animais têm algum dano locomotor utilizamos a tarefa de campo aberto, na qual não houve modificação no número de cruzamentos, nem de elevações (rearings) em todos os grupos. Já no paradigma de labirinto em cruz elevado, que está relacionado à ansiedade e depende particularmente da amígdala, (Davis 1992), aconteceu uma alteração no número de entradas e no tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. A preferência por braços abertos pode representar um efeito ansiolítico associado à epilepsia induzida pela pilocarpina e as CTMs e lise não são capazes de reverter essa alteração comportamental (Graeff *et al.* 1998). Assim, os animais tornam-se menos apreensivos em relação ao ambiente novo e à altura do aparato. Dados similares já foram mostrados por Detour e colaboradores, 2004.

Segundo Hattiangady e colegas, um declínio na neurogênese é consideravelmente maior em ratos que apresentam um maior número de CERs, sugerindo que a maior frequência de CERs durante a epilepsia crônica é prejudicial à neurogênese no GD (Hattiangady *et al.* 2004). Soma-se a isso o fato de que durante a epilepsia crônica há queda na concentração de diversos fatores tróficos que atuam na proliferação de células tronco neurais (Shetty *et al.* 2003, Hattiangady

*et al.* 2004) e que a neurogênese diminuída pode contribuir para a persistência de crises e déficits de memória e aprendizagem que foram observadas no grupo PILO+Lise.

Em suma, uma vez que a epileptogênese é um processo dinâmico com várias conseqüências e deterioração cognitiva (Engel 2002) o presente estudo demonstra que o transplante de lise celular da medula óssea tem algum potencial terapêutico em relação às crises convulsivas. Estudos subseqüentes devem ser conduzidos para esclarecer seus mecanismos de ação, permitindo o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para esta patologia.

## CONCLUSÕES

Neste trabalho investigamos os efeitos das células mesenquimais e lise celular da medula óssea na frequência de crises, limiar convulsivo e desempenho cognitivo de animais tratados com lítio-pilocarpina. Também avaliamos volume, densidade numérica e número total de neurônios das camadas piramidais CA1, CA2, CA3 e CA4 e o volume do hipocampo. Nosso estudo possibilitou as seguintes conclusões:

1. O transplante de CTM não altera a frequência de crises espontâneas recorrentes, quando são avaliados os primeiros 14 dias subseqüentes à injeção de células. Já o Lise Celular proporcionou uma redução de aproximadamente 45% no número de CERs entre o período pré e pós-transplante, mas não foi diferente do grupo controle.

2. O tratamento com lítio-pilocarpina leva ao déficit cognitivo detectável no labirinto aquático de Morris, e esse déficit não é revertido pelo transplante de CMT ou Lise Celular.

3. O tratamento com lítio-pilocarpina compromete a memória de reconhecimento de objetos e o transplante de CTM reverte esse déficit, mas a administração do Lise Celular não reverte.

4. Decorridos 24h e 14 dias do transplante de CTM, a expressão molecular de EGFP foi detectável por PCR no hipocampo esquerdo.

5. O volume do hipocampo foi restaurado pela administração de Lise Celular.

6. O tratamento com lítio-pilocarpina compromete o volume, a densidade numérica e número total de neurônios das camadas piramidais CA1, CA2, CA3 e CA4, e o transplante de CTM e Lise Celular não reduz essa perda.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

Futuramente, mantendo esta mesma linha de pesquisa, pretendemos aprofundar nossos achados sobre o potencial terapêutico das CTMs e Lise Celular da medula óssea na epilepsia experimental. Para tanto, planejamos:

- 1) Buscar evidências da expressão de marcadores gliais e neuronais pós-transplante de CTMs.
- 2) Avaliar a possível interação das citocinas pró-inflamatórias no potencial terapêutico das CTMs.
- 3) Estudar o papel da iNOS no pós-transplante de CERs

