

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS E DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE FISILOGIA**

**TRANSPLANTE DE CÉLULAS**  
**MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA**  
**NA EPILEPSIA EXPERIMENTAL INDUZIDA POR**  
**LÍTIO E PILOCARPINA EM RATOS**

**Zaquer Suzana Munhoz Costa Ferro**

Porto Alegre  
2008

**Zaquer Suzana Munhoz Costa Ferro**

**TRANSPLANTE DE CÉLULAS  
MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA NA  
EPILEPSIA EXPERIMENTAL INDUZIDA POR  
LÍTIO E PILOCARPINA EM RATOS**

Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas e da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas: Fisiologia.

**Orientador: Dr. Jaderson Costa da Costa.**

Porto Alegre  
2008

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neurociências do Instituto de Ciências Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS) e no Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia do Centro de pesquisa Gonçalo Muniz- FIOCRUZ-BA.

Com apoio financeiro do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq; Fundação da Universidade Federal do Paraná - FUNPAR-SC; Pandurata Alimentos Ltda.; Faculdade Gama e Souza-RJ, Decit/SCTIE/MS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) FIOCRUZ-BA e PUC-RS.

## DEDICATÓRIA

*Aos meus amores **Fani** e **Egon**, pela luz da  
presença, minha inspiração e o motivo  
de querer dias melhores.*

*Ao meu amor **Pedro**, pelo carinho, tranqüilidade,  
segurança, incentivo e por tudo  
que somos e vivemos.*

*A meus pais **Valeriano** e **Janiz**, pelos valores  
que sempre me transmitiram.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. **Jaderson Costa da Costa**

por acolher, apostar, orientar, acompanhar e pontuar este projeto.  
Pelo exemplo de profissionalismo, ao senhor todo o meu respeito e admiração.

Dr. **Ricardo Ribeiro dos Santos**

que me acolheu com disponibilidade, atenção, amizade e dedicação.  
Dra. **Milena Soares** pela atenção, paciência, estímulo, objetividade e profissionalismo.

Meus colegas do Neurolab por tantas aprendizagens, especialmente a **Simone Salamoni, Andrea Alencar, Michele Pedroso, Mariana Santos, Ricardo Breda** e Dr. **Ney Azambuja** que, de uma forma ou outra, tornaram este caminho mais suave.

**Fernanda Borba Cunha e Affonso Vitola,**

que me acompanharam durante esta trajetória com entusiasmo e paciência.

Meus colegas do LETI pelas horas dispensadas em meu auxílio especialmente a **Carine Azevedo, Marcus Leal e Denis Zubieta.**

Dra. **Beatriz Longo** pela acolhida, alegria, apoio constante, atenção e amizade.

Dra. **Denise Machado, Jeremiah Mistrelo e Chistian Viezzer,**  
do Centro de Terapia Celular, pela eficiente ajuda e colaboração.

Dra. **Janine Rossato** e Dr. **Léder Xavier** por contar com a parceria.

Por fim, gostaria de agradecer ao **PPG – Fisiologia**, à **UFRGS** e ao **CNPq** pelo apoio para o desenvolvimento desta tese.

*No rancho que há no interior  
de mim mesmo  
eu, gaúcho de fé  
Me arrincono e medito.*

*Despido o poncho da vaidade  
e do orgulho  
tiro o chapéu, apago o pito  
e me achego pra uma prosa  
com o patrão maior...*

*Gracias patrão  
pelos meus parceiros  
nessa ronda da vida  
sempre de prontidão para  
me amadrinharem na  
campereada mais custosa  
ou para matearem comigo  
na hora do sossego...*

**Odilon Ramos**

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
<b>PARTE I</b>	
I. RESUMO	4
I. ABSTRACT	7
II. SIGLAS E ABREVIATURAS	10
III. INTRODUÇÃO	13
III.1 – Epilepsia	13
III.2 – Epilepsia do Lobo Temporal	14
III.2.1 – Epidemiologia	14
III.3 – Formação hipocampal	15
III.4 – Fisiopatologia das crises parciais na epilepsia do lobo temporal	17
III.5 – Alterações estruturais e funcionais associadas à epilepsia do lobo temporal	19
III.5.1 – Esclerose hipocampal	19
III.5.2 – Brotamento das fibras musgosas	20
III.5.3 – Alterações dentríticas	22
III.5.4 – Gênese de novas células	23
III.5.4.1 – Gliose	23
III.5.4.2 – Neurogênese	24
III.6 – Modelos experimentais de epilepsia do lobo temporal	25
III.6.1 – Modelo pilocarpina	26
III.7 – Estudo experimental da memória	27
III.8 – Células-tronco	30
III.8.1 – Células-tronco da medula óssea	33
III.8.1.1 – Células-tronco hematopoiéticas	34
III.8.1.2 – Células-tronco mesenquimais	36
III.9 – Propriedades das células-tronco no hipocampo epiléptico	37
IV.10 – Justificativa	39
V. OBJETIVOS	40
V.1 – Objetivo Geral	40

V.2 – Objetivos Específicos	40
V.2.1 – Grupo Agudo	40
V.2.2 – Grupo Crônico	41
<b>PARTE II</b>	
<b>I. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>43</b>
I.1 – Animais experimentais	44
I.2 – Delineamento dos experimentos	44
I.3 – Indução da epilepsia pelo modelo lítio e pilocarpina	48
I.4 – Obtenção e preparo das células mononucleares da medula óssea	49
I.5 – Controle da crises	51
I.6 – Perfusão e fixação para imunofluorescência e histologia	52
I.7 – Análise histológica	52
I.8 – Estimativa da densidade neuronal	53
I.9 – Estimativa de volume	55
I.10 – Estudo do brotamento neuronal pela técnica de Neo-Timm	57
I.11 – Estudo da migração da células mononucleares da medula óssea por imunofluorescência	58
I.12 – Estudo eletrofisiológico	59
I.13 – Versão espacial do Labirinto Aquático de Morris (LAM)	66
I.13.1 – Treino na versão espacial do Labirinto Aquático de Morris	68
I.14 – Análise dos dados e estatística	70
<b>II. RESULTADOS</b>	<b>71</b>
II.1 – Grupo Agudo	72
II.2 – Grupo Crônico	102
<b>PARTE III</b>	
<b>I. DISCUSSÃO</b>	<b>128</b>
<b>II. CONCLUSÕES</b>	<b>137</b>
II.1 PERSPECTIVAS	139
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>140</b>
<b>ANEXO</b>	<b>157</b>

**PARTE I**

## I RESUMO

A epilepsia é uma condição crônica frequentemente acompanhada de perda celular e distúrbio cognitivo. Na maioria das vezes, é difícil saber o quanto isso se deve à patologia de base que provoca as crises epiléticas, as crises epiléticas por si ou seu tratamento com fármacos antiepiléticos, bem como o contexto sócio-cultural do paciente. Para investigar o efeito das células mononucleares da medula óssea (CMO) sobre a neuroplasticidade no sistema nervoso central, induzida pelo *status epilepticus*, provocado por lítio e pilocarpina, foram estudados ratos epiléticos e controles que receberam o transplante de ( $1 \times 10^7$  CMO/100 $\mu$ l ou o mesmo volume de solução salina, na veia da cauda), 90 min após SE (grupo agudo) ou 22 dias após SE (grupo crônico). Aqui mostramos que, no grupo agudo, ao compararmos os ratos controles com os transplantados, as CMO estavam presentes em (1-3, 5, 10 e 120 dias) após o transplante no cérebro epilético. Em 10 dias expressavam o marcador de microglia (CD11b), em 120 dias expressaram o marcador de neurônio jovem (doublecortina). Verificamos por vídeo-monitoração, (15-21 dias) após o SE, que os ratos do grupo tratado com CMO não apresentaram crises espontâneas recorrentes (CER), e que, entre (120-127 dias) após SE, 20% dos ratos transplantados apresentaram CER. Observamos perda neuronal significativa nas três regiões hipocâmpais analisadas (CA1, CA3 e hilo do GD) no grupo epilético que recebeu o transplante de solução salina, sendo extremamente significativa na região de CA1 (em 10 dias); CA1, CA3 e no hilo do GD em (120 dias) após o SE. Entretanto, no grupo tratado com CMO, a perda neuronal foi menor nas regiões analisadas em 120 dias após SE. As medidas do volume hipocâmpal revelaram que não foram observadas diferenças significantes entre o grupo epilético tratado com CMO quando comparado com o grupo controle não epilético, tanto em 10 quanto em 120 dias após SE. O volume hipocâmpal entre os ratos epiléticos (não-tratado e tratado)

apresentou diferença significativa em 120 dias após SE. No estudo da atividade elétrica em fatias hipocampais, ao compararmos os dados dos ratos epiléticos encontramos uma tendência a maior facilidade de se obter LTP no grupo tratado com CMO (80% das fatias) enquanto no grupo tratado com solução salina ocorreu indução em (30% das fatias) 10 dias após SE. Esta facilidade de indução foi maior em 120 dias após SE, onde a indução da LTP ocorreu em 100% das fatias do grupo epilético tratado com CMO e em nenhuma do grupo epilético tratado com solução salina. O desempenho dos ratos epiléticos de ambos os grupos experimentais foi prejudicada no teste de aprendizagem espacial do labirinto aquático. Embora que esta função foi menos afetada nos ratos epiléticos tratados com CMO do que os ratos não tratados.

No grupo crônico, avaliamos por vídeo-monitoração o comportamento dos ratos epiléticos entre os dias 15-21 após SE, no dia 22 os ratos foram transplantados com CMO de dois diferentes doadores (1) ratos Wistar e (2) camundongos EGFP C57/bl6, ou solução salina e foram observados por mais 7 dias (1) e 14 dias (2). Verificou-se que independente do doador os ratos tiveram uma diminuição na frequência das CER de aproximadamente 50% e de 53,5% [doadores (1) e (2), respectivamente], quando comparado o período pós com o pré-tratamento. Verificamos que as células GFP-positivas foram encontradas dispersas por todo o cérebro dos ratos epiléticos 45 dias após o transplante, e estavam presentes principalmente nas áreas corticais e no giro denteado do hipocampo. Algumas destas células expressaram o marcador de neurônio adulto (NeuN) e de células da glia (GFAP). No entanto, não foram observadas nos grupos agudo e crônico, células GFP-positivas no cérebro dos ratos controle (não epiléticos). A análise quantitativa de secções do cérebro de ratos do grupo epilético tratado com CMO mostrou que o número de neurônios não diferiu significativamente do grupo controle (não-epilético) nas duas regiões avaliadas (CA1 e hilo). No estudo do brotamento neuronal o grupo de ratos tratado

com CMO apresentou aproximadamente 78,6% menos brotamento das fibras musgosas que os ratos epiléticos não tratados. No estudo eletrofisiológico a LTP induzida por estimulação tetânica foi obtida em (100%) das fatias hipocâmpais obtidas de ratos controles não-epiléticos, em (100%) das fatias de ratos epiléticos tratados com CMO e em nenhuma das fatias dos ratos epiléticos tratados com solução salina. Nossos dados sugerem que o transplante de células mononucleares da medula óssea protege e/ou previne a progressão da epilepsia crônica.

## I ABSTRACT

The epilepsy is a chronic condition frequently accompanied by cellular loss and cognitive disturbance. Most of the time, it is difficult to know how much this occurs due to the base pathology that provokes epileptic crises, the epileptic crises by themselves or their treatment with anti-epilepsy medications, as well as the patient's social-cultural context. In order to investigate the effect of bone marrow mononuclear cells (BMCs) on the neuroplasticity in the central nervous system, induced by *status epilepticus*, provoked by lithium and pilocarpine, epileptic and control rats were studied and received a transplant of ( $1 \times 10^7$  BMC/100 $\mu$ l or the same volume of saline solution, in the vein of the tail), 90 min after SE (acute group) or 22 days after SE (chronic group). Here we have demonstrated that, in the acute group, when comparing the control rats to the transplanted ones, BMCs were presented in the epileptic brain (1-3, 5, 10 and 120 days) after the transplant. In 10 days they expressed the microglial marker (CD11b), in 120 days they expressed the young neuronal marker (doublecortin). We verified by video monitoring, (15-21 days) after SE, that the rats from the treated group with BMCs did not present spontaneous recurrent seizures (SRS), and that, between 120-127 days after SE, 20% of the transplanted animals presented SRS. We observed significant neuronal loss in the three analyzed hippocampus regions (CA1, CA3 and hilo of GD) in the epileptic group that received the transplant of saline solution, being extremely significant in the region of CA1 (in 10 days); CA1, CA3 and in hilo of GD in (120 days) after the SE. However, in the group treated with BMCs, the neuronal loss was smaller in the areas analyzed in (120 days) after SE. The measures of the hippocampus volume revealed significant differences not observed between the epileptic group treated with BMCs, when compared to the non-epileptic control group, as in 10 as in 120 days after SE. Nevertheless, the hippocampus volume between the epileptic

rats (non-treated and treated) presented a significant difference in 120 days. In the study of electrical activity in hippocampal slices, by comparing the epileptic rats data, we found a tendency of a greater facility in obtaining LTP in the treated group with BMCs (80% of the slices) while in the treated group with a saline solution an induction in (30% of the slices) it occurred 10 days after SE. This facility of induction was higher in 120 days after SE, where the induction of LTP occurred in 100% of the slices in the epileptic group treated with BMCs and in none of the epileptic group treated with saline solution. In the spatial reference memory version of the water Maze test, the performance of both epileptic experimental groups was impaired. Although this function was less affected in epileptic rats treated with BMCs than in saline treated rats.

In the chronic group, we evaluated the epileptic rats behavior through video monitoring between the days 15-21 after SE, in the day 22 the rats were transplanted with BMCs from two different donors (1) Wistar rats and (2) EGFP C57/bl6 Mice, or saline solution, and were observed for more 7 days (1) and 14 days (2). It was verified that regardless on the donor, the rats had a decrease in the frequency of SRS of approximately 50% and of 53,5% [donors (1) and (2), respectively], when comparing the pos-period with the pre-treatment. We verified that the GFP-positive cells were found scattered through the whole epileptic rats brain 45 days after the transplant, and they were mainly present in the cortical areas and the dentate gyrus of hippocampus. Some of these cells expressed an adult neuronal marker (NeuN) and glial cells (GFAP). Nevertheless, this was not observed in acute and chronic groups, GFP-positive cells in the brain of the control rats (non-epileptic). The quantitative analysis of the sectors from the brain of the epileptic rats group treated with BMCs demonstrated that the number of neurons did not differ significantly from the control group (non-epileptic) in two evaluated regions (CA1 and hilo). In the study of neuronal sprouting, the group of rats treated with BMCs presented approximately 78,6%

less sprout than the rats from the non-treated group. In the electrophysiological study LTP induced by tetanic stimulation was obtained in (100%) of the hippocampal slices of non-epileptic control rats, in (100%) of the slices of epileptic rats treated with BMCs and in none of the slices from the epileptic rats treated with saline solution. Our data suggest that the transplant of cells from the bone marrow protects and/or prevents the progression of chronic epilepsy.

## II SIGLAS E APREVIATURAS

ANOVA: Análise de variância

BrdU: 5-bromo-2-deoxyuridine - deoxi-bromo-uridina

CA: corno de Ammon (*Cornu de Ammonis*)

CA1: Região 1 do Corno de Amon

CA2: Região 2 do Corno de Amon

CA3: Região 3 do Corno de Amon

CA4: Região 4 do Corno de Amon

CD11b: marcador de microglia

CER: Crises espontâneas recorrentes

CMO: Células mononucleares da medula óssea

CT: Células-tronco

CTE: Células-tronco embrionárias

CTECs: células-tronco embrionárias de camundongos

CTNs: Células-tronco neurais

CTH: Célula-tronco hematopoiética

CTM: Célula-tronco mesenquimal

DAPI: *4',6-diamidino-2-phenylindol* – marcador nuclear

DCX: *Doublecortin* – marcador de neurônios jovens – (proteína associada a microtúbulos)

DMEM: do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* – Meio de cultura de células

DZ: Diazepam

EGFP: do inglês *Enhanced Green Fluorescent Protein*, transgênico para proteína fluorescente verde

EH: Esclesore hipocampal

ELT: Epilepsia do lobo temporal

FAEs: Fármacos Antiepilépticos

g: Força gravitacional (unidade de rotação)

GABA: ácido gama aminobutírico

GD: Giro denteado

GFAP: do inglês *Glial fibrillary acidic protein* - proteína ácida fibrilar

HFS: Estimulação de alta frequência do inglês *High Frequency Stimulation*  
i.p: Intraperitoneal  
IML: Camada molecular interna  
KA: Ácido caínico  
KCl: cloreto de potássio  
KHz: Kilo Hertz  
LAM: Labirinto Aquático de Morris  
LCR: líquido Cefalorraquidiano Artificial  
LCRa: Líquido Cefalorraquidiano Artificial (de dissecação)  
Li-pilo: Lítio e pilocarpina  
LTP: Potenciação de longa duração, do inglês *Long Term Potentiation*  
mA: miliampere  
MO: Medula óssea  
MS: Metilescopolamina  
mV: milivolt  
µm: micrômetro  
µM: micromolar  
NaCl: Cloreto de sódio  
NeuN: do inglês *Neuronal nuclear antigen* – proteína nuclear específica de neurônios pós-mitóticos  
NI: Não-indução  
NMDA: Receptores N-metil-d-aspartato  
PBS: Solução salina de Fosfato Tamponada do inglês *Phosphate Buffer Salina*  
PEPS: Potencial excitatório pós-sináptico  
PEPSC: Potencial excitatório pós-sináptico de campo  
S-100β: Marcador de astrócitos adultos  
SE: *Status Epilepticus*  
SNC: Sistema nervoso central  
TO-PRO: Marcador de ácido nucléico – marcador nuclear  
VLA-1: do inglês *very late activation antigen 1*, (integrina composta pelas cadeias α1 e β1)  
VLA-2: do inglês *very late activation antigen 2*, (integrina composta pelas cadeias α2 e β1)

VLA-3: do inglês *very late activation antigen 3*, (integrina composta pelas cadeias  $\alpha 3$  e  $\beta 1$ )

VLA-4: do inglês *very late activation antigen 4*, (integrina composta pelas cadeias  $\alpha 4$  e  $\beta 1$ )

VLA-5: do inglês *very late activation antigen 5*, (integrina composta pelas cadeias  $\alpha 5$  e  $\beta 1$ )

VLA-6: do inglês *very late activation antigen 6*, (integrina composta pelas cadeias  $\alpha 6$  e  $\beta 1$ )

### III Introdução

#### III.1 Epilepsia

A epilepsia é uma disfunção cerebral caracterizada clinicamente por alterações subjetivas ou comportamentais súbitas e estereotipadas (crises epiléticas), decorrente de uma atividade elétrica anormal, de início súbito, que acomete uma ou várias áreas do encéfalo, com tendência a se repetir ao longo da vida (Da COSTA et al., 1998; MELDRUM et al., 1999).

As epilepsias e síndromes epiléticas são classificadas em mais de 40 tipos distintos. Esta classificação é definida não só pelo tipo de manifestação, mas também por características clínicas, como padrão de recorrência das crises, causa, idade de início dos eventos epiléticos, presença ou ausência de ocorrência na família, padrões eletroencefalográficos, e prognóstico da doença (ENGEL & PEDLEY, 1997).

O termo *Status Epilepticus* (SE) é definido como “crises epiléticas suficientemente prolongadas, ou repetidas em intervalos curtos, que resultam num estado epilético contínuo e duradouro” (GASTAUT, 1973). Estima-se que entre 1 a 8% dos pacientes epiléticos apresentaram em algum período da sua doença, pelo menos um episódio de SE. O SE está associado com risco significativo de déficit cognitivo (AKMAN et al., 2003).

A incidência de crises epiléticas é maior na infância e na adolescência, quando comparada com a que ocorre na vida adulta, sendo que a maioria das epilepsias inicia durante as fases iniciais do desenvolvimento (Da COSTA et al., 1998).

Quando uma lesão cerebral é o fator etiológico, os sintomas da epilepsia muitas vezes aparecem após um período sem crises na seqüência da lesão aguda (ANGELERI et al., 1999), (PAGNI & ZENGA, 2006) e (STATLER, 2006). A duração do período latente

(período livre de crises em humanos) pode variar amplamente, de meses a anos (TREIB et al., 1996) e (BENARDO, 2003). O processo em que, após um insulto cerebral agudo, alterações patológicas e fisiopatológicas gradualmente ocorrem em determinadas regiões cerebrais, levando à expressão de epilepsia, é referido como epileptogênese.

Estruturas do lobo temporal, nomeadamente o hipocampo, a amígdala, o córtex piriforme são mais suscetíveis a epileptogênese pós-insultos no cérebro; conseqüentemente, epilepsia do lobo temporal (ELT) é a forma mais comum de epilepsia no paciente adulto (ENGEL, 1989).

### **III.2 Epilepsia do lobo temporal**

A ELT pode ser caracterizada por um conjunto de manifestações clínicas, cujo ponto comum é a ocorrência de crises parciais complexas, presumivelmente, originárias do lobo temporal (ENGEL et al, 1997). Na maioria dos casos envolve as estruturas temporais mesiais, mas pode haver crises com origem no neocórtex lateral (HAUSER, 1991). Os principais tipos de crises que surgem dos lobos temporais são crises parciais simples, parciais complexas e parciais complexas com generalização secundária (COCKERELL & SHORVON, 1997).

#### **III.2.1 Epidemiologia**

A ELT é a forma predominante em pacientes adultos, sendo estimado que ocorra em 50% a 60% dos portadores de epilepsia. Aproximadamente 30 % a 40 destes pacientes têm crises refratárias aos fármacos antiepilépticos (FAE) disponíveis (HANSER, 1991). A epilepsia do lobo temporal associada à esclerose hipocampal (EH) corresponde a 60% dos

casos de ELT (GASTAUT et al, 1975; ENGEL, 2001), sendo esse tipo de epilepsia a causa mais freqüente da epilepsia refratária na idade adulta (BABB & BROWN, 1986; ENGEL et al, 1993), que pode ter controle de crises em 80% a 90% dos pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico (ENGEL et al, 1993).

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

### **III.3 Formação hipocampal**

A formação hipocampal é composta pelo giro denteado (GD), hipocampo propriamente dito ou corno de Ammon (CA), complexo subicular (subículo, para-subículo e pré-subículo) e córtex entorrinal. O hipocampo, ou CA, conforme a descrição de 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 região superior (*regio superior*) da estrutura é chamada de CA1, a inferior (*regio inferior*) de CA3, com a pequena área CA2 entre elas, e a última área de CA4. A área CA4, também chamada de hilo hipocampal, foi posteriormente incorporada ao GD, e passou a ser conhecida por região polimorfa do giro denteado.

O GD possui três camadas: molecular, granular, e hilo que, entre outros tipos, contêm as células musgosas. A camada granular é constituída predominantemente pelas células granulares. Os axônios dessas células, as fibras musgosas, estabelecem contato sináptico com as células piramidais de CA3 e com as células do hilo, onde fazem sinapse com vários tipos de células (AMARAL et al., 1989), entre elas as células musgosas. Os mais importantes interneurônios deste complexo são as células em cesto que recebem

projeções excitatórias das células musgosas. As células em cesto são consideradas de influência inibitória, fazem sinapse com as células piramidais do CA e com as granulares do GD (ROBERTS, 1986). A camada das células granulares faz limite, de um lado, com a camada polimorfa (hilo), e de outro, com as camadas moleculares interna e externa. A camada molecular interna é também conhecida como camada supragranular do GD.

Segundo Brown e Zador (1990), a circuitaria básica do hipocampo pode ser tradicionalmente descrita em termos de um circuito tri-sináptico, conforme as observações de Andersen (1966; BROWN & ZADOR, 1990). Em uma descrição simplificada, as informações do córtex entorrinal chegam ao hipocampo através de fibras que constituem a via perfurante e alcançam as células granulares do GD (I). As células granulares se projetam para o CA3 por seus axônios conhecidos como fibras musgosas (II). Essas fibras fazem sinapse com as células musgosas do hilo e com as células piramidais de CA3, que, por sua vez, através de suas projeções, alcançam as células piramidais do CA1 por vias eferentes, formando o sistema colateral de *Schaffer* (III). Estas três sinapses (I, II e III) definem a via tri-sináptica (BROWN & ZADOR, 1990). A região CA1 envia projeções ipsilateralmente para o subículo e córtex entorrinal, de onde seguem para outras áreas. No hilo, as células musgosas, que são inervadas pelas fibras musgosas (axônios das células granulares, como mencionamos acima), se projetam para as células em cesto e estas, por sua vez, para as células granulares, estabelecendo, assim, um circuito recorrente inibitório com estas últimas.

Estes circuitos são de extrema importância para a discussão sobre a participação do hipocampo na gênese das crises epiléticas. As sinapses desta circuitaria são predominantemente excitatórias. Os circuitos inibitórios que modulam esta excitação decorrem de diversos tipos de interneurônios inibitórios localizados tanto no hipocampo

propriamente dito quanto no GD. Os principais neurotransmissores envolvidos nestes circuitos são o glutamato e o GABA (BROWN & ZADOR, 1990).

O subículo representa a transição do córtex de três camadas do hipocampo (molecular, piramidal e polimorfa) e do GD (molecular, granular e polimorfa) para o córtex de seis camadas da área entorrinal do giro para-hipocampal. Diferenças citoarquitetônicas permitiram dividir essa estrutura em para-subículo, pré-subículo e subículo propriamente dito (LORENTE de NÓ, 1934). O córtex entorrinal, que nos roedores é subdividido em regiões medial e lateral, constitui a aferência mais importante do hipocampo e do GD pela via perfurante (INSAUSTI et al., 1987; AMARAL et al., 1989).

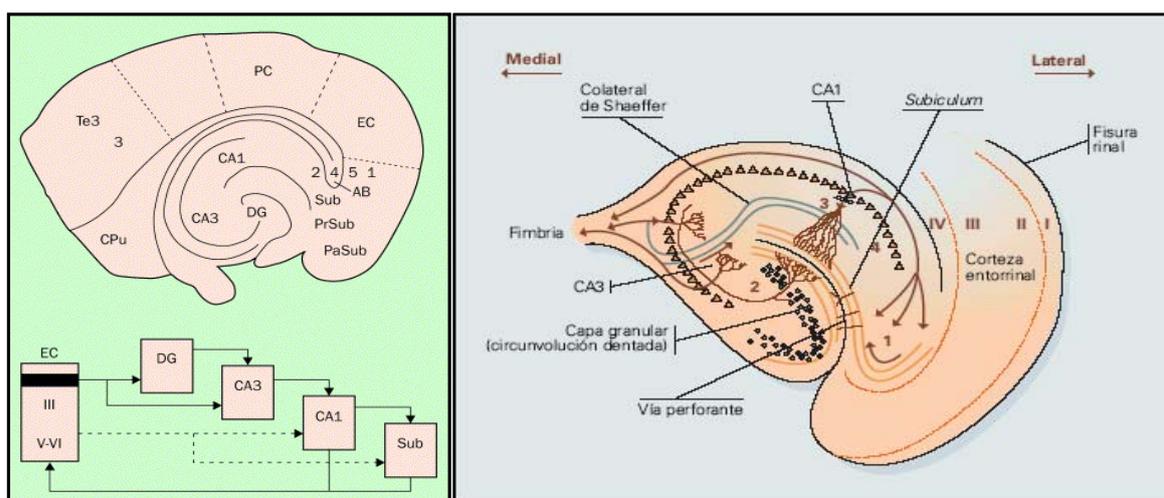


Figura 1 – Esquema representativo da circuitaria entorrinal-hipocampal (A). AB: *angular bundle*; CA1/CA3:camadas 1 e 3 do CA; Cpu:putamen caudado; GD:giro denteado; EC:córtex entorrinal (III e V-VI camadas corticais); PC:córtex periforme; Te3=córtex temporal, área 3; PaSub:parasubículo; PrSub:pré-subículo; Sub:subículo (AVANZINI & FRANCESCHETTI, 2003). Esquema da organização interna do hipocampo em (B). Os números romanos indicam as camadas celulares do córtex entorrinal e os números de 1 a 4 indicam a seqüência de ativação do circuito.

#### III.4 Fisiopatologia das crises parciais na epilepsia do lobo temporal

A crise epiléptica é definida como sinais e sintomas transitórios devido à atividade anormal excessiva ou sincrônica de neurônios cerebrais (FISCHER et al., 2005). A atividade elétrica anormal nas crises parciais origina-se de um agrupamento de neurônios

que apresentam a excitabilidade aumentada (epileptiforme). O aumento da excitabilidade pode resultar de fatores diferentes, como a alteração de propriedades celulares ou conexões sinápticas causadas por uma cicatriz local, alteração vascular, malformações, tumor, etc. Cada neurônio do agrupamento neuronal evidencia resposta elétrica estereotipada de “onda despolarizante paroxística”, que consiste de uma despolarização repentina grande e de longa duração (20-40 mV / 50-200ms), que produz um trem de potenciais de ação, seguida de uma pós-hiperpolarização. A onda despolarizante paroxística e a pós-hiperpolarização são dependentes das propriedades intrínsecas da membrana do neurônio e aferências sinápticas de neurônios excitatórios (glutamatérgicos) e inibitórios (GABAérgicos), respectivamente.

O sistema glutamatérgico hipocampal tem um papel fundamental nos processos de plasticidade neuronal, incluindo a neurogênese, modulação dentrítica, potencialização de longa duração (McEWEN, 2001), mas também pode estar envolvido nos processos de dano celular nos distúrbios neurológicos como a epilepsia, por hiperexcitação de receptores glutamatérgicos (ROGAWSKI & DONEVAN, 1999). Nesse contexto, o que determina a vulnerabilidade entre os neurônios hipocampais, em face de um evento epiléptico, parece estar relacionado às variações na expressão de receptores e proteínas. O hilo hipocampal, o CA1 e o CA3, são ricos em receptores glutamatérgicos — Assim, as regiões de CA1 têm maior concentração do receptor do tipo NMDA, enquanto o hilo e CA3 são áreas ricas em receptores do tipo cainato (TREMBLAY & BEN-ARI, 1984; GEDDES & COTMAN, 1986, FISHER, 1998). Estes receptores, quando ativados, permitem um influxo de cálcio que, em altas concentrações, pode levar à morte neuronal (BABB et al., 1991; SLOVITER, 1991). Estudo neuropatológico realizado em pacientes com esclerose mesial temporal evidencia um brotamento axonal exuberante de circuitos excitatórios, e de uma alteração de receptores glutamatérgicos (MEBERG & ROUTTENBERG, 1991). O aumento da

suscetibilidade do tecido nervoso às crises epilépticas tem sido relacionado à anormalidade de neurotransmissão do sistema nervoso central (SNC), por um aumento na transmissão excitatória ou diminuição na transmissão inibitória, ou por ambos os mecanismos (MELDRUM, 1984).

### **III.5 Alterações estruturais e funcionais associadas à epilepsia do lobo temporal**

#### **III.5.1 Esclerose hipocampal**

A esclerose hipocampal observada na ELT é um padrão típico de perda neuronal das células piramidais do CA1, CA3 e de neurônios do hilo denteado. As células piramidais do CA2 e as células granulares do GD são relativamente mais resistentes a danos neuronais (MELDRUM & BRUTON, 1992; FISHER, 1998; COVOLAN et al. 2000). A perda neuronal é acompanhada por uma intensa gliose e reorganização sináptica. Muitas evidências sugerem que as células musgosas do hilo hipocampal, principal alvo das fibras musgosas, são as mais vulneráveis do hipocampo na ELT (MARGERISON & CORSELLIS, 1966; MOURITZEN-DAM, 1980), e uma das primeiras populações neuronais a morrer em modelos experimentais de epilepsia (NADLER et al., 1980; SLOVITER, 1987; CAVAZOS & SUTULA, 1990; OBENAUUS et al., 1993; FISHER, 1998).

O mecanismo como a esclerose neuronal determina a hiperexcitabilidade neuronal ainda não é claramente definido. Uma hipótese importante, a das “células em cesto dormentes”, atribui um papel fundamental à perda das células musgosas, que normalmente excitariam interneurônios GABA-érgicos para produzir uma inibição tônica poderosa na população de células granulares (SLOVITER, 1987; 1991), (Figura 2A). Quando as células

musgosas morressem as células em cisto tornar-se-iam desprovidas da sua principal aferência excitatória e não mais seriam capazes de inibir as células granulares efetivamente. Como resultado, as células granulares tornar-se-iam desinibidas e hiperexcitáveis. Em contraste, a hipótese das “células musgosas irritáveis” (Figura 2B) (RATZLIFF et al, 2002) propõe que a intensidade na morte das células musgosas não é significativa e, pelo contrário às células musgosas poderiam fazer parte de um circuito excitatório, pois, após sua deleção, foi observada uma diminuição da excitabilidade das células granulares. O desenvolvimento de marcadores específicos e técnicas sensíveis para a detecção dos tipos neuronais vulneráveis e resistentes às crises, associados aos estudos funcionais, contribuirão para a melhor definição do papel da perda neuronal na epileptogênese.

### **III.5.2 Brotamento das fibras musgosas**

Uma das formas de plasticidade neuronal, em resposta a uma lesão no sistema nervoso central, é a reorganização sináptica que decorre de um brotamento axonal (FROTSCHER et al., 1997). Tal processo pode ter início com a degeneração de axônios específicos e de seus terminais. Essa degeneração axonal, por sua vez, induz a substituição dos axônios lesados por axônios intactos sobre o tecido desnervado (COTMAN & KAHLE, 1997).

Objeto de intensa investigação, o brotamento pós-lesional é um fenômeno detalhadamente descrito em áreas cerebrais como o neocórtex e áreas límbicas (FROTSCHER et al., 1997; MCKINNEY et al., 1997) em situações de doenças e distúrbios neurológicos, como por exemplo na ELT (TAUCK & NADLER, 1985; SUTULA et al., 1988; CRONIN et al., 1992).

Uma das alterações plásticas mais estudadas é o brotamento aberrante observado no hipocampo de pacientes epiléticos e em modelos experimentais de ELT. Conhecido como brotamento das fibras musgosas, ele consiste na formação de novos contatos sinápticos assimétricos e recorrentes entre os terminais das fibras musgosas e dendritos das próprias células granulares no terço interno da camada molecular (LAURBERG & ZIMMER 1981; (TAUCK & NADLER, 1985; CAVAZOS & SUTULA, 1990; ISOKAWA et al., 1993; OKAZAKI et al., 1995). Esta reorganização sináptica pode ter início a partir de um SE, que promove a perda das projeções das células musgosas hilares, o que, conseqüentemente, deixa as células granulares deaferentadas. Tem sido sugerido que, em substituição às sinapses perdidas, as fibras musgosas crescem, atravessam a camada das células granulares na direção da camada molecular interna, e formam contatos sinápticos assimétricos e recorrentes com os dendritos das próprias células granulares (TAUCK & NADLER, 1985; CAVAZOS & SUTULA, 1990; MELLO et al., 1993; ELMÉR et al., 1997). As fibras musgosas contêm altas concentrações de zinco em seus terminais sinápticos e podem ser facilmente visualizadas por técnicas adequadas para a marcação deste metal, como a técnica de Timm. Os botões sinápticos das fibras musgosas podem ser reconhecidos por uma característica coloração preta, índice de uma alta concentração de zinco (DANSCHER, 1981), o que permite a visualização dessa reorganização sináptica na camada molecular interna (Figura 2C).