## REFERÊNCIAS

- AFFIFI, A.K.; BERGMAN, R.A. **Functional Neuroanatomy: Text and Atlas**. New York: McGraw-Hill, 746p. 1998.
- AMARAL DG, WITTER MP. The hippocampal formation. In *The rat nervous system*. Paxinos G, editor. 2<sup>nd</sup> ed. São Diego: Academic Press; 1995.
- ARAKI, T., SIMON, R.P., TAKI, W., LAN AND D.C. HENSHALL, J.-Q. Characterization of neuronal death induced by focally evoked limbic seizures in the C57BL/6 mouse. **J. Neurosci. Res.** 69:614–621, 2002.
- ARIDA, R.M., SCORZA F.A. *et al.* The course of untreated seizures in the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy Res.** 34(2-3):99-107, 1999.
- AVOLI, M., LOUVEL J. *et al.* Cellular and molecular mechanisms of epilepsy in the human brain. **Prog Neurobiol**, 77(3):166-200, 2005.
- AZIZI A.S., STROKES, D., AUGELLI B.J., 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**, v. 95, n. 7, p. 3098-3913. 31 Mar. 1998.
- BABB, T. L., BROWN, W. J., PRETIUS, J., DAVENPORT., C., LIEB, J. P., CRANDALL, P.H. Temporal lobe volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, 25(6):729-740, 1984.
- BABB TL, BROWN WJ. Pathological findings in epilepsy (Engel JJr ed). **Surgical Treatment of the Epilepsies**: New York: Raven Press, 511-540, 1987.
- BABB, T. L., Research on the anatomy and pathology of epileptic tissue. In: Luders, H. (Ed.), **Neurosurgery of Epilepsy**, Raven Press, New York, pp.719-727, 1991.
- BEYER NARDI N, DA SILVA MEIRELLES L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. **Handb Exp Pharmacol**;(174):249-82, 2006.
- BIANCO, P., GEHRON, R. P. Marrow stromal stem cells. **J Clin Invest**;105(12):1663-8, 2000.
- BJORNSON, C.R., RIETZE, R.L., REYNOLDS, B.A., MAGLI, M.C., AND VESCOVI, A.L. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. **Science** 283: 534–537, 1999.

BLISS, T.V.P.; COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, 361:31-39, 1993.

BLÜMCKE, I., BECK H., SCHEFFLER, B., HOF, P.R. *et al.* Altered distribution of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptor subunit GluR2(4) and the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NMDAR1 in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. **Acta Neuropathologica** 92(6): 576-87, 1996.

BLÜMCKE, I., BECK, H., LIE, A.A., WIESTLER, O.D. Molecular neuropathology of human mesial temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Research** 36(2-3): 205-23, 1999.

BLÜMCKE I., THOM M., WIESTLER, O.D. Ammon's horn sclerosis: a maldevelopmental disorder associated with temporal lobe epilepsy. **Brain Pathology** 12:199-211, 2002.

BONTHIUS, D.J., MCKIM, R., KOELE, L., HARB, H., KARACAY, B., MAHONEY, J., PANTAZIS, N.J. Use of frozen sections to determine neuronal number in the murine hippocampus and neocortex using the optical disector and optical fractionator. **Brain Res Brain Res Protoc**;14(1):45-57, 2004.

BONINI, LS., BEVILAQUA, L.R., ZINN, C.G. *et al.* Angiotensin II disrupts inhibitory avoidance memory retrieval. **Hormones and Behavior** 50:308-13, 2006.

BRAZELTON T. R., ROSSI F. M., KESHET G. I., *et al.* From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. **Science** 290: 1775-1779, 2000.

CAVALHEIRO, E. A., LEITE, J. P. *et al.* Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. **Epilepsia** 32(6): 778-82, 1991.

CHANG, B. S. E D. H. LOWENSTEIN. Epilepsy. **N Engl J Med**, 349:1257-66, 2003.

CHAUDHARY, G., MALHOTRA, J., CHAUDHARY, J.D., GOPINATH, G., GUPTA, Y.K. Effect of different lithium priming schedule on pilocarpine-induced status epilepticus in rats. **Methods Find Exp Clin Pharmacol** 21(1): 21-4, 1999.

CHU K, KIM M, JEONG SW, KIM SU, YOON BW. Human neural stem cells can migrate, differentiate, and integrate after intravenous transplantation in adult rats with transient forebrain ischemia. **Neurosci Lett**. 5;343(2):129-33, 2003.

CHU, K., KIM, M., JUNG, K-H. *et al.* Human neural stem cell transplantation reduces spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus in adult rats. **Brain Research** 1023:213-221, 2004.

CLARK, R.E., ZOLA, S.M., SQUIRE, L.R. Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. **Journal of Neuroscience** 20:8853–8860. 2000.

COGLE, C.R., YACHNIS A. T., LAYWELL, E. D. *et al.* Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: a retrospective study. **Lancet** 363: 1432-37, 2004.