A partir da observação desta alteração, muitos trabalhos têm se concentrado na investigação dos principais aspectos do brotamento das fibras musgosas e do seu comprometimento na epileptogênese do lobo temporal (TAUCK & NADLER, 1985; SUTULA et al., 1988, 1989; LEMOS & CAVALHEIRO, 1995; WUARIN & DUDEK, 1996; OKAZAKI & NADLER, 1997; PARENT et al., 1997; KOYAMA & IKEGAYA, 2004).

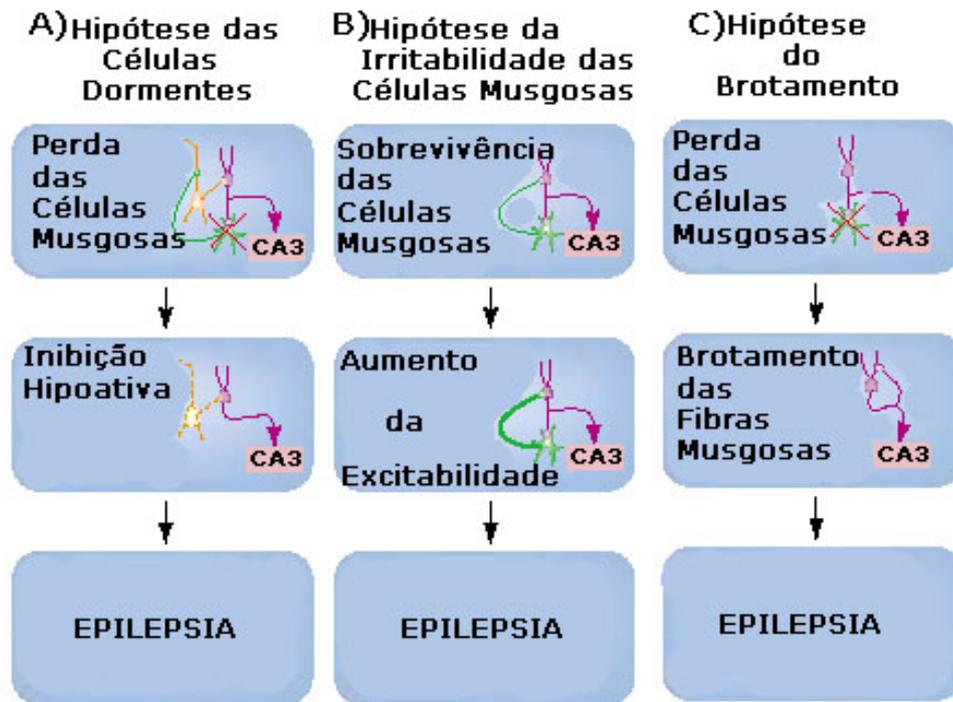


Figura 2. Hipótese que levariam à epilepsia: A) Células Dormentes, B) Hipótese das células musgosas irritáveis e C) Brotamento.

### III.5.3 Alterações dendríticas

As alterações morfológicas e localização dos dendritos foram observadas no hipocampo de pacientes com ELT assim como em modelos experimentais da ELT. Franck e colaboradores (1995) demonstraram uma alta densidade de espinhas nos dendritos localizados na porção basal das células granulares do GD de pacientes com ELT. Em ratos normais as células granulares do GD apresentam transitoriamente dendritos na sua porção basal. Apenas durante o desenvolvimento [(GOULD et al, 1997; ISOKAWA (1998, 2000)], demonstraram que após períodos de SE induzidos por pilocarpina ocorre inicialmente perda transitória e generalizada dos dendritos das células granulares. Entretanto, após o período de 15-35 dias, foi observado o aparecimento de muitas espinhas dendríticas. De forma similar, no modelo de epilepsia induzida por estimulação elétrica da

via perfurante é observado o aparecimento de dendritos basais nas células granulares (SPIGELMAN et al, 1998). Posteriormente, Ribak e colaboradores (2000) e Dashtipour e colaboradores (2002), também no modelo de epilepsia induzido por pilocarpina, observaram presença de sinapses assimétricas entre dendritos basais hilares e as fibras musgosas. O aparecimento anormal de dendritos basais nas células granulares e a presença de sinapses assimétricas desses dendritos com as fibras musgosas, na ELT, podem ser parte dos mecanismos que levam ao aumento da excitabilidade na circuitaria hipocampal.

### **III.5.4 Gênese de novas células**

#### **III.5.4.1 Gliose**

A proliferação glial é um achado proeminente no hipocampo de pacientes com ELT, associada à esclerose hipocampal (NISHIO et al., 2000). A gliose reativa é geralmente caracterizada por proliferação e hipertrofia de corpos celulares gliais, que expressam aumento substancial nos níveis da proteína ácida fibrilar (GFAP) que expressa o aumento de astroglia (TURSKI et al, 1983). No modelo de epilepsia induzido por pilocarpina, 60 dias após o episódio de SE, é observada maior expressão da proteína GFAP no hipocampo e outras estruturas como tálamo, amígdala e neocórtex. No entanto, estas alterações podem ocorrer de forma heterogênea, e é sugerido que as diferenças podem estar associadas a diferenças na frequência de crises recorrentes espontâneas (CARZILO et al, 2002). O papel da astrogliose na gênese e progressão da ELT tem sido pouco explorado e ainda não está bem definido.

### III.5.4.2 Neurogênese

Kaplan e Hinds (1977) foram os primeiros a sugerir a ocorrência de neurogênese das células granulares do giro denteado em adultos. Em 1990, Gage e colaboradores, revelaram que um grande número de células granuladas recém geradas no giro denteado de ratos adultos. Posteriormente, Van Praag (2002) demonstrou que estas células integram o circuito hipocampal e têm propriedades fisiológicas similar as células granulares maduras.

Em ratos adultos, os precursores neuronais residem na zona proliferativa supragranular do giro denteado, onde proliferam e migram continuamente para a camada de células granulares. Quando chegam a esta região, desenvolvem morfologia de células granulares (SEKI & ARAI, 1993). Ribak e colaboradores (2000) demonstram dendritos na camada molecular em ratos epiléticos e não-epiléticos. Por imunohistoquímica colocalizando doublecortina, um marcador de microtúbulos em neurônios jovens, Ribak e colaboradores (2004) descreveram a presença de neurônios recém formados com dendritos na borda hilar em ratos adultos normais. Houser (1992) descreve que em pacientes com epilepsia do lobo temporal, a maioria das células da camada granular é preservada, mas frequentemente, as células granulares ectópicas são encontradas no hilo e na camada molecular interna. Parent e colaboradores (1997) descrevem a incorporação de deoxi-bromo-uridina (BrDU), um marcador de duplicação de DNA, isto é, de mitose, em ratos submetidos ao estado de mal epilético. Os mesmos autores descrevem que crises convulsivas de longa duração aumentam de maneira importante a neurogênese e as células da zona proliferativa são estimuladas e passam a se dividir. Uma porção substancial destas células migra para a camada de células granular, mostra fenótipo de neurônios e características de células granulares. Usando marcadores específicos, os autores também mostraram que as células granulares, recém-geradas, apresentam processos semelhantes ao brotamento subgranular das fibras musgosas, projetando-se para regiões atípicas como a

camada molecular interna do giro dentado. Em 2007, Parent confirma que as crises recorrentes influenciam a neurogênese das células granulares do giro dentado e, estes neurônios granulares ectópicos contribuem para a hiperexcitabilidade, a epileptogênese e distúrbios de memória na epilepsia. Por outro lado, Hattiangady e colaboradores (2004) demonstraram que a ELT crônica esta associada à redução de 64% a 81% de novos neurônios no GD adulto de em comparação com o hipocampo de ratos não epiléticos.

### **III.6 Modelos experimentais de epilepsia do lobo temporal**

Para investigar a ELT, foi desenvolvida uma variedade de modelos animais (LÖSCHER, 1997, COULTER et al., 2002). Têm-se verificado uma crescente tendência no uso de modelos experimentais de animais epiléticos crônicos, por melhor mimetizarem características anatomopatológicas dos quadros de epilepsia humana. Os danos cerebrais induzidos por crises epiléticas são facilmente encontrados nestes modelos de ELT.

Como já foi amplamente descrito na literatura (BEN-ARI, 1985; CRONIN & DUDEK, 1988; CAVALHEIRO et al., 1991; LEITE et al., 1991; MELLO et al., 1993), os modelos da pilocarpina e do ácido caínico (KA) induzem uma série de eventos que, de maneira cronológica, simulam os observados na ELT. Dentre estes, merecem destaque a indução do SE, seguida de um período silencioso, e o desenvolvimento posterior de um quadro caracterizado pela presença das crises espontâneas recorrentes (CER). Nas preparações agudas, as crises são únicas, provocadas por um agente epileptogênico externo, enquanto nas preparações crônicas, as crises têm um caráter espontâneo e recorrente. O SE, promovido pelos agentes epileptogênicos KA e Pilo sistêmicos, determina morte neuronal acentuada no complexo hipocampal, à qual se segue o brotamento das fibras musgosas, juntamente com as CER em ratos.

O modelo crônico da Pilocarpina se caracteriza por um brotamento das fibras musgosas mais intenso e pela frequência maior de CER, quando comparado ao modelo do KA (OKAZAKI et al., 1995).

### **III.6.1 Modelo da pilocarpina**

O modelo experimental de epilepsia induzida por pilocarpina foi inicialmente descrito por Turski e colaboradores (1983). A Pilocarpina é definida como um agonista colinérgico muscarínico, extraído de plantas pilocarpíneas, do gênero *Pilocarpus jaborandi*, abundantes na região norte do Brasil. A injeção sistêmica de pilocarpina induz SE em ratos. O modelo reproduz a epilepsia do lobo temporal humana, incluindo semelhanças em patologia, alterações comportamentais, e a ocorrência de convulsões tanto parcial e generalizada (TURSKI et al., 1989). Atualmente, é um dos modelos mais frequentemente utilizados em estudos que investigam os mecanismos básicos da epilepsia e em iniciativas para testar novos compostos para o tratamento da epilepsia e epileptogenesis (CAVALHEIRO et al., 2006).

Ao modelo epileptogênico da pilocarpina tem sido acrescido lítio, uma vez que este é responsável por potencializar a ação da pilocarpina na indução do SE, incrementando a morte neuronal seletiva inerente à epilepsia, possivelmente por uma *up-regulation* da síntese dos receptores dopaminérgicos e dos receptores colinérgicos muscarínicos (HIRSCH et al, 1992; RIGOULOT et al, 2004).

Ao receber pilocarpina, os ratos apresentam crises epilépticas de intensidade variável, caracterizadas por imobilidade, tremor, automatismo bucofaciais, abalos de extremidades, ataxia e crises tônico-clônicas (RACINE, 1972). Interrompendo-se as crises com um fármaco antiepiléptico, benzodiazepínico. Após a recuperação, o animal

permanece sem crises por um período de tempo (período latente). Análises anteriores baseadas em vídeo ou observações visual dos animais sugerem que a média de latência de SE para o aparecimento de crises epilépticas espontâneas varia de 10 a 18 (ARIDA et al., 1999, LEITE & CAVALHEIRO, 1995 e PRIEL et al., 1996). Após este período, surgem crises epilépticas espontâneas recorrentes, caracterizando a epilepsia experimental crônica do lobo temporal. Acredita-se que este procedimento determina insulto excitotóxico secundário a hiperatividade neuronal prolongada, provocando morte neuronal em áreas susceptíveis, como o GD e as regiões CA1 e CA3 do hipocampo, induzindo uma cascata de eventos que levam a modificações nas propriedades intrínsecas dos neurônios, bem como das redes neuronais (SANABRIA & CAVALHEIRO, 2000). Isto é semelhante ao que acontece em outros modelos de epilepsia experimental e em pacientes com epilepsia do lobo temporal.

### **III.7 Estudo experimental da memória**

A possibilidade de guardar memórias é uma característica adaptativa importante, uma vez que novos conhecimentos moldam e modificam toda a variedade de comportamentos no decorrer do desenvolvimento de um organismo. Izquierdo (2002) descreve “Memória é a aquisição, a formação, a conservação e a evocação de informações”, adquirida através de experiências. As memórias derivam de mudanças da transmissão sináptica entre os neurônios que ocorrem como resultado da atividade neural prévia (BLISS & COLLINGRIGDE, 1993). Entretanto, um número muito grande de neurônios (do hipocampo e regiões corticais) pode inibir a formação e evocação de memória (IZQUIERDO, 2003).

Os vários tipos de memórias são classificados por diversos critérios, como, por exemplo, de acordo com o tempo que duram e com o seu conteúdo. Segundo o critério

temporal, as memórias são classificadas de acordo com o tempo que permanecem disponíveis após a aquisição. Conceitua-se uma memória de longa duração, se a memória pode ser evocada dias, semanas ou anos após ser formada. No entanto, se ela puder ser evocada apenas por um curto período de tempo (horas) após a aquisição, é chamada de memória de curta duração (IZQUIERDO et al., 1998). Alterações na memória são comumente encontradas em pacientes com ELT, especialmente na memória verbal (no aprendizado e na consolidação desta informação), podendo apresentar déficit mais severo com a alta frequência de crises (HENDRIKS et al., 2004).

Estudos com lesões em primatas demonstraram que o hipocampo, o córtex entorinal e o cíngulo são importantes para as memórias declarativas (ZOLA-MORGAN et al., 1993). A necessidade do hipocampo e as suas conexões estarem intactas para a formação de memórias declarativas em animais foi bem estudada em tarefas que se utilizam dicas espaciais (MORRIS et al., 1986). Esta estrutura é particularmente plástica, podendo apresentar alterações morfológicas como sinaptogênese e neurogênese no adulto (BEN-ARI et al., 1990; RAMÍREZ-AMAYA et al., 1996).

Inúmeros trabalhos eletrofisiológicos, farmacológicos e comportamentais sugerem que a Potenciação de Longa Duração (LTP, do inglês *Long Term Potentiation*) no hipocampo e talvez em outras regiões do encéfalo (amígdala e córtex cerebral) possam contribuir para certas formas de aprendizado e memória em mamíferos (BLISS & COLINGRIGDE, 1993). Ao longo dos anos, demonstrou-se que a LTP compartilha inúmeras e importantes características com o aprendizado de novas memórias, sendo apontada pelos estudiosos do assunto como um mecanismo de memória (BLISS & COLINGRIGDE, 1993). Há evidências que mostram certa semelhança entre os dois fenômenos: o processo da LTP ocorre em estruturas cerebrais envolvidas no processo da memória (MAREN & BAUDRY, 1995).

Timothy Bliss & Terje Lømo, (1973) estimularam uma via nervosa específica no hipocampo de coelhos. Descobriram que quando aplicado a uma via hipocampal, um tétano (período breve de atividade elétrica de alta frequência) produzia um aumento na efetividade sináptica, que durava por horas em um animal anestesiado e podia, quando repetida, durar dias ou mesmo semanas em um animal alerta e livre para mover-se. Esse tipo de facilitação é agora denominado facilitação de longa duração ou potenciação de longa duração (BLISS et al., 1973; SQUIRE & KANDEL et al., 2003) (Figura 3).

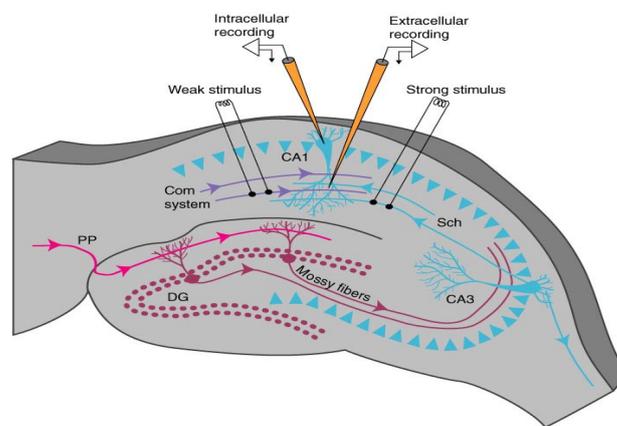


Figura 3 – Esquema mostrando o posicionamento dos eletrodos (registro e estímulo) para a indução da LTP (Adaptado de ZIGMOND et al., 2000).

A LTP da transmissão sináptica no hipocampo é considerada o modelo experimental principal para as alterações sinápticas que podem estar na base do aprendizado e memória (MALENKA & NICOLL, 1999). Segundo Medina e colaboradores (1997), a LTP apresenta diversas características que a tornam uma candidata para ser um importante mecanismo do armazenamento de longa duração. Primeiro, ocorre em cada uma das três vias principais mediante as quais a informação flui no hipocampo: a via perforante, a via das fibras musgosas e a vias das colaterais de *Schaffer*. Segundo, é induzida rapidamente: uma única série de estímulos elétricos de alta frequência pode

dobrar a efetividade de uma conexão sináptica. Terceiro, uma vez induzida, é estável por uma ou mais horas ou mesmo por dias, dependendo do número de vezes que o tétano é repetido (SQUIRE & KANDEL, 2003).

### **III.8 Células-Tronco**

O estudo das células-tronco (CT) tem-se mostrado uma área bastante explorada nos diversos segmentos da biologia nos últimos 10 anos. Esse crescente interesse está relacionado às possibilidades que as CT oferecem em terapias celulares, representando uma revolução no entendimento dos mecanismos de reparo e regeneração tecidual. Destaca-se ainda o fato de poderem ser aplicadas em terapias para diversas doenças para as quais não há tratamento eficaz (revisado por MIMÉAULT, HAUKE & BATRA, 2007).