COHEN, I., NAVARRO V., *et al.* Mesial temporal lobe epilepsy: a pathological replay of developmental mechanisms? **Biol Cell** 95:329-33, 2003.

COSTA-FERRO, Z.S. **Transplante de Células da Medula Óssea na Epilepsia Experimental Induzida por Lítio e Pilocarpina em Ratos**. 2008. 156f. Tese (Doutorado em Fisiologia) Programa de Pós-Graduação, Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

COULTER, D. A., MCINTYRE, D. C., LÖSCHER, W. Animal models of limbic epilepsies: What can they tell us? **Brain Pathology** 12:204-256, 2002.

CRUZ-ORIVE, L.M. Particle number can be estimated using a disector of unknown thickness: the selector. **J. Microsc.** 125: 315-333, 1987.

DAVIS, M. The role of the amygdala in fear and anxiety. **Annu Rev Neurosci.** 15: 353-75, 1992.

DA SILVA, WC., BONINI, J.S., BEVILAQUA, LR. Histamine enhances inhibitory avoidance memory consolidation through a H-2 receptor dependent mechanism. **Neurobiology of Learning and Memory** 86:100-6, 2006.

DE BRUIN, V. M., MARINHO, M. M., DESOUSA F. C., *et al.* Behavioral and neurochemical alterations after lithium-pilocarpine administration in young and adult rats: a comparative study. **Pharmacol Biochem Behav** 65(3): 547-51, 2000.

DERE, E., HUSTON, J. P., SILVA, M. A. S. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. **Neuroscience and Behavioral Reviews** 31:673-704. 2007.

DETOUR, J., SCHROEDER, H., DESOR, D., NEHLIG, A. A 5-month period of epilepsy impairs spatial memory, decreases anxiety, but spares object recognition in the lithium-pilocarpine model in adult rats. **Epilepsia** 46(4):499-508. 2005.

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** 14(11):1771-6, 2001.

D'HOOGE, R. E DEYN, P. P. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. **Brain Research Reviews** 36:60-90. 2001.

DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F., KRAUSE, D., *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**; 8(4):315-7, 2006.

DU, F., WHETSELL, W.O.JR., ABOU KHALIL, B., BLUMENKOPF, B., LOTHMAN, E.W., SCHWARCZ, R. Preferential neuronal loss in layer III of the entorhinal cortex in patients with temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Research** 16: 223-233, 1993.

DUNNETT S.B., ROSSER A.E. Cell therapy in Huntington's disease. **NeuroRx** 1:394-405, 2004.

EGLITIS, M.A, E MEZEY, E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. **Proc Natl Acad Sci USA**. 94(8):4080-5, 1997.

EGLITIS, M.A., D. DAWSON, *et al.* Targeting of marrow-derived astrocytes to the ischemic brain. **Neuroreport** 10(6): 1289-92, 1999.

ENGEL JR., J. Introduction to temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Brain Research** 26:141-150, 1996.

ENGEL JR., J. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy. **Epilepsia** 42: 796-803, 2001.

ENGEL J., MESIAL J. Temporal lobe epilepsy: what have we learned? **Neuroscientist** 7 (2001b), pp. 340–352. **Epilepsy Curr**. Nov;2(6):194-195, 2002

ENGEL JR., J. ILAE classification of epilepsy syndromes. **Epilepsy Research** 70S:S5-S10, 2006.

ENNACEUR, A., & DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. **Behavioural Brain Research**, 31: 47–59, 1988.

FALCONER, M.A., SERAFENITIDES, E.A., CORSELIS. Etiology and pathogenesis of temporal lobe epilepsy. **Arch Neurol** 10:233-248. 1964.

FERNANDES, JG. **Epidemiologia das Crises Epilépticas em Porto Alegre: um Estudo Populacional**. 1993. Tese (Doutorado em Medicina) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1993.

FISHER PD, SPERBER EF, MOSHÉ SL. Hippocampal sclerosis revisited. **Brain Dev.** 20(8):563-73, 1998.

FRANKE, H., KITTNER, H. Morphological alterations of neurons and astrocytes and changes in emotional behavior in pentylenetetrazol-kindled rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 70:291–303, 2001.

FRIEDENSTEIN AJ, GORSKAJA JF, KULAGINA NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Exp Hematol**;4(5):267-74, 1976.

FRISÉN, J. Stem cell plasticity? **Neuron**, 35:415-418, 2002.

FUCHS, E., SEGRE, J.A. Stem cells: a new lease on life. **Cell** 100:143-155, 2000.

GASTAUT, H. Letter: 'Epileptic seizures'. **Dev Med Child Neurol** 15(5): 688-9, 1973.

GEDDES, J.W., COTMAN, C.W. Plasticity in hippocampal excitatory amino acid receptors in Alzheimer disease. **Neurosci Res** 3:672-678, 1986.

GERNET, M., THOMPSON, K.W., LÖSCHER, W., TOBIN, A.J. Genetically engineered GABA-producing cells demonstrate anticonvulsant effects and long-term transgene expression when transplanted into the central piriform cortex of rats. **Exp. Neurol.** 176:183-192, 2002.

GIBBS, R.A. DNA amplification by the polymerase chain reaction. **Analytical Chemistry** 62(13): 1202-14, 1990.

GIORDANO ANTONIO, U.G., MARTINO, I.R. From the laboratory bench to the patient's bedside: An update on clinical trials with mesenchymal stem cells. **J. Cell. Physiol.** 211:27-35, 2007.

GRAEFF, F.G., NETTO, C.F., ZANGROSSI, H. JR. The elevated T-maze as a experimental model of anxiety. **Neurosci Biobehavioral Review** 23(92):237-46, 1998.

GUEDES, F. A.; GALVIS-ALONSO, O. Y.; LEITE, J. P. Plasticidade neuronal associada à epilepsia do lobo temporal mesial: insights a partir de estudos em humanos e em modelos animais. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology** 12(1):10-17, 2006.

GUERREIRO, C. A. M., GUERREIRO, M. M., CENDES, F., LOPES-CENDES, I. Considerações gerais. In: Guerreiro, C. A. M., Guerreiro, M. M., Cendes, F., Lopes-Cendes, I. **Epilepsia**. São Paulo: Lemos, 2000.

GUNDERSEN, H.J., JENSEN, E.B. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. **J Microsc** 147(3):229-63, 1987.

GUNDERSEN, H. J.; BAGGER, P.; BENDTSEN, T. F. EVANS, S. M.; KOSBO, L.; MARCUSSEN, N.; MOLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, JR.; PAKKENBERG, B. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological reseach and diagnosis. **Apmis**, 96:857-881, 1988.

HAAS S, WEIDNER N, WINKLER J. Adult stem cell therapy in stroke. **Current Opin Neurol**;18:59-64, 2005.

HATTIANGADY, B., RAO, M.S., SHETTY, A. K. Chronic temporal lobe epilepsy is associated with severy declined dentate neurogenesis in the adult hippocampus. **Neurobiol Dis** 17:473-90, 2004.

HAUSER, W.A., ANNEGERS, J.F. AND KURLAND, L.T. Prevalence of epilepsy in Rochester, Minnesota: 1940–1980. **Epilepsia** 32:429–445,1991.

HOLMES, G.L. Epilepsy in the developing brain: lessons from the laboratory and clinic. **Epilepsia** 38:12-30, 1997.

HORT, J., BROZEK, G., MARES, P. et al. Cognitive functions after pilocarpine-induced status epilepticus: changes during silent period precede appearance of spontaneous recurrent seizures. **Epilepsia** 40(9):1177-83. 1999.

HOWARD, C. V. & REED, M.G. Unbiased Stereology, **Bios Scientific Publishers** 41-106, 1998.

HUBER, A., PADRUN, V., DÉGLON, N. *et al.* Grafts of adenosine-releasing cells suppress seizures in kindling epilepsy. **PNAS** 98(13):7611-7616, 2001.

ILEA. Disponível em [www.ilae-epilepsy.org](http://www.ilae-epilepsy.org) em 20/12/2008.

JANKOWSKY, J. L., DERRICK, B. E, PATTERSON, P. H. Cytokine Responses to LTP Induction in the Rat Hippocampo: A Comparison of In Vitro and In Vivo Techniques. **Learnr. Mem.**, 7(6):400-412, 2000.

JEONG SW, CHU K, JUNG KH, KIM SU, KIM M, ROH JK. STROKE. Human neural stem cell transplantation promotes functional recovery in rats with experimental intracerebral hemorrhage. **Stroke** 34(9):2258-63, 2003.

JORGE CL, YACUBIAN. E. M. T., GROSSMANN R. M; VALERIO R. M. Epilepsia com esclerose mesial temporal: Aspectos clínicos e fisiopatológicos. **Brazilian Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology** 2(4): 215-217, 1996.