As três propriedades das células-tronco que, juntas, as distinguem de todas as outras células são: 1) a habilidade em dar origem a novas células-tronco indefinidamente, freqüentemente denominada auto-renovação, 2) a habilidade de se diferenciar em mais de uma linhagem celular (por divisão assimétrica pode formar uma célula-tronco filha idêntica a ela própria e outra célula filha que é diferente e, em geral de potencial mais restrito); e 3) a capacidade de originar células funcionais nos tecidos derivados da mesma linhagem (VERFAILLIE, 2002). Assim, as CT são células indiferenciadas capazes de se diferenciar originando progenitores maduros, bem como células efetoras completamente diferenciadas. É importante distinguir as CT dos muitos tipos de células progenitoras, de forma que as primeiras se auto-renovam por toda a vida de um organismo, enquanto as células progenitoras possuem auto-renovação e potencialidade limitadas. As CT podem ser classificadas segundo sua potencialidade de diferenciação, algumas células são mais pluripotentes que outras. São chamadas de totipotentes 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 pré-embrião (blastocisto) (a partir de 32-64 células, aproximadamente, a partir do 5º dia de vida, CT-embrionárias) (SOLTER, 2006). Células-tronco 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; HERZOG, CHAI & KRAUZE, 2003).

As CT podem ser encontradas nos embriões, no tecido fetal (membrana amniótica e cordão umbilical) e no tecido adulto como na medula óssea, coração, cérebro, tecido adiposo, músculo, pele, olhos, rins, pulmões, fígado, trato gastro intestinal, pâncreas, mama, ovários, próstata e testículos (revisado por MIMEAULT, HAUKE & BATRA, 2007).

As CT-embrionárias (CTE) são derivadas da massa interna do blastócito cinco dias após fertilização (em humanos) e podem ser expandidas em cultura na presença de fatores específicos. O uso dos fatores tróficos é essencial, visto que, na sua ausência, as CTE se diferenciam espontaneamente em todos os tipos de tecidos. Entretanto, o maior obstáculo para o sucesso da aplicação na clínica células diferenciadas a partir de CTE é a da rejeição imune, formação de teratomas ou teratocarcinoma nos receptores *in vivo*, devido à presença de diferenciadas e indiferenciadas CTEs no transplante (DRAPER et al., 2004; TROUNSON, 2006 a e b; ANDREWS et al., 2005). Por outro lado, podem ser amplamente expandidas em cultura, sem que ocorra perda aparente da potencialidade e da capacidade de auto-renovação (MIMEAULT & BATRA, 2006; TROUNSON, 2006; CHEN et al, 2007).

Em humanos adultos a primeira célula-tronco relatada foi a hematopoiética (CTHs) (*hematopoietic stem cells, HSC*) (revisado por DOMEN & WEISSMAN, 1999). Esta célula localiza-se na medula óssea, e já foi extensivamente caracterizada, demonstrando ser uma célula multipotente que dá origem às células do sangue (KRAMPERA, 2006). Além da CTHs, outra célula encontrada na medula óssea é a mesenquimal (CTMs) (*mesenchymal stem cells*) e gera estroma medular, ossos, tendão, cartilagem, tecido adiposo, muscular e células com características neurais (PROCKOP, 1997; KOPEN et al., 1999; PITTENGER et al., 1999, revisado por KRAMPERA, 2006). Outras células-tronco pós-natais já foram descritas, como por exemplo; as células neurais, que se situam no cérebro, e dão origem aos neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (McKAY, 1997; BJORNSON et al., 1999; e GAGE, 2000). Vários investigadores concordam que células-tronco adultas, possuem maior plasticidade e potencial de diferenciação, circulando no sangue periférico e migrando para tecidos e órgãos. (ASAHARA & KAWAMOTO, 2004; MIMÉAULT & BATRA, 2007; WRIGHT et al., 2001; SCHATTEMAN et al., 2007).

A diferenciação das células-tronco adultas é subordinada aos estímulos bioquímicos produzidos pelo tecido (nicho) ou meio de cultura no qual a célula está inserida. Tais estímulos, em sua maioria, decorrem de ação de peptídeos semelhantes a hormônios, que como tais, regulam a atividade celular. Estes peptídeos são denominados de fatores de crescimento. Podem ser produzidos autocrinamente pela célula alvo ou liberados através da membrana plasmática das células adjacentes, modulando a atividade celular (TAKAHASHI *et al.*, 2007). Embora o mecanismo exato da ação dos fatores de crescimento, sobre a atividade das células-tronco adultas, não esteja completamente elucidado, reconhece-se que estas células se diferenciarão no tipo celular do tecido no qual se encontram, mediante esse estímulo. Acreditava-se que as células-tronco adultas

originam linhagens celulares diferentes por diferenciação, transdiferenciação e fusão celular (HERZOG *et al.*, 2003).

### III.8.1 Células-tronco da medula óssea

O compartimento medular tem sido descrito como composto basicamente por três sistemas celulares: hematopoiético, endotelial e estromal. O sistema celular estromal inclui – células endoteliais, células reticulares, adipócitos, osteoblastos e fibroblastos – associados à matriz extracelular, assim como outros tipos de células (revisado por DEANS E MOSELEY, 2000).

As células do estroma medular garantem suporte mecânico às células tronco-precursoras hematopoiéticas, além de produzirem matriz extracelular e fatores solúveis que regulam a hematopoiese (DEXTER, 1982). Proteínas da matriz, como colágeno, fibronectina, vitronectina e tenascina atuam em conjunto com fatores solúveis como o fator da célula-tronco (*stem cell factor*), citocinas como fator estimulatório, e moléculas de adesão tais como as da superfamília das integrinas (VLA-1, VLA-2, VLA-3, VLA-4, VLA-5, VLA-6) na constituição do nicho da célula-tronco hematopoiética (revisado por WHETTON E GRAHAM, 1999).

Lanzkron e colaboradores (1999) descrevem que na medula óssea podem ser distinguidos dois tipos de células-tronco hematopoiéticas (CTHs): *HSCs-LTR* (*long-term*) e *HSCs-SRT* (*short-term*), e que o potencial de proliferação destas células *in vivo* (por curto ou longo tempo) está associado com a fase do ciclo celular em que se encontram no momento do transplante (SZILVASSY, 2003). Uma segunda classe de células-tronco contida na medula óssea são as células-tronco mesenquimal (CTMs – também chamada de

células estromais). Assim como, células progenitoras endoteliais têm sido encontradas na circulação (ASAHARA et al.,1999).

Krause e colaboradores (2001) demonstraram que o transplante de células da medula óssea resultou na completa e permanente reconstituição dos tecidos hematopoiéticos, e também se diferenciaram em uma variedade de células epiteliais no fígado, pulmões, trato gastrointestinal e pele. Outros estudos demonstram que células da medula óssea se diferenciaram em microglia e astrócitos em camundongos (HICKEY & KIMURA, 1988.; EGLITIS & MEZEY, 1997). Da mesma forma, em 2000 grupos diferentes (MEZEY et al., 2000; BRAZELTON et al., 2000) reportam a detecção de células da medula óssea expressando marcadores neuronais.

A medula óssea é, na realidade, uma fonte permanente de células-tronco pluripotentes, que podem originar não somente linhagens celulares hematopoiéticas e mesenquimais (osso, cartilagem, adipócitos), mas também células de vasos sanguíneos (musculares lisos e endoteliais), e em linhagens embriologicamente mais distantes, tais como hepatócitos e células do sistema nervoso (KORBLING & ESTROV, 2003). O sistema hematopoiético de ratos e humanos são organizados em uma hierarquia de tipos de células clonogênicas com diferentes capacidades para auto-renovação, proliferação, e diferenciação (SZILVASSY, 2003; Figura 4).

### **III.8.1.1 Células-tronco Hematopoiéticas**

As CTHs da medula óssea são funcionalmente definidas por sua capacidade de auto-renovação e de diferenciar e produzir todos os tipos de células maduras do sangue (KONDO et al, 2003). CTHs geram a progênie da linhagem hematopoiética: Linfócitos T e B; eritrócitos, megacariócitos/plaquetas; basófilos /mastócitos; eosinófilos; neutrófilos/granulócitos, e monócitos/macrófagos (BRYDER, ROSSI & WEISSMAN,

2006; KIM et al., 2005; WILSON & TRUMPP, 2006, Figura 4) e possuem um alto potencial de proliferação (MORRISON et al., 1995.; KRAUSE et al., 2001). CTHs prematuras e dormentes podem ser localizadas na superfície do sangue. Elas também podem interagir por formação de junções aderentes como células de suporte, e também são encontradas na microvasculatura endotelial da medula óssea (Revisado por MIMEAULT, HAUKE & BATRA, 2007). A transição entre o estado inativo e ativo das CTHs, bem como sua migração é controlada por uma rede de fatores de crescimento e citocinas como o fator estimulatório de colônia de granulócitos-macrófagos (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) e fator estimulatório de colônia de granulócitos (*granulocyte colony-stimulating factor*) na constituição do nicho célula-tronco hematopoiética (revisado por WHETTON & GRAHN, 1999). No entanto, menos que 0,1% das CTHs da medula óssea são células-tronco pluripotentes, capazes de proliferação e auto-renovação (SZILVASSY, 2003). CTHs têm sido usadas em transplantes autólogo e alogênico, no tratamento de pacientes com doenças auto-imunes e em doenças hematopoiéticas diversas, para reconstituir a linhagem de células hematopoiéticas e o sistema imune (BRYDER, ROSSI & WEISSMAN, 2006) e produzem fatores de crescimento e citocinas úteis que podem ajudar a reparar tecidos (PITTENGER, 2008). Prévios estudos demonstraram que CTHs podem se diferenciar em células do fígado (PETERSEN et al., 1999; LAGASSE et al., 2000), pâncreas (IANUS et al., 2003), coração (ORLIC et al., 2001 e JACKSON et al., 2001), rim (MASUYA et al. 2003) e cérebro (EGLITIS & MEZEY, 1997 ).

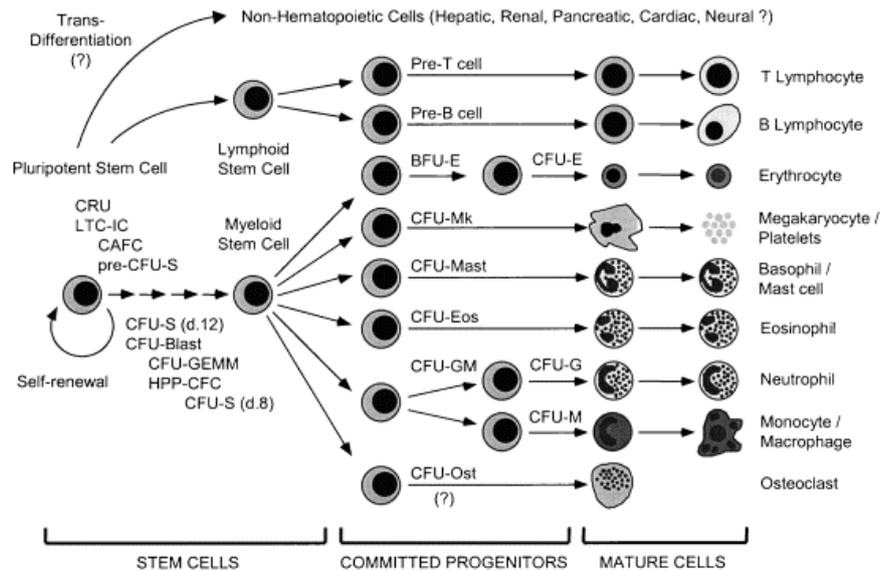


Figura 4: Representação esquemática do desenvolvimento das células hematopoiéticas (SZILVASSY, 2003).

### III.8.1.2 Células-tronco mesenquimais

As CTMs são encontradas na medula óssea de indivíduos adultos, imersas no estroma (PITTENGER et al., 1999) e na parede vascular de tecidos periféricos. São células aderentes, pluripotentes, não hematopoiéticas e progenitoras, encontradas em uma quantidade muito pequena na medula óssea humana  $1/10^5$  (revisado por KRAMPERA et al., 2006). No entanto, as CTMs podem se diferenciar em diversos tecidos de origem mesenquimal, incluindo células estromais da medula óssea, adipócitos, osteoblastos, condrócitos, miócitos esqueléticos e células do mesoderma visceral (revisado por KRAMPERA et al, 2006). Elas podem ainda se diferenciar em tecidos de origem do ectoderma *in vitro* (neurônios – WOODBURY et al, 2000) e *in vivo* (células neurais – KOPEN et al., 1999), assim como, em tecidos de origem endodermal (hepatócitos – PETERSEN et al, 1999). Recentemente, foi demonstrado que as CTMs podem exercer atividade imunomodulatória por induzir o aumento do número das células T regulatórias

como CD4<sup>+</sup>, CD8 e CD25<sup>+</sup> (AGGARWAL & PITTENGER, 2004; GLENNIE et al, 2005), e seus efeitos tróficos (CAPLAN & DENNIS, 2006).

Assim, dados experimentais demonstram que estas células, uma vez transplantadas, migram na corrente sanguínea para a área isquêmica e uma pequena percentagem delas expressam marcadores específicos (KRAMPERA et al, 2006). Nos últimos anos vários grupos investigam o potencial clínico das CTMs. Os dados disponíveis na literatura sobre a expansão celular, caracterização funcional, propriedades regenerativas e imunossupressoras ainda são contraditórios.

### **III.9 Propriedades das células-tronco no hipocampo de animais epiléticos**

Ruschenschmidt e colaboradores (2005) analisaram as características de precursores neurais derivadas de células-tronco embrionárias de camundongos (CTECs), transplantadas no hipocampo de ratos epiléticos crônicos e controles. A maioria das CTECs foram encontradas em *clusters*, no tecido cerebral, embora que uma pequena quantidade de CTECs migraram no cérebro. No entanto, análises eletrofisiológicas revelaram que essas células têm capacidade de gerar potências de ação e expressar correntes de K<sup>+</sup> e Na<sup>+</sup> voltagem-dependente, bem como, correntes ativadas por hiperpolarização. Curiosamente, não foram encontradas diferenças nas propriedades funcionais dos CTECs entre ratos controles e ratos tratados com pilocarpina.

Chu e colaboradores (2004) examinaram os efeitos do transplante de células-tronco neurais (CTNs) humana sobre as CER em ratos submetidos a SE. O transplante foi realizado um dia após a indução da SE pela veia da cauda. Entre 28 e 35 dias após a SE, 87% dos animais que receberam o transplante não apresentavam crises. Em contrapartida, apenas 13% dos animais que receberam o transplante com CTNs humana apresentavam

CER. Células do doador foram observadas em várias regiões do cérebro, incluindo o hipocampo. A investigação de fenótipos revelou que apenas algumas células derivadas de CTNs expressavam marcadores de neurônios adultos .

Recentemente, Shetty e Hattiangady (2006) induziram *status epilepticus* por ácido caínico em ratos, 4 dias após transplantaram CTNs isoladas do hipocampo, na região CA3. Os autores descrevem que algumas destas células migraram para o giro denteado e se diferenciaram em neurônios, sendo que, a maioria das células se diferenciaram em astrócitos e algumas células transplantadas expressaram o neurotransmissor GABA.

E finalmente, Acharya e colaboradores (2007), avaliaram a eficiência das células CTNs hipocampais de ratos na supressão de CER, na ELT crônica induzida por ácido caínico. Os resultados sugerem que o enxerto foi eficaz e houve uma redução na frequência e intensidade das CER.

Experimentos realizados anteriormente com células-tronco em modelos experimentais de epilepsia estão representados na tabela 1.

Estudos de transplante de células-tronco em modelo experimental de epilepsia						
Autores	Tipo de células	Modelo animal	Tempo de transplante	Local do transplante	Efeito	Diferenciação
Chu et al. 2004	CTNs da ZV de cérebro humano com 15 semanas de gestação	Pilocarpina	1 dia após SE	Veia da cauda	Redução das CERs 28-35 dias após SE	Algumas células se diferenciaram em neurônios GABA-érgicos no hipocampo amígdala e córtex piriforme
Ruschenschmidt et al. 2005	Precursosores neuronal diferenciados de CT de camundongos	Pilocarpina (IP)	1 mês após SE	Intracerebral no hipocampo	Não analisado	As propriedades funcionais nos animais transplantados foi similar aos controles
Shetty e Hattiangady. 2006	CTNs hipocampais de ratos	A.C (ICV)	4 dias após a lesão	Intracerebral no hipocampo	Não analisado	Diferenciação em neurônios e astrócitos
Acharya et al. 2007	CTNs hipocampais de ratos	A.C (IP)	4 meses após a lesão	Intracerebral no hipocampo	~ 50% de redução das CERs	A maioria das células se diferenciaram em astrócitos, e algumas em neurônios.

IP: intraperitoneal; ICV: intra cérebro ventricular; A.C: ácido caínico; CTNs: células-tronco neuronal; CT: células-tronco; ZV: zona ventricular  
SE: *status epilepticus*; CERs: crises recorrentes espontâneas.

Tabela 1: Estudos com transplante de células-tronco revisado por Shetty e Hattiangady, 2007.

#### IV JUSTIFICATIVA

Apesar dos inúmeros trabalhos científicos dedicados à elucidação dos fenômenos envolvidos na epilepsia e dos importantes avanços na área da epileptologia obtidos nos últimos anos, aproximadamente 50 milhões de pessoas no mundo sofrem de epilepsia refratária aos atuais tratamentos medicamentosos (revisado por ROGAWSKI et al., 1990). O tratamento é realizado com fármacos antiepiléticos e, considerando que aproximadamente 1/3 dos pacientes com epilepsia são refratários ao tratamento medicamentoso (LÖSCHER, 2002), cresce a necessidade de desenvolver terapêuticas alternativas.

Nos últimos 10 anos vários grupos estudam a biologia e potencial terapêutico das células da medula óssea (Revisado por MEZEY, 2007 e KRAMPERA, 2006), no entanto não encontramos nenhum relato da aplicação de células de medula óssea na terapia da epilepsia.

Há um potencial muito grande para a terapia com células de medula óssea no tratamento das epilepsias refratárias, principalmente para aquelas que têm um curso progressivo pela frequência de crises associada à polifarmácia.

Foram estes fatos que inspiraram a elaboração dos objetivos do presente trabalho, descritos a seguir.

## **V OBJETIVOS**

## **V. 1 Objetivo Geral**

Verificar se o transplante de células mononucleares da medula óssea apresenta potencial terapêutico no controle das crises epilépticas e no dano neuronal progressivo induzido pela epilepsia experimental, através da restauração da população e/ou conexões neurais perdidas neste processo neurodegenerativo.

## **V.2. Objetivos Específicos**

### **V.2.1 Em ratos com epilepsia temporal induzida pelo modelo do lítio e pilocarpina e transplantados com células de medula óssea na fase aguda:**

1. Avaliar a frequência de crises epilépticas.
2. Avaliar a nidação e expressão de marcadores neuronais e gliais das células transplantadas.
3. Avaliar a reorganização cito-arquitetônica do hipocampo após o transplante celular.
4. Avaliar eletrofisiologicamente o circuito monossináptico hipocampal através da LTP.
5. Avaliar o desempenho dos animais no Labirinto Aquático de Morris.

### **V.2.2. Em ratos com epilepsia temporal induzida pelo modelo do lítio e pilocarpina e transplantados com células de medula óssea na fase crônica:**

1. Avaliar a frequência de crises epiléticas.
2. Avaliar a nidação e expressão de marcadores neuronais e gliais das células transplantadas.
3. Avaliar a reorganização cito-arquitetônica do hipocampo após o transplante celular.
4. Avaliar o brotamento neuronal no hipocampo após o transplante celular.
5. Avaliar eletrofisiologicamente o circuito monossináptico hipocampal através da LTP.

**PARTE II**

## **CAPITULO I**

### **MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **I.1 Animais experimentais**

Para a realização dos estudos, utilizaram-se ratos Wistar adultos, com 40-45 dias de idade, pesando entre 110-130 gramas, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos em caixas apropriadas com capacidade para 5 animais, forradas com maravalha. Recebiam água e comida à vontade, e foram submetidos a ciclos de claro-escuro de 12 horas (luz a partir das 7:00 horas e escuro a partir das 19:00 horas), a uma temperatura ambiente mantida em torno de 22°C. As caixas eram trocadas a cada 2 dias. O máximo de precaução foi deliberado com o intuito de minimizar o sofrimento dos animais e de reduzir o número de animais utilizados. Todos os experimentos estiveram de acordo com as normas dos “*Principles of laboratory animal care*” (NIH publication N° 85-23, revisado 1996) este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) sob o protocolo de número 0502657.

## **I.2 Delineamento dos experimentos**

Neste estudo avaliamos o efeito das CMO em ratos epiléticos que foram transplantados em dois diferentes tempos após SE. Um grupo recebeu o transplante das CMO imediatamente após o SE o qual foi chamado de **grupo agudo**. Outro grupo recebeu o transplante das CMO 22 dias após o SE e foi chamado de **grupo crônico**.

Para a indução da epilepsia, com o uso do modelo Li-pilo (lítio e pilocarpina), animais do grupo agudo e crônico foram distribuídos em dois subgrupos: **A) grupo Pilocarpina** e **B) grupo controle**.

**Grupo agudo:** os animais do grupo pilocarpina (n=113) induzidos a epilepsia por Li-pilo, após receberem diazepam, foram divididos em: grupo Li-pilo-salina (que recebeu no transplante solução salina, n=46), grupo Li-pilo-CMO (que recebeu no transplante

células mononucleares da medula óssea, n=67). O grupo controle-salina (que recebeu no transplante solução salina, n=44), e grupo controle-CMO (que recebeu no transplante células de medula óssea, n=4), (Figura 5).

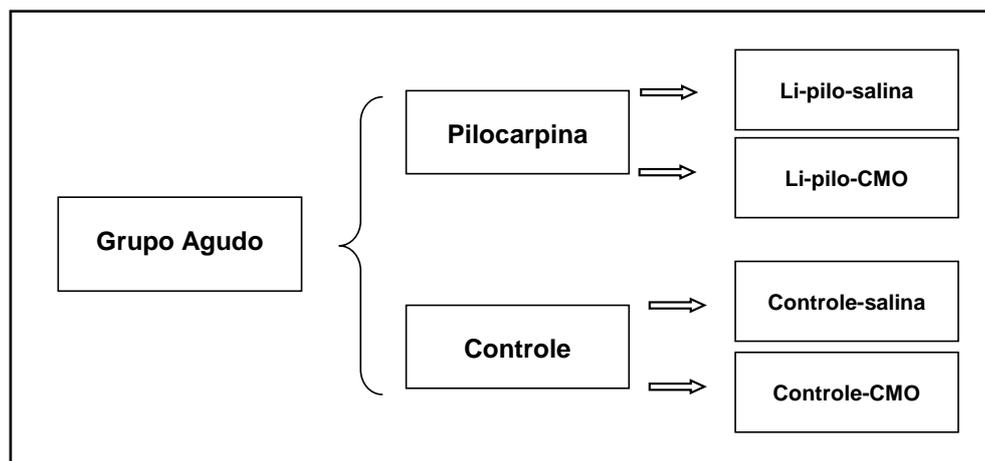


Figura 5 – Esquema com os grupos experimentais. Na indução do SE: Pilocarpina são animais que receberam Li-pilo e Controle são animais que receberam solução salina. No transplante: Li-pilo-CMO (receberam células mononucleares da medula óssea) e Li-pilo-salina (receberam solução salina). Controle-salina (receberam solução salina) e Controle-CMO (receberam células mononucleares da medula óssea).

Posteriormente aos 10, 15 e 120 dias pós SE foram realizados diferentes protocolos experimentais para: quantificação das CER (vídeo-monitoramento), migração celular por imunofluorescência, contagem celular (técnica do disector óptico), volume celular (pela técnica de Cavalieri), e a memória pela atividade elétrica (LTP) e no Labirinto aquático de Morris (LAM).

Para quantificação das crises, os animais foram vídeo-monitorados por 7 dias pelo período de 12 horas ( 6 horas claro/6 horas escuro). O início das filmagens foi aos 15 e 120 dias após SE (Figura 6).

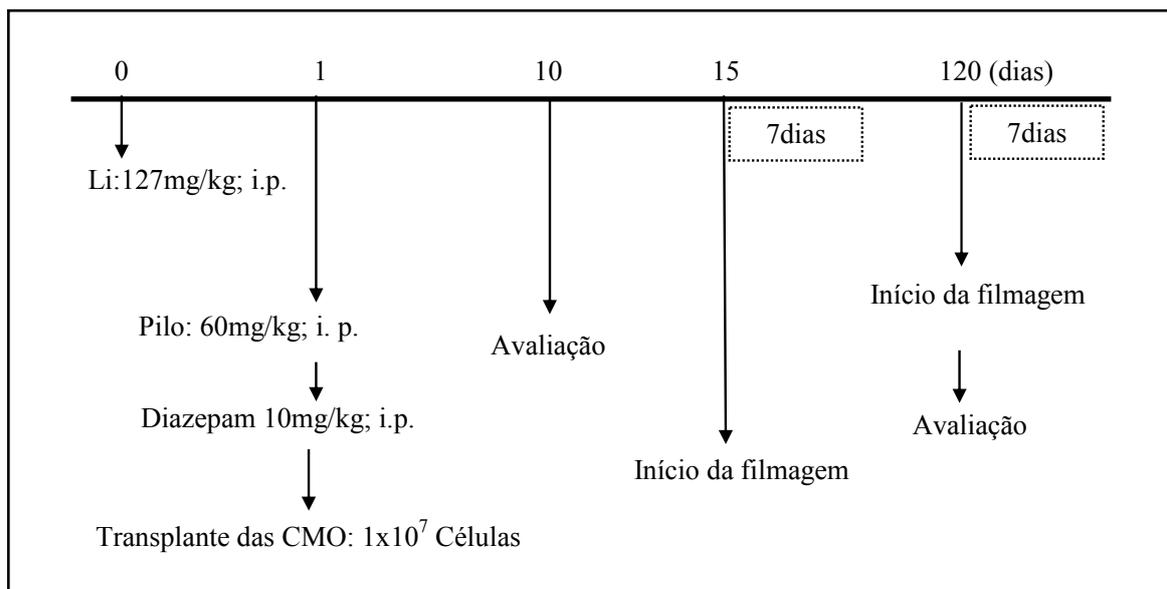


Figura 6- Esquema do delineamento experimental do grupo agudo. Li: lítio, Pilo: pilocarpina, SE: *status epilepticus*, CMO: células mononucleares da medula óssea, i.p.: intraperitoneal. Avaliação: da migração celular por (imunofluorescência), perda neuronal (pelo método do disector óptico), volume celular pelo método de Cavalieri, e a memória pelo estudo da LTP e o treinamento no LAM.

**Grupo crônico:** os animais induzidos a epilepsia por Li-pilo, após receberem diazepam, foram divididos em: Pilocarpina (n=100), e grupo controle (n=15). Aos 22 dias após o SE os animais do pilocarpina foram divididos em dois subgrupos um que recebeu o transplante das CMO (n=50) e outro que recebeu o transplante de solução salina (n=50).

As CER foram avaliadas com células de medula óssea de dois tipos diferentes de doadores. **Experimento 1:** animais epiléticos que receberam o transplante das CMO de ratos (epiléticos-CMO-r, n=8) e epiléticos que receberam o transplante de solução salina [(controle), (epiléticos-r, n=6)]. **Experimento 2:** animais que receberam no transplante CMO de camundongos EGFP (epiléticos-CMO-m, n=23), animais que receberam no transplante solução salina (epiléticos-m, n=23) e nestes grupos foi avaliado as crises classe V da escala de Racine. Animais do grupo controle-salina que receberam transplante de CMO de camundongos EGFP (controle-salina-m, n=4), (Figura 7).

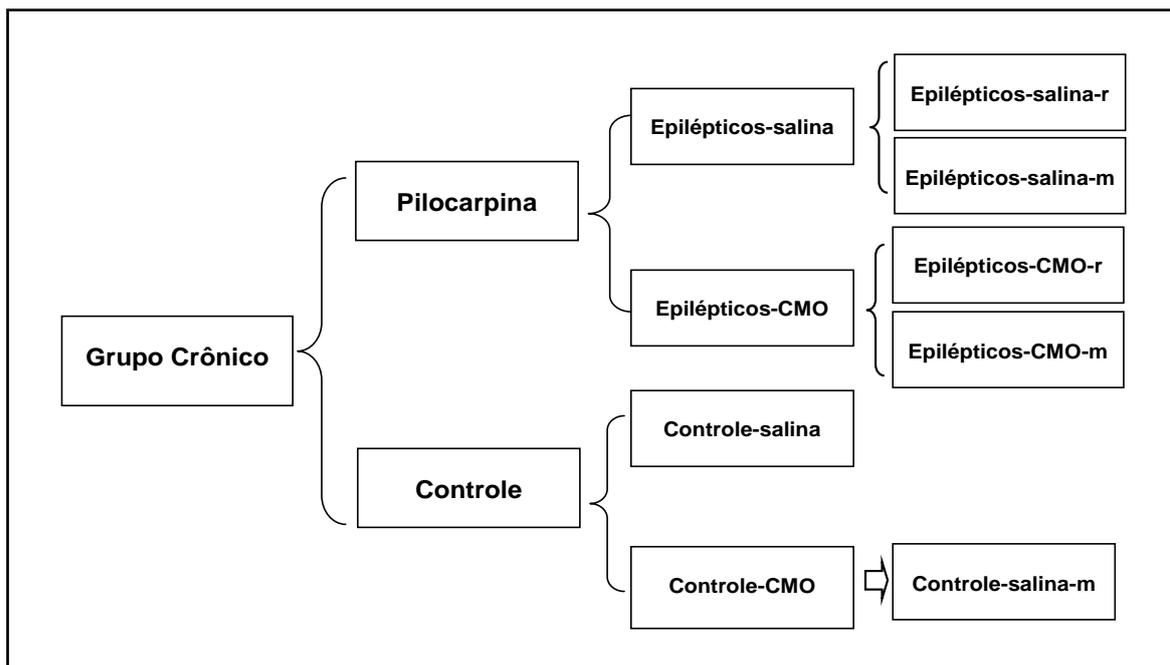


Figura 7 – Esquema com os grupos experimentais do grupo crônico. Na indução da SE: Pilocarpina são animais que receberam Li-pilo e Controle são animais que receberam solução salina. No transplante: Epilépticos-CMO-r (receberam células mononucleares da medula óssea de ratos Wistar), Epilépticos-CMO-m (receberam células mononucleares da medula óssea de camundongos transgênicos EGFP), e Epilépticos-salina (receberam solução salina). Controle-salina (receberam solução salina) e Controle-CMO-m (receberam células mononucleares da medula óssea de camundongos transgênicos EGFP).

Aos 45 dias de transplante das CMO e /ou solução salina os animais do experimento 2 foram sacrificados para diferentes protocolos experimentais: migração celular por imunofluorescência, atividade elétrica (LTP), contagem celular, e brotamento das fibras musgosas, (Figura 8).

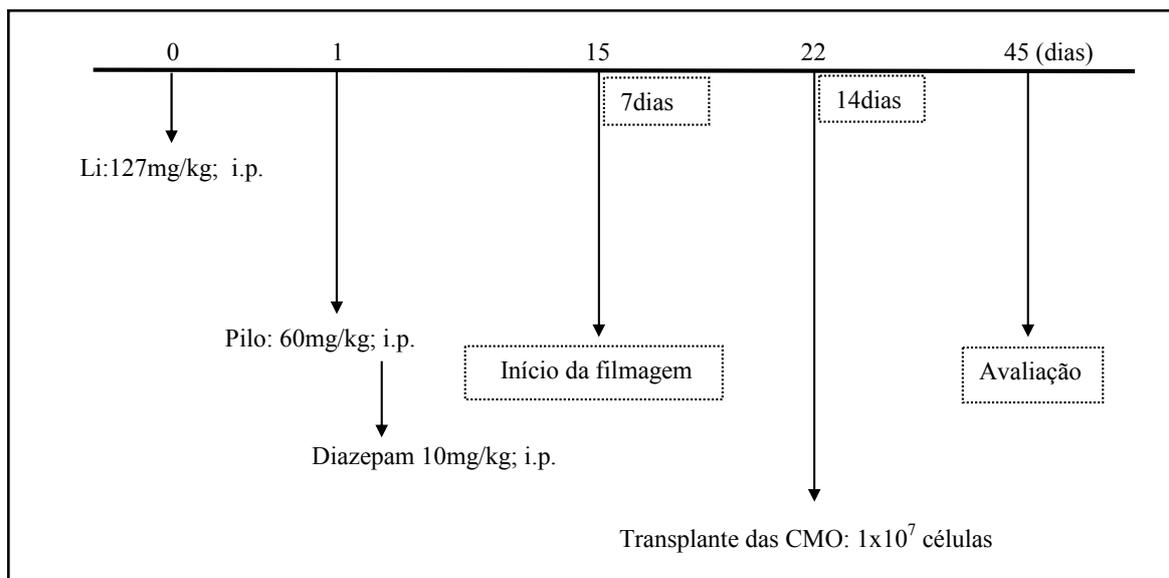


Figura 8- Esquema do delineamento experimental do grupo Crônico Li: lítio, Pilo: pilocarpina, SE: *status epilepticus*, CMO: células mononucleares da medula óssea, i.p.: intraperitoneal. Avaliação: das crises, da migração celular por (imunofluorescência), da atividade elétrica (LTP), quantificação celular e brotamento neuronal.

### I.3 Indução da epilepsia pelo modelo lítio e pilocarpina

Em ambos os experimentos no grupo A, os animais receberam cloreto de lítio na dose de 127mg/Kg 20-24 horas antes da administração da pilocarpina e receberam uma dose de metilescopolamina (MS) (1mg/kg em 0.9% de NaCl) injetada intraperitonealmente (i.p), 30 minutos antes da administração da pilo, que induz o SE. O pré-tratamento com metilescopolamina foi aplicado com o objetivo de atenuar as manifestações periféricas da pilocarpina. Decorridos 30 minutos da administração da metilescopolamina, o grupo epiléptico recebeu 60mg/kg de cloridrato de pilocarpina via i.p, conforme protocolo publicado (CLIFFORD et al., 1987), o início do SE foi considerado quando os animais atingiram grau V da escala de Racine (RACINE, 1972), seguida de convulsões tônico-clônicas sustentadas por mais de cinco minutos. A partir deste momento iniciou-se a

observação comportamental destes animais que permaneceram em caixas de acrílico transparentes.

Aproximadamente 90 minutos após a instalação do SE, (PRIEL et al., 1996), foi injetado 10mg/kg de diazepam i.p. para interromper as crises (MELLO, 1993). Os animais ainda receberam uma dose de soro fisiológico e nos dois dias seguintes foi adicionado banana esmagada na dieta alimentar para a reposição do potássio.

Grupos B, os animais dos grupos controle receberam tratamento semelhante, porem foi substituída a pilocarpina por uma dose de solução salina.

#### **I.4 Obtenção e preparo das células mononucleares da medula óssea**

A GFP tornou-se, nos últimos 10 anos, uma das proteínas mais importantes na biologia molecular, pois se tornou uma valiosa ferramenta como marcador para expressão gênica intra e extracelular em organismos desde bactérias até camundongos transgênicos.

Para obtenção das células de MO foram utilizados camundongos transgênicos com idade entre 30 e 60 dias que expressam a proteína EGFP (n=58). As células da MO foram obtidas do fêmur, tibia e úmero e preparadas para o transplante, como segue: os animais doadores de MO foram anestesiados com 200 µl de uma solução contendo 0,8% de ketamina e 0,2% clorpromazina, e sacrificados através de deslocamento cervical.