KAJI, E.H., LEIDEN J. M. Gene and stem cell therapies. **Jama** 285(5):545-50, 2001.

KALUEFF, A.V., LEHTIMAKI, K.A., YLINEN, A., HONKANIEMI, J., PELTOLA, J. Intranasal administration of human IL-6 increases the severity of chemically induced seizures in rats. **Neuroscience Letters** 365(2):106-110, 2004.

KIM, J. Y., KOH, H. C., LEE, J.Y., CHANG, M. Y., *et al.* Dopaminergic neuronal differentiation from rat embryonic neural precursors by Nurr1 overexpression. **J Neurochem** 85(6):1443-54, 2003.

KLINK, R., ALONSO A. Ionic mechanisms of muscarinic depolarization in entorhinal cortex layer II neurons. **J. Neurophysiology** 77: 1829-1843, 1997.

KNOWLES, W. D. Normal anatomy and neurophysiology of the hippocampal formation. **J Clin Neurophysiol**, 9(2).252-63, 1992.

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** 16:1763-1767, 2005.

KOPEN, G.C., PROCKOP, D.J., e. PHINNEY, D.G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 96:10711–10716,1999.

KORBLING, M., ESTROV, Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? **N Engl J Med** 349(6): 570-82, 2003.

KORKMAZ, A. & TÜMKAYA, L. Estimation of the section thickness and optical disector height with a simple calibration method. **Department of Histology–Embryology, School of Medicine, Ondokuz Mayıs University, Samsun 55139**, Turkey. 187(2):104-109, 1997.

KRAUSE D.S., N.D. THEISE, M.I. COLLECTOR, O. HENEGARIU, S. HWANG, R. GARDNER, S. NEUTZEL AND S.J. SHARKIS, Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. **Cell** 105:369–377, 2001.

KUNTER U, RONG S, DJURIC Z, BOOR P, MÜLLER-NEWEN G, YU D, FLOEGE J. Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis. **J Am Soc Nephrol**;17(8):2202-12. Aug. 2006.

LEE RH, SEO MJ, REGER RL, SPEES JL, PULIN AA, OLSON SD, PROCKOP DJ. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 14; 103(46):17438-43. Nov. 2006.

LEITE, J.P, CAVALHEIRO, E.A. Neurobiologia da esclerose mesial temporal. In: Costa, J. C.; Palmira, A.; Yacubian, E. M. T.; Cavalheiro, E. A. **Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias - aspectos clínicos e cirúrgicos**. Cap 7. Vol. 1 Editora Lemos 129-136, 1998.

LEMOS,T., CAVALHEIRO, E.A. Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats. **Exp. Brain Research** 102:423-8, 1995.

LESCAUDRON, L., UNNI, D. & DUNBAR, G.L. "Autologous adult bone marrow stem cell transplantation in an animal model of Huntington's disease: behavioral and morphological outcomes." **Int. J. Neurosci**. 113:945-956, 2003.

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

LING, E.A., LEBLOND, C.P. Investigation of glial cells in semithin sections. II. Variation with age in the numbers of the various glial cell types in rat cortex and corpus callosum. **J Comp Neurol**. 1;149(1):73-81. May 1973.

LIU, Z., GRATT, A., WERNER, S.J. *et al*. Long-term behavioral deficits following pilocarpine seizures in immature rats. **Epilepsy Research** 19:191-204, 1994.

LLOYD,E., SOMERA-MOLINA, K., VAN ELDIK, L.J., WATTERSON, D.M., WAINWRIGHT, M.S. Suppression of acute proinflammatory cytokine and chemokine upregulation by post-injury administration of a novel small molecule improves long-term neurologic outcome in a mouse model of traumatic brain injury. **Journal of Neuroinflammation** 5:28doi:10.1186/1742-2094-5-28, 2008.

LORENTE DE NÓ R. Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. **J Psychol Neurol**, 46:113-177, 1934.

LÖSCHER, W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs: a comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Research** 50:105-123, 2002a.

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

MANDARIN-DE-LACERDA, C.A.; Stereological tools in biomedical reseach. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 75(4):469-486, 2003.

MCNAMARA, J. O. Cellular and molecular basis of epilepsy. **J Neurosci** 14(6): 3413-25, 1994.

MELDRUM B. Amino acid neurotransmitters and new approaches to anticonvulsant drug action. **Epilepsia**; 25 Suppl 2:S140-9. 1984.

MELDRUM BS, ROGAWSKI MA. Molecular targets for antiepileptic drug development. **Neurotherapeutics** 4:18–61, 2007.

MEZEY, E., CHANDROSS, K. J., HARTA, G., *et al.* Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. **Science** 209: 1779-82, 2000.

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** 101(5):806-12, 2004.

MINGUELL JJ, ERICES A. Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease. **Exp Biol Med.** 231(1):39-49. 2006.

MORRIS R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **J Neurosci Methods** 11(1):47-60, 1984.

MORRISON, S. J., SHAH, N. M., ANDERSON, D.J. Regulatory mechanisms in stem cell biology. **Cell** 88:287-298, 1997.

MUMBY, D.G., GASKIN, S., GLENN, M.J., SCHRAMEK, T.E., LEHMANN, H. Hippocampal damage and exploratory preferences in rats, memory for objects, places, and contexts. **Learning & Memory** 9:49–57. 2002.

MURPHY, B., DUNLEAVY, M., SHINODA, S., SCHINDLER, C. *et al.* Bcl-w protects hippocampus during experimental status epilepticus, **Am. J. Pathol.** 171:1258–1268, 2007.

OKABE, M., IKAWA, M., KOMINAMI, K. *et al.* Green mice as a source of ubiquitous green cells. **FEBS Letters** 407:313-319, 1997.

O'MARA, S. M., S. COMMINS, *et al.* The subiculum: a review of form, physiology and function. **Prog Neurobiol**, 64:129-55, 2001.

ORTIZ LA, GAMBELLI F, MCBRIDE C, GAUPP D, BADDOO M, KAMINSKI N, PHINNEY DG. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. **Proc Natl Acad Sci U S A**;100(14):8407-11, 2003.

ORTIZ LA, DUTREIL M, FATTMAN C, PANDEY AC, TORRES G, GO K, PHINNEY DG. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. **Proc Natl Acad Sci U S A**;104(26):11002-7, 2007.

PANEGYRES, P.K.. HUGHES, J. The neuroprotective effects of the recombinant interleukin-1 receptor antagonist rhIL-1ra after excitotoxic stimulation with kainic acid and its relationship to the amyloid precursor protein gene. **J. Neurol. Sci.** 154:123–132, 1998.

PAXINOS, G., e WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. **Academic Press**, San Diego, 1998.

PETERSEN B.E., BOWEN W.C., PATRENE K.D, *et al.* Bone marrow as potential source of hepatic oval cells. **Science** 284: 1168-1170, 1999.

PHINNEY, D.G. Building a consensus regarding the nature and origin of mesenchymal stem cells. **J Cell Biochem Suppl.**;38:7-12. 2002.

PHINNEY, D.G., PROCKOP, D.J. Concise review: Mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair - current views. **Stem Cells** 25:2896-2902, 2007.

PITCKÄMEN, A., I. KHARATISHVILI, *et al.* Epileptogenesis in experimental models. **Epilepsia**, v.48 Suppl 2, p.13-20. 2007.

PITCKÄMEN, A., TUUNAMEN, J., PARTANEN, K. *et al.* Amigdala damage in experimental and human temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Research** 32: 233-253, 1998.

PITTENGER, M.F., MACKAY, A.M., BECK, S.C., JAISWAL, R.K., DOUGLAS, R., MOSCA, J.D., MOORMAN, M.A., SIMONETTI, D.W., CRAIG, S., MARSHAK, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, 2;284(5411):143-7, 1999.

PRIEL MR, DOS SANTOS NF AND CAVALHEIRO EA. Developmental aspects of the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy Research** 26(1):115-121, 1996.

PROCKOP, D.J. Marrow stem cells for non-hematopoietic tissues. **Biomedicine & Pharmacotherapy** 51(9):407-408, 1997.

RACINE, R.J. Modification of seizure activity by electrical stimulation, I: after- discharge threshold. **Electroencephalogr Clin Neurophysiol** 32: 269– 79, 1972.

RAEDT R, VAN DYCKE A, VONCK K, BOON P. Cell therapy in models for temporal lobe epilepsy. **Seizure**;16(7):565-78, 2007.

REN G, ZHANG L, ZHAO X, XU G, ZHANG Y, ROBERTS AI, ZHAO RC, SHI Y. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. **Cell Stem Cell**. 7 (2):141-50, 2008.

RICE, C.M., SCOLDING, N.J. Adult stem cells - reprogramming neurological repair? **Lancet** 346:193-199. 2004.