A MO foi mobilizada com agulha fina, lavada com uma pequena quantidade de PBS heparinizado e, seqüencialmente passada através de agulhas 12 e 22g para produzir uma suspensão de células individuais.

As células da MO foram separadas, por centrifugação, em gradiente de densidade usando Histopaque®-1077 e 1119, 1:1 (Sigma, St. Louis, USA). Para tanto, as células da

medula óssea foram ressuspensas com 2 ml de meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Media*; Invitrogen, USA), colocadas sobre 2ml de Histopaque® e centrifugadas (MSE Mistral 2000, USA) a 400g, durante 30 minutos em temperatura ambiente. A camada de células mononucleares foi retirada e lavada com 10 ml de PBS (*Dulbeccos Phosphate Buffered Saline*; Invitrogen, USA) e centrifugada a 1.500 rpm, por 3 minutos. As células foram ressuspensas em 1mL de DMEM e contadas em hemocítômetro (Optik Labor, USA). A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão com azul tripan. Estas células ( $1 \times 10^7$  células em 100  $\mu$ l) foram injetadas na veia da cauda dos animais dos distintos grupos de estudo (Figura 9). Também foram obtidas células de MO de ratos Wistar utilizando-se a mesma técnica.

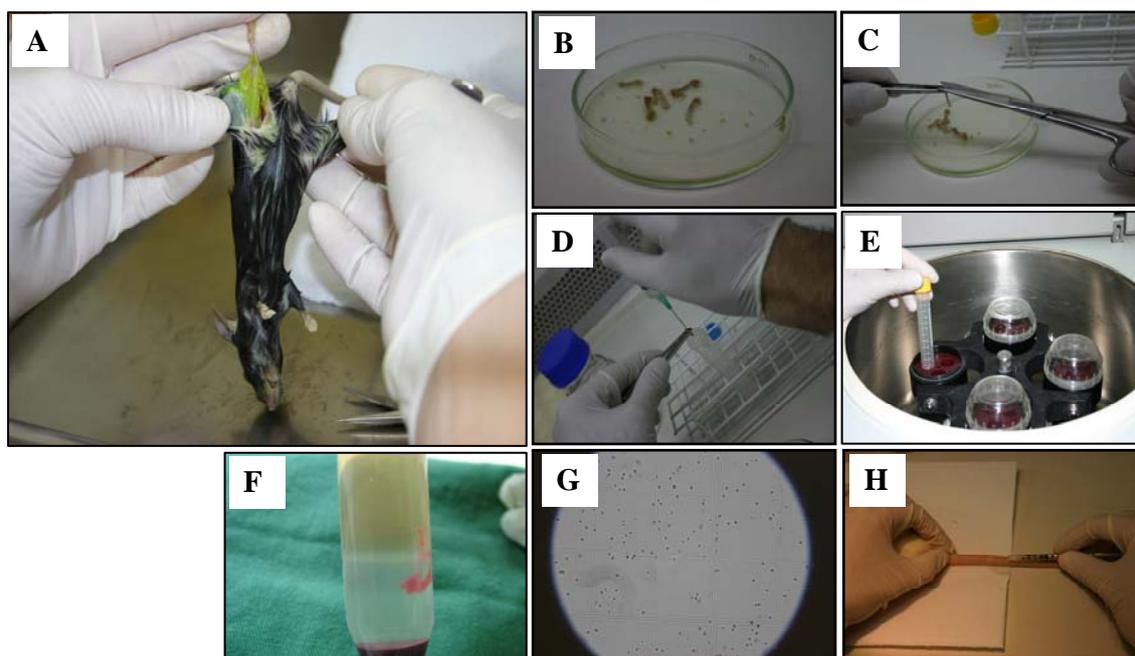


Figura 9 – Ilustração dos passos para obtenção e preparo das células-tronco da medula óssea: separação dos ossos longos do animal (**A e B**), corte das epífises e lavagem em PBS (**C**), separação das células mononucleares (**D**), separação da camada mononuclear (**F**), contagem e viabilidade celular (**G**) e o transplante pela veia da cauda (**H**).

### I.5 Controle das crises

Para avaliar o efeito do transplante das CMO sobre as CER foram analisadas as manifestações comportamentais dos animais. Para a vídeo-monitoração foi usada uma câmara sensível a luz preta e branca (Sony, Brasil) que filmava até 16 ratos simultaneamente durante um período de 12 horas por dia (6 hs claro/escuro). Foram analisadas as crises com manifestações visíveis e graduadas conforme Racine (1972), (Figura 10).

Nos grupos agudo e crônico, foi quantificado o número de crises classe V de Racine por dia e a duração de cada uma (em segundos) nos animais epiléticos e transplantados com CMO e/ou com solução salina. As observações foram realizadas por 2 observadores independentes e cegos para o tipo de tratamento.



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

### **I.6 Perfusão e fixação para o estudo de imunofluorescência e perda neuronal**

Animais dos grupos agudo e crônico foram perfundidos para os procedimentos de imunofluorescência 24 horas, 3, 5, 10 e 120 dias após SE (grupo agudo) e 45 dias após transplante (grupo crônico). Para a técnica de Nissl aos 10 e 120 dias após SE (grupo agudo), e 45 dias após o transplante (grupo crônico). Os animais foram anestesiados completamente com Tiopental (40mg/kg i.p) e transcardialmente perfundidos com 200 ml de salina 0,9% seguida de 500 ml de paraformaldeído 4% diluído em tampão fosfato 0,1 M (PB) e pH 7.4. Os encéfalos foram cuidadosamente retirados e pós-fixados na mesma solução por 24 h em temperatura ambiente, e mais 24 h em PBS com 30% de sacarose, e então, foram congelados em nitrogênio líquido (-70°C) para posterior utilização (Figura 10).

### **I.7 Análise histopatológica**

Para estimar as alterações volumétricas induzidas pela epilepsia nas regiões CA1, CA3 e hilo do GD e a possível reposição neural induzida pelas CMO nas regiões hipocâmpais lesadas pelo evento epiléptico, fatias hipocâmpais de ratos dos grupos agudo e crônico foram corados pela técnica de Nissl conforme protocolo descrito abaixo.

Após os animais serem perfundidos, os encéfalos foram fatiados no criostato em secções de (30 µm) e colocados em lâminas histológicas. As lâminas foram hidratadas em soluções decrescentes de álcool (absoluto, 80%, 70%) e água destilada, e colocadas em uma solução de violeta de cresila 0,01% acetificado durante aproximadamente 1 minuto, depois foram desidratados em uma solução crescente de álcool a (70%, 80, absoluto %) e clareados em xilol, por último cobertos com lamínulas com resina Dammar (Figura 11e 12A).



Figura 11 – Fotos ilustrativas dos procedimentos de: cirurgia para realizar a perfusão dos animais, como parte do protocolo realizado para histoquímica de Nissl, e imunofluorescência. Em (A) soluções (1), bomba de perfusão (2) e as setas indicam cânula inserida na artéria aorta através do coração. Momento em que os encéfalos foram congelados em  $-70^{\circ}\text{C}$  (B). Em C e D, vemos o fatiamento do encéfalo no criostato.

### I.8 Estimativa da densidade neuronal

No **grupo agudo** a estimativa da densidade neuronal foi realizada pelo método do disector óptico; (STERIO, 1984; GUNDERSEN, 1988; CRUZ-ORIVE, 1997; INSAUSTI et. al., 1998). Onde as secções analisadas foram divididas em quadrados de igual tamanho, e um a cada quatro quadrados foi analisado ao longo do eixo Z [figuras 12 A (D) e 12B (A)]. Foi determinado um ponto superior da secção denominado *look-up* e um ponto inferior da secção denominado *look-down*. À distância, entre o *look-up* e o *look-down* determinou a altura do disector óptico (h). No espaço compreendido, dentro do quadrado analisado entre o *look-up* e o *look-down*, foi feito um escaneamento com o microscópio óptico, sendo que cada nucléolo identificado ao longo do escaneamento foi representativo de um neurônio. Os nucléolos (neurônios), que tocassem o limite superior e lateral direito do quadrado analisado foram descartados da amostra.

A estimativa da densidade neuronal foi realizada a partir da equação:  $N_v = (1/a * h) * (\sum Q_- / \sum P_-)$ ; onde:  $N_v$  = Densidade numérica estimada;  $a$  = Área do quadrado;  $h$  = Altura do disector óptico;  $\sum Q_-$  = número total de neurônios contados na amostra;  $\sum P_-$  = número total de quadrados utilizados. (STERIO, 1984; GUNDERSEN 1988; CRUZ-ORIVE 1997; INSAUSTI al., 1998). O coeficiente de erro do método de Cavalieri foi calculado.

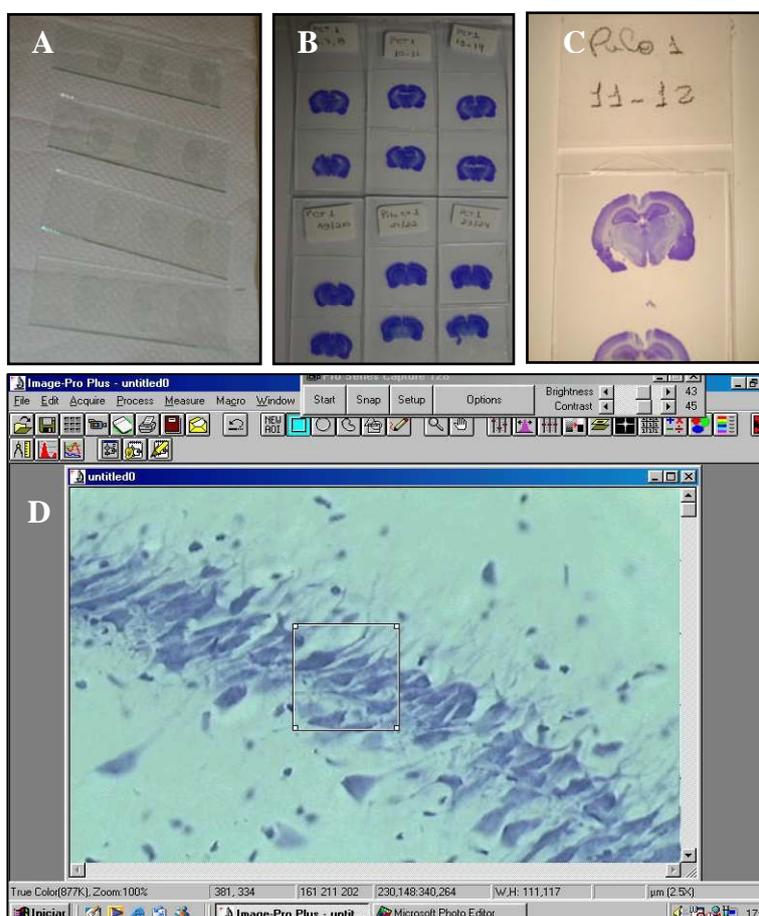


Figura 12A – Ilustração de lâminas preparadas e posteriormente coradas pela técnica de Nissl (A - C) e como foi realizada a contagem neuronal do grupo agudo (D).

No **grupo crônico**, as fatias cerebrais foram submetidas à quantificação dos núcleolos das células íntegras, com o auxílio de uma lente quadriculada acoplada à ocular

do microscópio. Os nucléolos (neurônios), que tocassem o limite superior e lateral direito do quadrado analisado foram descartados da amostra.

Os nucléolos corados pela técnica de Nissl foram quantificados em um aumento de 40X no hipocampo dos dois hemisférios em três secções de cada animal e em três níveis ao longo do eixo longitudinal. As regiões hipocâmpais quantificadas foram CA1, e hilo do giro denteado, [Figura12B (B)]. As lâminas foram avaliadas em um microscópio Olympus AX 70 com sistema computadorizado de análise de imagem do NIH (National Institute of Health) acoplado a um computador Macintosh 8600/200.

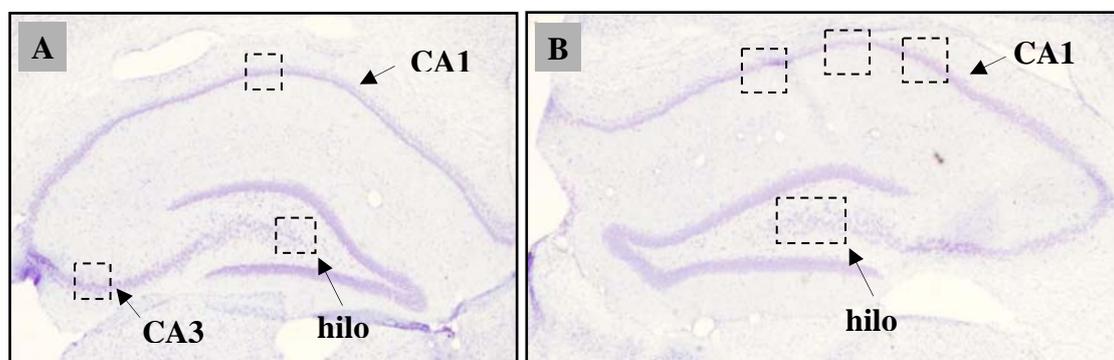


Figura 12B – As fotos ilustram fatias coradas com Nissl e as regiões que foram analisadas, no grupo agudo um quadrado de  $800\mu\text{m}^2$  em CA1, CA3 e hilo do GD (A). No grupo Crônico foram avaliados três quadrados de  $24000\mu\text{m}^2$  na região de CA1 e um quadrado de  $96000\mu\text{m}^2$  no hilo do GD (B).

### I.9 Estimativa de volume

A estimativa do volume das diferentes regiões hipocâmpais foi obtida pelo princípio de Cavalieri (CRUZ-ORIVE 1997; INSAUSTI et al., 1998; RODRIGUES et al., 2004). Todas as secções foram analisadas no sentido rostral-caudal, em um microscópio Nikon eclipse E-600 acoplado ao sistema de análise de Imagens Image-Pro Plus 4.6. Em uma a cada 4 imagens de secções obtidas foi realizada a medida da área (A) de cada região, sendo que a estimativa do volume foi obtida pela equação:  $V(est) = T * \sum A$ ; onde:

$V(est)$  = Estimativa do volume;  $T$  = Distância entre as secções analisadas;  $\sum A$  = Soma das áreas (CRUZ-ORIVE 1997; INSAUSTI et al., 1998; RODRIGUES et al., 2004). O coeficiente de erro do método de Cavalieri foi calculado pela fórmula proposta por García Fiñana (GARCIA & FIÑANA F., 2000), (Figura 13).

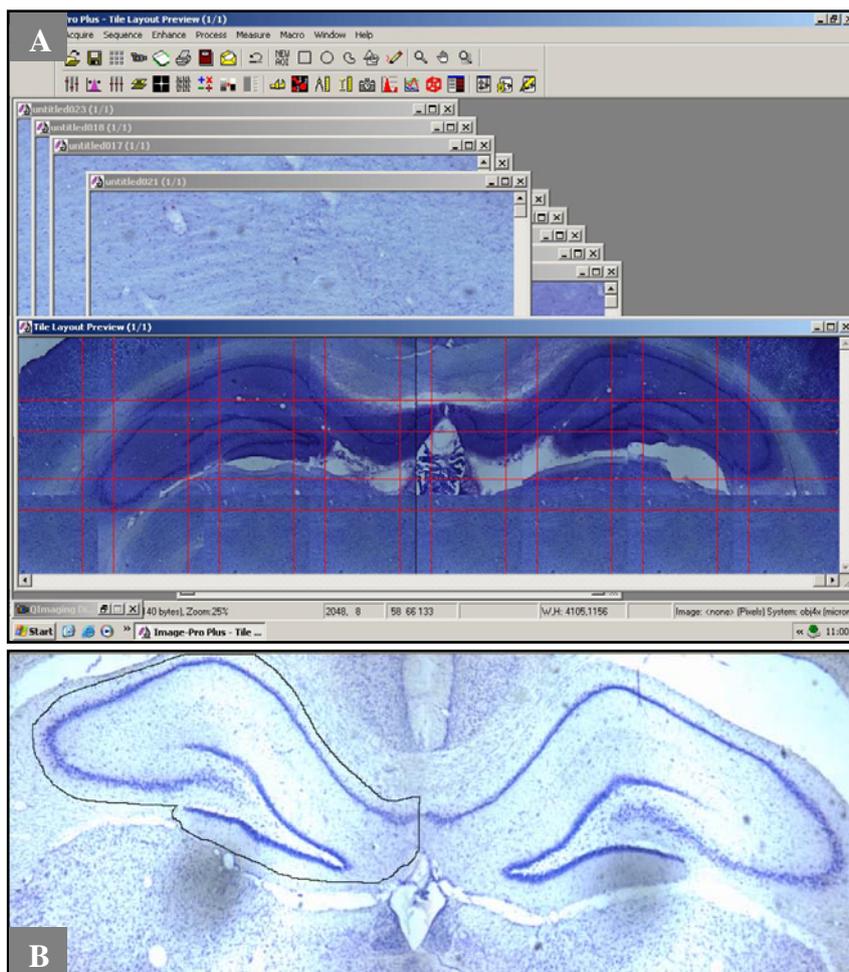


Figura 13 - Vista geral da montagem da figura no microscópio para posterior medição (A), imagem ilustrativa de como foi realizado o delineamento do hipocampo para o cálculo do volume (B).

### I. 10 Estudo do brotamento neuronal pela técnica de Neo-Timm

Para a coloração Neo-Timm os animais foram perfundidos com tampão Millonig [12M, pH 7.4, 25ml por animal), seguido de sulfeto de sódio (0,1%, pH 7.4, 50 ml por animal em 3 minutos), e por glutaraldeído (3%, pH 7.4, 100 ml por animal por 7 minutos)

e novamente pela solução de sulfeto de sódio (200ml por 17 minutos). Após a perfusão, os cérebros foram retirados e imersos em solução de sacarose a 30% em PBS por 24 horas, e então foram cortados em secções coronais de 40 $\mu$ m, montados em lâminas e deixados para secar. Posteriormente, as lâminas foram imersas em uma solução reveladora à 21°C composta por: goma arábica diluída em água destilada (500g para 1 litro de água), solução A: ácido cítrico, citrato de sódio e água destilada (para 40ml: 10,25g, 9,45g e 30ml, respectivamente) e solução B: hidroquinona e água destilada (para 60ml, 3,73ml e 60ml, respectivamente).