ROCH, C., LEROY, C., NEHLIG, A., NAMER, I.J. Magnetic resonance imaging in the study of the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in adult rats. **Epilepsia** 43(4):325-335, 2002.

ROGAWSKI, M. A.; PORTER R. J. Antiepileptic drugs: pharmacological mechanisms and clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds. **Pharmacol Rev** 42(3): 223-86, 1990.

ROSSATO, J. I., BEVILAQUA, L. R. M., MYSKIW, J.C., MEDINA, J.H., IZQUIERDO, I., CAMMAROTA, M. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Learning and memory** 14(1-2):36-46. 2007.

SANABRIA E R G, CAVALHEIRO. E. A. Epileptogênese: Contribuição dos Modelos Experimentais. In: **Epilepsia**. G. M. M. Guerreiro C A M, Cendes F, Lopes-Cendes. Sao Paulo, Lemos editorial & Gráficos Ltda: 29-57, 2000.

SANDER J.V, HART Y. M. A. Epidemiologia da Epilepsia In: **Epilepsia: Um Guia Prático**. Merit-Publishing International, 1999: 43-50. Sao Paulo, 1999.

SANTOS, A. M. G. Aprendizagem e memória no labirinto aquático de MORRIS. **Técnicas para o Estudo do Sistema Nervoso**: 131-239, 1999.

SARKISIAN, M.R., TANDON, P. LIU, Z. *et al.* (Multiple kainic acid seizures in immature and adult brain: ictal manifestations and long-term effects on learning and memory. **Epilepsia** 38:1157-66, 1997.

SCHMITZ, C. and HOF, P. R. Design-based stereology in neuroscience. **Neuroscience** 130: 813-831, 2005.

SETHE S, SCUTT A, STOLZING A. Aging of mesenchymal stem cells. **Ageing Res Rev**; 5(1):91-116, 2006.

SHETTY, A.K., ZAMAN, V., SHETTY, G.A. Hippocampal neurotrophin levels in a kainate model of temporal lobe epilepsy: a lack of correlation between brain-derived neurotrophic factor content and progression of aberrant dentate mossy fiber sprouting. **Journal of Neurochemistry** 87:147-59, 2003.

SHI, Q., RAFIL, S., WU, M.H. *et al.* Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. **Blood** 92:362-367, 1998.

SHINODA, S., ARAKI, T., LAN, J.Q. *et al.* Development of a model of seizure-induced hippocampal injury with features of programmed cell death in the BALB/c mouse, **J. Neurosci. Res.** 76:121-128, 2004.

SLOVITER, R.S. Feedward and feedback inhibition of hippocampal principal cell activity evoked by perforant path stimulation: GABA-mediated mechanisms that regulate excitability *in vivo*. **Hippocampus** 1:31-40, 1991.

SLOVITER, R.S. The neurobiology of temporal lobe epilepsy: too much information, not enough knowledge. **C.R. Biologies** 328:143-153, 2005.

SNYDER, E.Y., DALEY, G.Q., GOODELL. Taking stock and planning for the next decade: realistic prospects for stem cell therapies for the nervous system. **J Neurosci. Res.** 76:157-168, 2004.

SOUZA, N., MADEIRA, M. D. N., PAULA-BARBOSA, M. M. Effects of corticosterone treatment and rehabilitation on the hippocampal formation of neonatal and adult rats. An unbiased stereological study, **Brain Res**, 794, p. 199-210, 1998.

STEM CELL INFORMATION. **The National Institutes of Health resource for stem cell research.** <http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics4.asp> em 01/12/2008.

STERIO, D.C. The unbiased estimation of number and size of arbitrary particles using the disector. **J. Microsc.** 134:127-136, 1984.

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

TAMAGAMI, H., MORIMOTO, K., WATANABE, T., NINOMIYA, T., HIRAO, T., TANAKA, A., KAKUMOTO, M. Quantitative evaluation of central-type benzodiazepine receptors with [(125)] lomazenil in experimental epileptogenesis. I. The rat kainate model of temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Res.** 61(1-3):105-12, 2004.

TERADA, N., HAMAZAKI, T., OKA, M., *et al.* Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous fusion. **Nature** 416: 542-45, 2002.

TONDREAU, T., MEULEMAN, N., DELFORGE, A., DEJENEFFE, M., LEROY, R., MASSY, M., MORTIER, C., BRON, D., LAGNEAUX, L. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. **Stem Cells**; 23(8):1105-12, 2005.