As lâminas foram colocadas em dois “carrinhos” dentro de balsas de vidro e foram retiradas as alças de metal (para não interferir a reação). Foram misturadas em um recipiente 240 ml de Goma Arábica e a solução A e B. As balsas foram colocadas em uma bandeja com água fria (18°C). Em uma câmara escura foi acrescentado 2ml do nitrato de prata (0,51g previamente diluído em 3ml de água destilada). A solução foi adicionada nas balsas até que as lâminas fossem totalmente cobertas e mantidas no escuro por 30 a 60 minutos. Após as lâminas foram retiradas da solução e a reação foi interrompida por lavagem com água destilada por 10 minutos. Em seguida foram desidratadas por (álcool a 70%, 95% e absoluto, seguido de xilol) e montadas com lamínulas com bálsamo do Canadá.

Foi avaliada a intensidade da coloração da camada molecular interna (IML) do giro denteado através de uma escala de graduação (TAUCK & NADLER, 1985):

- (0) nenhuma marcação de fibras musgosas na IML
- (1) marcação fraca e esparsadas fibras musgosas na IML
- (2) marcação moderada e contínua das fibras musgosas na IML
- (3) marcação intensa das fibras musgosas na IML

O brotamento das fibras musgosas na IML foi avaliado por dois observadores independentes, “cegos” à condição experimental de cada animal. Os valores dados intragrupos jamais variaram mais que um nível entre si, tendo, portanto um alto grau de concordância, e demonstrando a uniformidade dos critérios adotados. Para os resultados, foi utilizada a média aritmética das notas dadas pelos dois observadores.

### **I.11 Estudo da migração das células mononucleares da medula óssea por imunofluorescência**

Os encéfalos foram aclimatados por 2 horas em (-20°C) e seccionados em criostato (Leica, 1820) a temperatura de -24 °C. No nível 2,8-4,5mm posterior do bregma; (PAXINOS & WATSON, 1986) foram selecionadas 9 secções de cada animal (Li-pilo-CMO n=16, Li-pilo-salina: n=4, controle-salina: n=4, e controle-CMO: n=4) do grupo agudo e (epilépticos-CMO-m, n=6 e controle-salina-m, n=4) do grupo crônico.

As fatias cerebrais foram fixadas em uma solução de paraformaldeído 4% (Sigma, Aldrich) por 10 minutos e lavadas duas vezes em PBS por 5 minutos (cada). As secções foram incubadas com solução livre de proteína (Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca) para bloqueio das reações não-específicas por 10 minutos. Na seqüência, as fatias foram incubadas com avidina/biotina (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) e posteriormente foram incubadas com anticorpo primário *overnight* a 4°C, a solução continha o anticorpo nuclear anti-neuronal biotinilado (NeuN, 1:50, Chemicon International, Temecula, CA, USA), anti-CD11b (1:50, Pharmagen), guinea pig anti-doublecortina (1:50, Chemicon International, Temecula, CA, USA), e coelho anti- GFAP (1:50, Santa Cruz Biotechnology). Antes da incubação do segundo anticorpo, as secções foram lavadas duas vezes (5 minutos cada) em PBS *Tween* 0,05% e novamente em PBS.

Em seguida, as secções foram incubadas com os anticorpos secundários coelho anti-GFP conjugado com Alexa-fluor 488 (1:50, Molecular Probes), ou estreptavidina conjugada com Alexa-Fluor 568 (1:100, Invitrogen-Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA), cabra anti-coelho IgG conjugado com Alexa Fluor 488 (1:100, Molecular Probes) e cabra *anti-guinea pig* IgG com Alexa Fluor 568 (1:100, Molecular Probes) por 1 hora em temperatura ambiente. As secções foram lavadas mais duas vezes por 5 minutos em PBS *Tween* 0,05% e lavadas com PBS. Por fim, as secções foram montadas com meio de montagem contendo marcador nuclear [DAPI, 4',6-diamino-2-phenylindole ou TO-PRO (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA)].

A presença das células fluorescentes foi determinada por observação no microscópio BX61 (Olympus, Tokyo, Japão) usando filtros adequados. As imagens foram capturadas usando uma câmara digital colorida *SPOT flex* (15.2, 64 Mp, Shifting Pixel, Diagnostic Instruments Inc, Sterling Heights, MI, USA).

## **I.12 Estudo eletrofisiológico**

Animais do grupo agudo e crônico foram sacrificados e o encéfalo foi removido e seccionado para o estudo eletrofisiológico. Os animais foram pesados e anestesiados com Thiopental (40mg/Kg) imediatamente antes de serem decapitados com uma guilhotina especial para este fim. Após a decapitação o cérebro removido e imerso em Líquido Cefalorraquidiano Artificial (LCRa) do tipo dissecação, com oxigenação a temperatura de 4°C. O LCRa é composto por: NaCl:130mM; KCl: 3,5mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1,3mM; MgSO<sub>4</sub>: 5mM; CaCl<sub>2</sub>: 0,2mM; NaHCO<sub>3</sub>: 24mM; D-glicose: 10mM, com pH de 7.4.

Foram realizados cortes axiais de 400 µm com auxílio de um vibrátomo (Vibroslice modelo 1752 M – *Campden Instrumensts*, EUA). As fatias permaneceram em

descanso por 60 minutos antes do registro eletrofisiológico, no Líquido LCRA do tipo normal, composto por: NaCl: 130mM; KCl: 3,5mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1,3mM; MgSO<sub>4</sub>: 2mM; CaCl<sub>2</sub>: 2mM; NaHCO<sub>3</sub>: 27mM; D-Glicose: 10mM, com o pH de 7.4. Posteriormente, foram levadas a cuba de registro eletrofisiológico, sob oxigenação e temperatura controlada (34°C) (SALAMONI et al., 2005) (Figura 14).

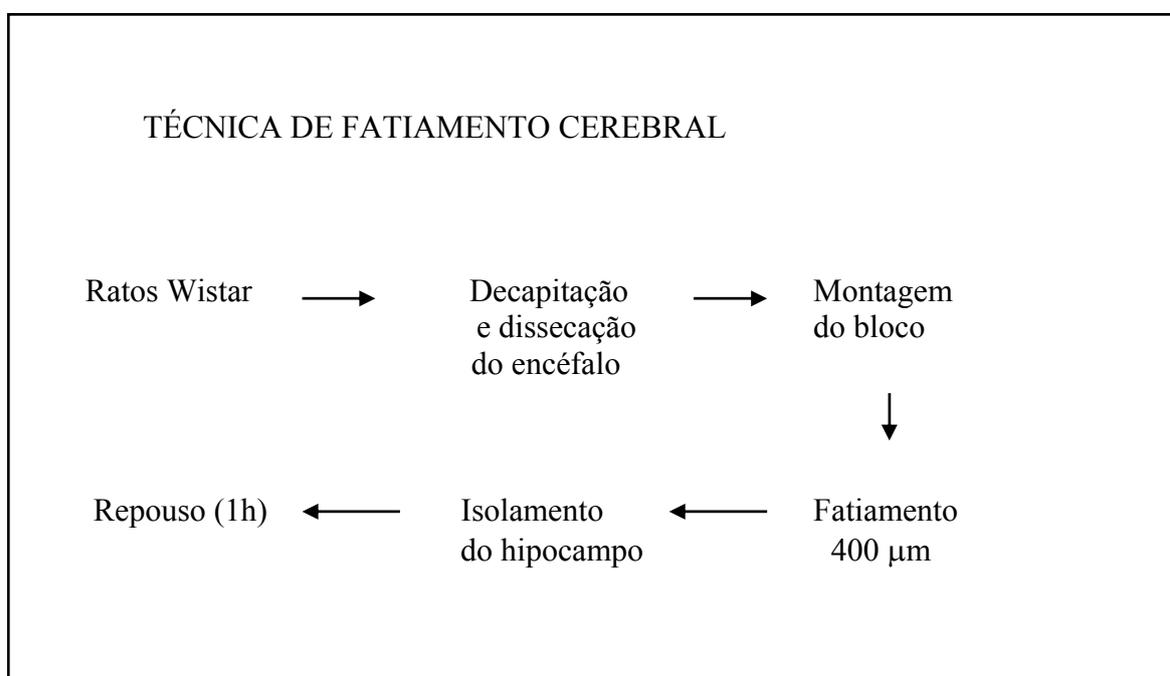


Figura 14- Protocolo do fatiamento cerebral

Para a realização do estudo eletrofisiológico utilizou-se: câmara de perfusão e registro, onde foi posicionada a fatia; micromanipuladores do tipo manual e motorizado MP285 (*Sutter Instrument Company*) para o adequado posicionamento dos eletrodos de registro e de estímulo; um gerador de pulso programável Master 8 (*A.M.P. Instruments Ltd.*, EUA); pré-amplificador diferencial (*Headstage, Axon Instruments Inc.*, EUA); condicionador de sinais CyberAmp 320 (*Axon Instruments Inc.*, EUA); fixador de corrente

AxonClamp 2B (*Axon Instruments Inc.*, EUA); conversor analógico digital Digidata 1322A (*Axon Instruments*); microcomputador; Software AxoScope9 para o registro do sinal obtido; Software *Clampfit 9* para a análise da resposta e o Software *Origin* versão 5.0 (*Microcal Software*, EUA) para a análise estatística dos dados e construção dos gráficos (Figura 15 e 16).

Para a adequada visualização da fatia hipocampal e suas regiões utilizou-se sobre a cuba um microscópio de mesa (UM m 19 D.F. Vasconcellos). Para impedir a ocorrência de ruídos eletromagnéticos, 60Hz da rede elétrica, foi realizado o isolamento com a gaiola de Faraday, bem como a utilização de uma mesa com sistema antivibracional para evitar a trepidação durante o registro.

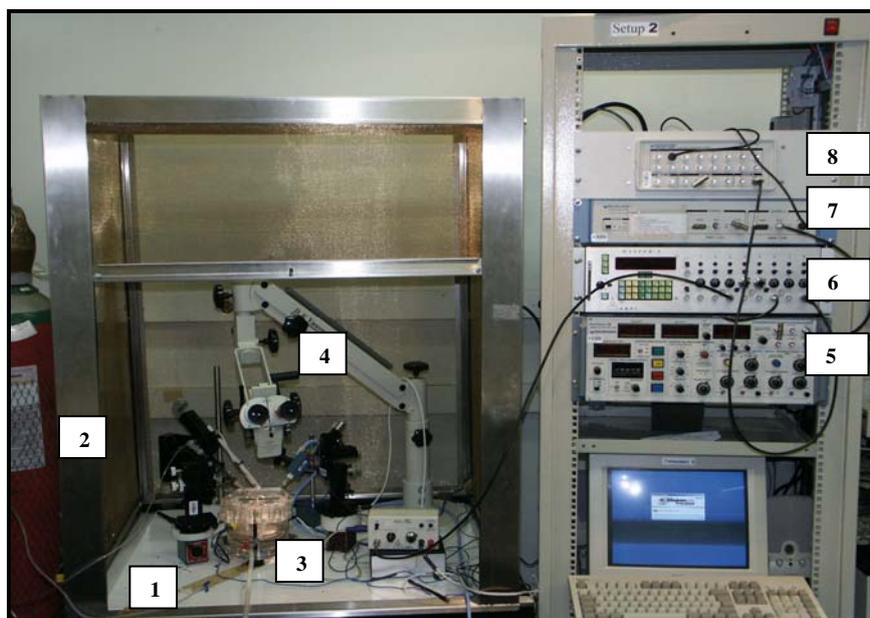


Figura 15 – Equipamentos para o registro eletrofisiológico: mesa antivibracional (1), gaiola de Faraday (2), câmara de registro (3), microscópio de mesa (4), amplificador Axoclamp 2B (5), Master 8 (6), CyberAmp 320(7), e Digidata 1322 A (8).

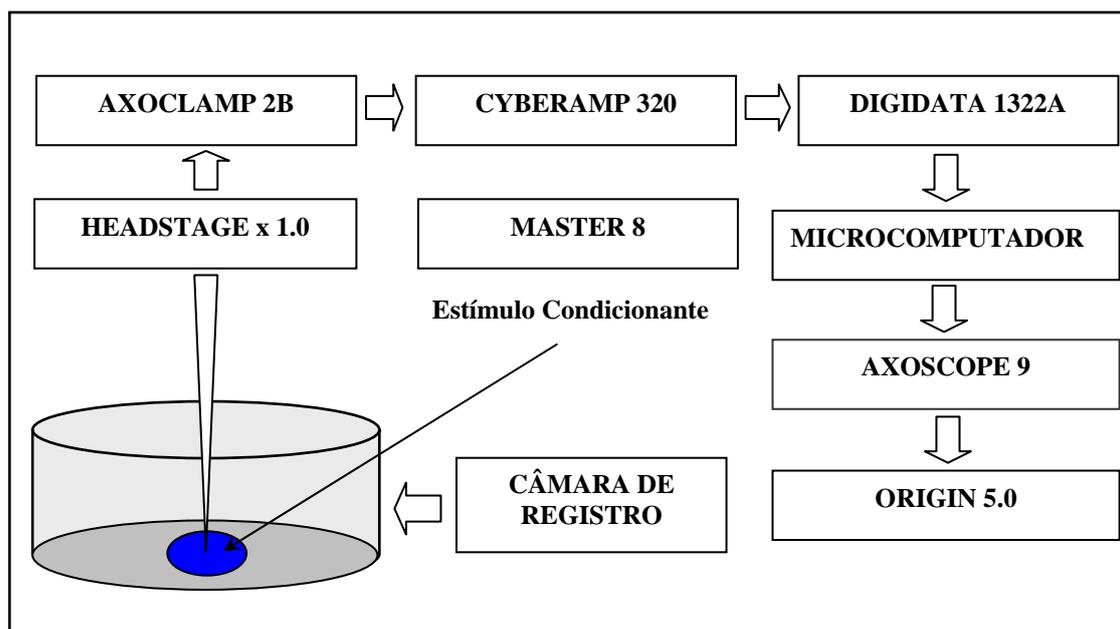


Figura 16 – Equipamentos utilizados para a obtenção do registro eletrofisiológico do potencial excitatório pós-sináptico controle (PEPSC) e indução da LTP em ordem de utilização. Sobre a fatia hipocampal (em azul), são aplicados estímulos elétricos a partir de um gerador de pulso programável (Master 8). O sinal obtido pela micropipeta, na câmara de registro, é amplificado pelo pré-amplificador diferencial Headstage x10, sendo a corrente fixada pelo Axoclamp 2B. Através do CyberAmp 320, os sinais são condicionados para serem convertidos do sistema analógico para o sistema digital pelo Digidata 1322A. A partir daí, estes são identificados pelo microcomputador, no qual é apresentada os valores mensurados através do software Axoscope 9. Para a construção dos gráficos referentes ao tempo total de registro utilizamos o software Origin 5.0.

Para a realização do protocolo de indução de LTP, o eletrodo de estímulo, um microeletrodo bipolar de platina-irídio (diâmetro interno de  $75\mu\text{m}$  e externo de  $140\mu\text{m}$ ) foi posicionado na colateral de *Schaffer*. A micropipeta de registro posicionada na região do *stratum radiatum* de CA1 do hipocampo foi confeccionada com a utilização do estirador de micropipetas MP-87 (*Sutter Instruments Company*), a partir de um capilar de borossilicato com diâmetro externo de  $1,5\text{mm}$  e interno de  $1,12\text{mm}$ , posteriormente preenchida com LCR normal (Figura 17 e 18). A Impedância das micropipetas situa-se entre  $0,1\Omega$  e  $10\text{M}\Omega$ .

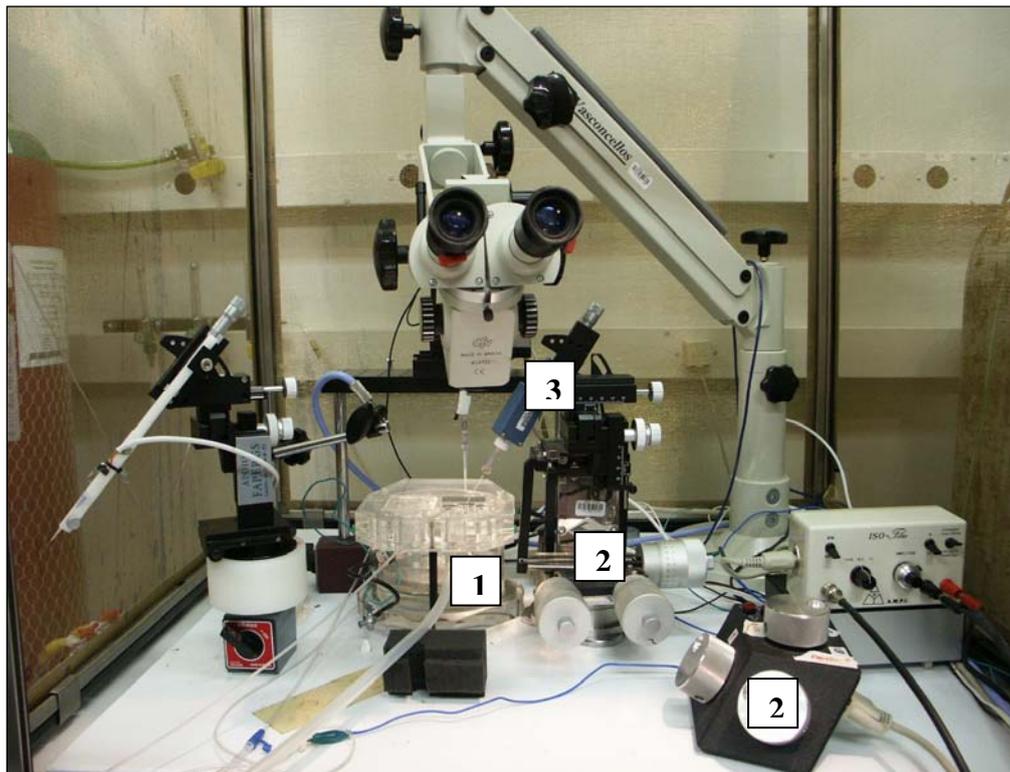


Figura 17 - Câmera de registro e micromanipuladores: câmara de registro eletrofisiológico (1), micromanipuladores (2) e o circuito microamplificador (*headstage*) (3).