TURNER, D.A., E.H. BUHL, *et al.* Morphological features of the entorhinal-hippocampal connection. **Prog Neurobiol** 55:537-62, 1998.

TURSKI, W.A., CAVALHEIRO, E.A. *et al.* Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behav Brain Res** 9(3): 315-35, 1983.

VALÉRIO, R.M.F., YACUBIAN, E.M.T., ROSEMBERG, S.R. Anatomia Patológica em 33 pacientes com Epilepsia do Lobo Temporal. **Brazilian Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology** 1(2): 67-74, 1995.

VAN HOESEN, G.W. Anatomy of the medial temporal lobe. **Magn Reson Imaging** 13:1047-55, 1995.

VENTURIN, G.T. **Efeito do transplante de células mononucleares da medula óssea na frequência de crises e no desempenho cognitivo de ratos com epilepsia induzida por lítio-pilocarpina.** 2008. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

VERCELLI, A., MEREUTA, O.M., GARBOSSA, D. *et al.* "Human mesenchymal stem cell transplantation extends survival, improves motor performance and decreases neuroinflammation in mouse model of amyotrophic lateral sclerosis." **Neurobiology of disease** 31:395-405, 2008.

VEZZANI, A., CONTI, M., DE LUIGI, A., RAVIZZA, T., MONETA, D. *et al.* Interleukin-1beta immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures. **J. Neurosci.** 19:5054–5065, 1999.

VEZZANI, A., MONETA, D., CONTI, M., RICHICHI, C., RAVIZZA, T. *et al.* Powerful anticonvulsant action of IL-1 receptor antagonist on intracerebral injection and astrocytic overexpression in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 97:11534–11539, 2000.

WEST, M.J., GUNDERSEN, H.J. Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. **J Comp Neurol.** 1;296(1):1-22, 1990.

WINKELMANN-DUARTE EC, TODESCHIN AS, FERNANDES MC, BITTENCOURT LC, PEREIRA GA, SAMIOS VN, SCHUH AF, ACHAVAL ME, XAVIER LL, SANVITTO GL, MANDARIM-DE-LACERDA CA, LUCION AB. Plastic changes induced by neonatal handling in the hypothalamus of female rats. **Brain Res.** 19;1170:20-30, 2007.

WU, C., HUANG, L., LIOU, C., WANG, T. *et al.* Lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in immature rats result in long-term deficits in spatial learning and hippocampal cell loss. **Neuroscience Letters** 312:113-117, 2001.

WU, S., SASAKI, A., YOSHIMOTO, R., KAWAHARA, Y., MANABE, T., KATAOKA, K., ASASHIMA, M., YUGE, L. "Neural Stem Cells Improve Learning and Memory in Rats with Alzheimer's Disease." **Pathobiology.** 75(3):186-94, 2008.

YACUBIAN, E.M.T. Contribuição da semiologia das crises parciais ao diagnóstico topográfico das epilepsias. In: Costa, J. C.; Palmmini, A.; Yacubian, E. M. T.; Cavalheiro, E. A. **Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias**, São Paulo, Lemos Editorial & Gráficos Ltda., 1, p. 163-72, 1998.

ZAMAN, V., TURNER, D.A., SHETTY, A.K. Survival of grafted fetal neural cells in kainic acid lesioned CA3 region of adult hippocampus depends upon cell specificity. **Exp. Neurol.** 161:535-561, 2000.

ZAPPIA, E., CASAZZA, S., PEDEMONTE, E., BENVENUTO, F., BONANNI, I., GERDONI, E., GIUNTI, D., CERAVOLO, A., CAZZANTI, F., FRASSONI, F., MANCARDI, G., UCCELLI, A. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. **Blood.** 1;106(5):1755-61, 2005.

ZIBELL, G., UNKRUER, B., PEKCEC, A. et al. Celecoxib prevents seizure-induced up-regulation of endothelial p-glycoprotein in the blood-brain-barrier. Programs and abstracts of the **8th European Congress on Epileptology** 21-25; Berlin, Germany. Abstract T158, 2008.

ZHOU, K., ZHANG, H., JIN, O., FENG, X., YAO, G., HOU, Y., SUN, L. Transplantation of human bone marrow mesenchymal Stem Cell ameliorates the autoimmune pathogenesis in MRL/lpr Mice. **Cellular & Molecular Immunology**, 5,(6):417-424, 2008.