Figura 18 - Câmera de registro eletrofisiológico: eletrodo de estímulo (1), eletrodo de registro (2) e fatia hipocampal de rato (3).

Após o adequado posicionamento dos microeletrodos, foi produzida uma curva de amplitude de resposta pós-sináptica evocada (mV), em função da intensidade de estímulo



Para todos os registros deste estudo, a totalidade dos dados quantitativos referentes à expressão da LTP após o estímulo de alta frequência, foi representada nos gráficos como porcentagem do controle-salina, sendo este determinado como média das respostas registradas durante o período estável (10 minutos), previamente ao estímulo (Figura 20). Define-se como período estável, quando a amplitude do PEPS permanece constante ao longo do tempo.

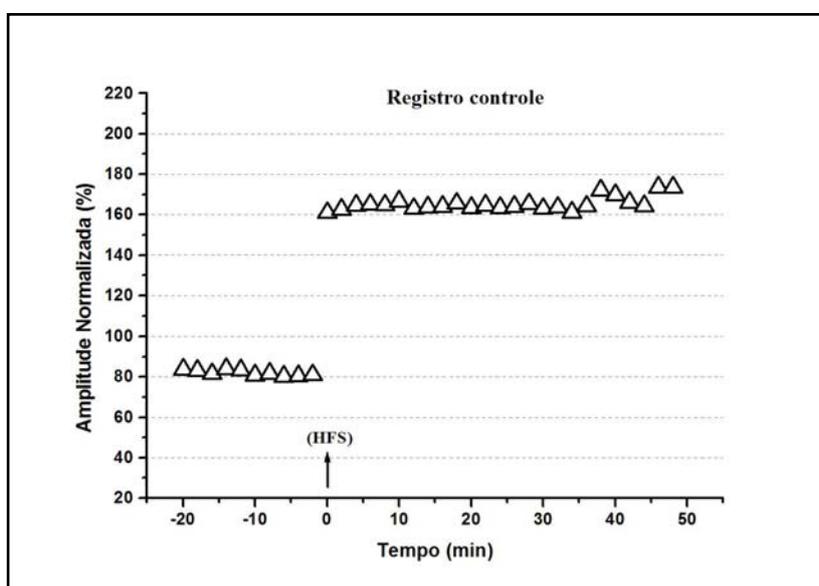


Figura 20 - Demonstração de um período estável (pré-estímulo de alta frequência) de um registro eletrofisiológico. A seta indica a representação temporal no instante de aplicação do estímulo de alta frequência (HFS) e a barra representa o período estável (a amplitude do PEPS permanece constante).

Foi realizada a análise da amplitude do PEPS pelo Software *Clampfit 9*. Define-se como amplitude do PEPS a distância vertical, em milivolts (mV), existente entre a linha de base da resposta previamente ao estímulo e o pico mais negativo após o estímulo, (Figura 21).

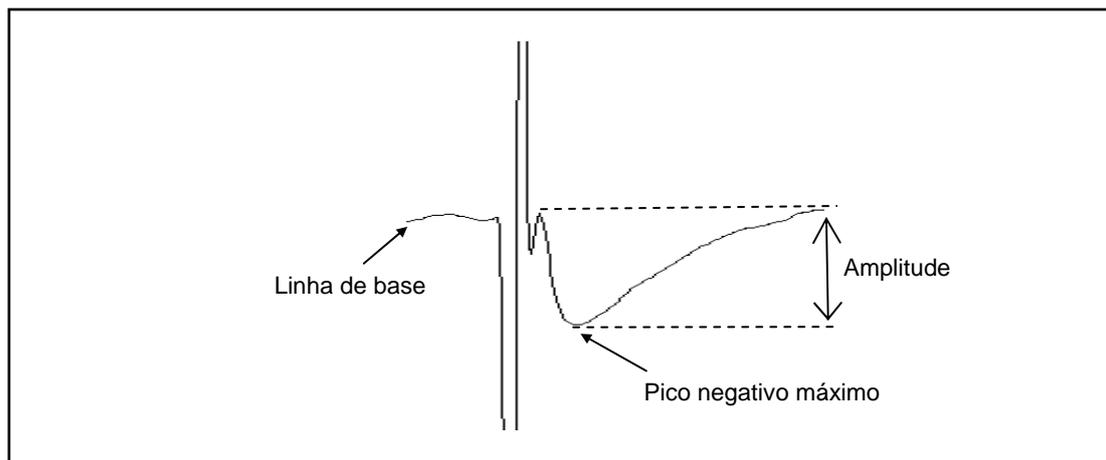


Figura 21- Parâmetros para o calculo de amplitude.

### I.13 Versão espacial do labirinto aquático de Morris (LAM)

O aprendizado pode ser mensurado observando a mudança de desempenho numa tarefa através do treino repetitivo, o que pode ser observado nas suas “curvas de aprendizado” (STEWART & MORRIS, 1993).

Dentre os diversos procedimentos e aparelhos desenvolvidos para avaliar o desempenho de animais em labirintos, o teste de aprendizagem espacial no labirinto aquático, introduzido em 1981 por Richard Morris (MORRIS et al., 1982), vem se destacando nos estudos da memória (GALLAGHER et al., 1993). Neste teste os animais, por exemplo, podem aprender as relações espaciais que existem entre os objetos do ambiente e utilizar essas relações para formar um mapa cognitivo espacial, que é utilizado para encontrar o local desejado.

O tratamento com lítio e pilocarpina leva a atrofia hipocampal e, sabido é 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 (O'KEEFE & NADEL, 1978).

Nesta tarefa o animal aprende a localizar uma plataforma submersa numa piscina utilizando, para isto, dicas espaciais distribuídas na sala de treino. Supõe-se que durante o aprendizado desta tarefa o animal forma um mapa cognitivo do entorno que lhe permite achar a plataforma que fica armazenada como engrama em neurônios hipocampais conhecidos como células de lugar. É bastante provável que o deterioro mnemônico produzido pelo tratamento com lítio e pilocarpina seja devido à perda neuronal progressiva que acontece no hipocampo em decorrência das sucessivas crises epiléticas. Se isto fosse efetivamente assim, seria de se esperar que, ao restituir os circuitos neuronais lesados, o tratamento com CMO revertesse à incapacidade dos animais de formar novas memórias. Os animais foram treinados no labirinto aquático de Morris como descrito em Santos, 1999.

Para a realização da tarefa do LAM, utilizou-se um tanque circular preto (180 cm de diâmetro e 55cm de altura) com 25cm de água a 21-24°C (Figura 22). O tanque é virtualmente dividido em quatro quadrantes, sendo que no centro de um desses quadrantes posicionou-se uma plataforma de acrílico pintada de preto, quadrada (20cm de lado), contendo a superfície superior áspera. Esta plataforma encontrava-se fixamente submersa a 1cm abaixo do nível da água.

Dicas visuais, na forma de cartazes com cores e padrões geométricos bastante diferentes, estavam dispostas nas quatro paredes da sala e eram visíveis pelo animal de qualquer ponto dentro do tanque. A exclusão das pistas proximais e ênfase nas pistas distais força o uso pelo rato de estratégias de mapeamento espacial para a localização da plataforma de escape submersa (O'KEEFE & NADEL, 1978).



Figura 22 – A foto ilustrativa do Labirinto Aquático.

### **I.13.1 Treino da versão espacial do Labirinto Aquático de Morris**

O treino consistiu de uma sessão de dezesseis tentativas seqüenciais com teto de 120 segundos cada. O intervalo entre cada tentativa consistia no tempo que o rato permanecia sobre a plataforma, seja após encontrá-la espontaneamente ou após ser conduzido a ela pelo experimentador após o teto. Este intervalo era de 60 segundos após as quatro primeiras tentativas, 40 segundos após a quinta até após a oitava, e de 20 segundos após a nona até após a décima sexta tentativa. Uma tentativa consiste primeiramente em colocar o animal na água com o focinho voltado para a parede da piscina, em seguida, ao ser logo liberado, o animal nadava livremente até encontrar a plataforma submersa, na qual subia como forma de evitar sua permanência na água. Após encontrá-la, o rato permanece sobre a plataforma, de onde pode observar tranquilamente as pistas externas (Figura 22). Quando o animal não encontrava a plataforma até o tempo de teto, era então conduzido cuidadosamente até ela. Em cada tentativa, o animal era largado de uma posição cardinal

(norte, sul, leste ou oeste) diferente, executando largadas cruzadas, isto é, N-S-L-O, S-N-O-L, L-O-N-S ou O-L-S-N, sendo a primeira largada randomizada entre os diferentes ratos. Este procedimento visa a forçar o uso de estratégias de mapeamento espacial (O'KEEFE & NADEL, 1978). A sessão inteira, no caso dos ratos controles, dura aproximadamente 20 minutos.

O teste foi feito 24 horas após o final da sessão de treino, onde o animal era largado de uma única determinada posição, sendo esta a que fosse mais distante do local em que se encontrava a plataforma na sessão de treino.

Durante o teste, a plataforma não estava presente. A medida utilizada como retenção de memória foi à latência de chegada ao local onde se encontrava a plataforma na sessão de treino (latência de escape).

Além da latência de escape, há várias outras medidas que podem ser utilizadas para avaliar a retenção da memória no LAM (STEWART & MORRIS, 1993), como a distância de escape (distância percorrida pelo rato do ponto da largada até o local da plataforma de escape), direcionalidade (ângulo entre a primeira direção de trajeto do animal após a largada, e a direção da reta unindo o local de largada e o local da plataforma), a velocidade de deslocamento, teste de transferência (porcentagem de tempo que o animal permanece no quadrante que contém o local da plataforma em relação ao tempo total da sessão de teste) e número de cruzamentos sobre o local da plataforma durante a sessão de teste. Neste estudo utilizamos a latência de escape por ser a medida mais sensível a lesões ou drogas (STEWART & MORRIS, 1993) dirigidas ao sistema nervoso central.

#### **I.14 Análise do dados e estatística**

Para analisar o efeito das CMO sobre as CER, foi realizada a comparação entre os grupos através do Teste t no grupo agudo e análise de variância de UMA VIA (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Tukey no grupo crônico.

A possível repopulação neural e o volume celular induzida pelo transplante das CMO após SE foi analisada por ANOVA de UMA VIA seguida pelo pós-teste de Tukey.

Para analisar os dados do brotamento neuronal, a comparação entre os grupos Li-pilo foi feita através do teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Para analisar os dados eletrofisiológicos foram utilizados os programas: Axoscope 9; Clampfit 9; Origin 5.0 (Microcal Software, EUA) e para a análise estatística foi realizada através do teste t para os dados brutos (grupos epiléticos versus controle-salina) e ANOVA de UMA VIA seguida pelo pós-teste de Tukey para os dados normalizados.

Para analisar os dados do LAM foi realizada ANOVA de DUAS VIAS seguido de pós-teste de Bonferroni para o treino, e ANOVA de UMA VIA seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls para os dados do treino e do teste da retenção de memória avaliada 24 horas após a última sessão do treino.

Para a análise estatística dos dados, utilizamos o software Graph-Pad Prisma (Versão 4.00, GraphPad Software Inc., EUA). Os dados estão expressos na forma de (média  $\pm$  erro padrão) ou (média  $\pm$  desvio padrão). Valores de  $p$  menores do que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

**CAPITULO II**

**RESULTADOS**

## SEÇÃO I

Nesta seção descreveremos os resultados referentes ao **Grupo Agudo**, animais que receberam o transplante das células mononucleares da medula óssea de camundongos EGFP (C57/BL6), imediatamente após o SE.

## **II.1 Efeito das células mononucleares da medula óssea sobre as crises espontâneas recorrentes em ratos com epilepsia induzida por lítio e pilocarpina**

Durante o SE os ratos que receberam Li-pilo e desenvolveram crises classe V da escala de Racine foram monitorados por 90 min e os que desenvolveram crises em um valor menor na escala foram excluídos. Nos animais utilizados no estudo, observou-se que a média de latência para a primeira crise foi de  $(31.57 \pm 10.41)$ . Os animais dos grupos Li-pilo-salina e Li-pilo-CMO foram vídeo-monitorados em dois períodos de tempo. O primeiro período foi entre os dias 15 e 21 e, o segundo período foi entre os dias 120 e 127 após SE e o transplante. A relação entre a duração do período silencioso, o intervalo entre o SE e a primeira CER não foi observada. Iniciamos a avaliação após 15 dias do SE baseados no trabalho de Priel e colaboradores (1996) que demonstraram, com base em observações de vídeo monitoração, que a média de latência em ratos da mesma idade que utilizamos, ocorre em torno de 18 dias após SE. Em nosso estudo, todos os ratos do grupo Li-pilo-salina desenvolveram CER, sendo que, 80% dos animais apresentaram crises no primeiro dia do vídeo monitoramento, e todos os animais apresentaram CER no segundo dia de observações. No grupo Li-pilo-CMO nenhum animal apresentou CER no primeiro período de observações. Entretanto no segundo período de observações 20% dos ratos Li-pilo-CMO apresentaram CER com frequência e duração menor quando comparada no mesmo período de tempo com o grupo Li-pilo-salina ( $p < 0,0001$ ; Tabela 2).

Tratamento	Período após SE (dias)	Frequência das crises	Duração das crises (s)
<b>Li-pilo-salina (n=10)</b>	15 - 21	1.02 ± 0.72 <sup>a</sup>	41.8 ± 6.83
	120 - 127	1.29 ± 0.84 <sup>a</sup>	40.2 ± 7.11
<b>Li-pilo-CMO (n=10)</b>	15 - 21	zero	N/A
	120 - 127	0.09 ± 0.18 <sup>ab</sup>	21.5 ± 5.25

Tabela 2: Efeito das células de medula óssea sobre as crises de animais epiléticos tratados imediatamente após SE (grupo agudo). Os dados são expressos em  $\text{media} \pm \text{erro padrão}$ . (<sup>a</sup>) são crises espontâneas recorrentes classe V da escala de Racine. (<sup>b</sup>)  $p < 0,0001$ , comparação pelo teste t entre os grupos Li-pilo (tratado com salina versus tratado com CMO).

## II.2 Migração das células de medula óssea EGFP ao cérebro dos ratos epilépticos

Investigamos por microscópio de fluorescência a presença das células GFP<sup>+</sup> no cérebro e nos órgãos dos animais Li-pilo-CMO, animais controle-CMO, assim como, animais do grupo Li-pilo-salina e de animais controle-salina. Sendo que animais do grupo Li-pilo-CMO foram avaliados em vários tempos após SE e transplante (1-3, 5, 10 e 120 dias). Observou-se que nos primeiros dias (1-10 dias após SE) as células GFP<sup>+</sup> estavam presentes e distribuídas por todo o cérebro. Observamos que a quantidade de células era muito pequena e sem predomínio de uma região específica (Figura 23A-D). Entretanto ao avaliarmos as fatias de cérebro dos animais 120 dias após SE observamos que as células predominavam em algumas regiões, formando pequenos *clusters* principalmente no hilo do GD e na região cortical.

Em fatias cerebrais de ratos sacrificados 1-3 dias após SE, observamos que as células GFP<sup>+</sup> eram pequenas, brilhantes e apresentavam uma forma esférica (Figura 23B). Enquanto que nas fatias de animais sacrificados 5 e 10 dias após o SE e transplante, a maioria das células GFP<sup>+</sup> apresentavam forma alongada, e algumas projeções citoplasmáticas (Figuras 23C e D). Em 10 dias após o transplante encontramos células GFP<sup>+</sup> em uma estrutura semelhante ou sugestiva de um vaso (Figura 23H). Assim como, algumas células GFP<sup>+</sup> foram encontradas nos vasos do plexo coróide, e algumas delas expressaram o marcador de microglia (CD11b, Figuras 23E-G). Em fatias cerebrais de ratos com 120 dias de transplante algumas células GFP<sup>+</sup>, em CA1, expressaram o marcador de neurônio jovem doublecortina (DCX, Figura 5 I – 23 I). Assim como, em fatias de 10 (Figura 24A) e 120 (Figura 24B) dias após o transplante algumas células expressaram o marcador de astroglia (GFAP) no córtex entorrinal.

Avaliamos também fatias de cérebro de animais do grupo Li-pilo-salina e controle-salina para distinguir a fluorescência no tecido sem o transplante das CMO-GFP<sup>+</sup>, e para avaliar a “fluorescência própria do tecido”; verificamos que a fluorescência natural de estruturas celulares são distintas e diferentes da fluorescência da proteína GFP. Também avaliamos fatias de cérebro de animais normais que receberam células de medula óssea GFP<sup>+</sup> (controle-CMO), não sendo encontradas células GFP<sup>+</sup> nas fatias cerebrais analisadas (Figura 25).

Finalmente, avaliamos alguns órgãos (baço, coração, pulmão) de alguns animais transplantados, observamos que nos animais epiléticos, independente do tempo de transplante, as células GFP<sup>+</sup> estão presentes em todos os órgãos avaliados, e não foi observada formação de teratomas no tecido (Figura 26).

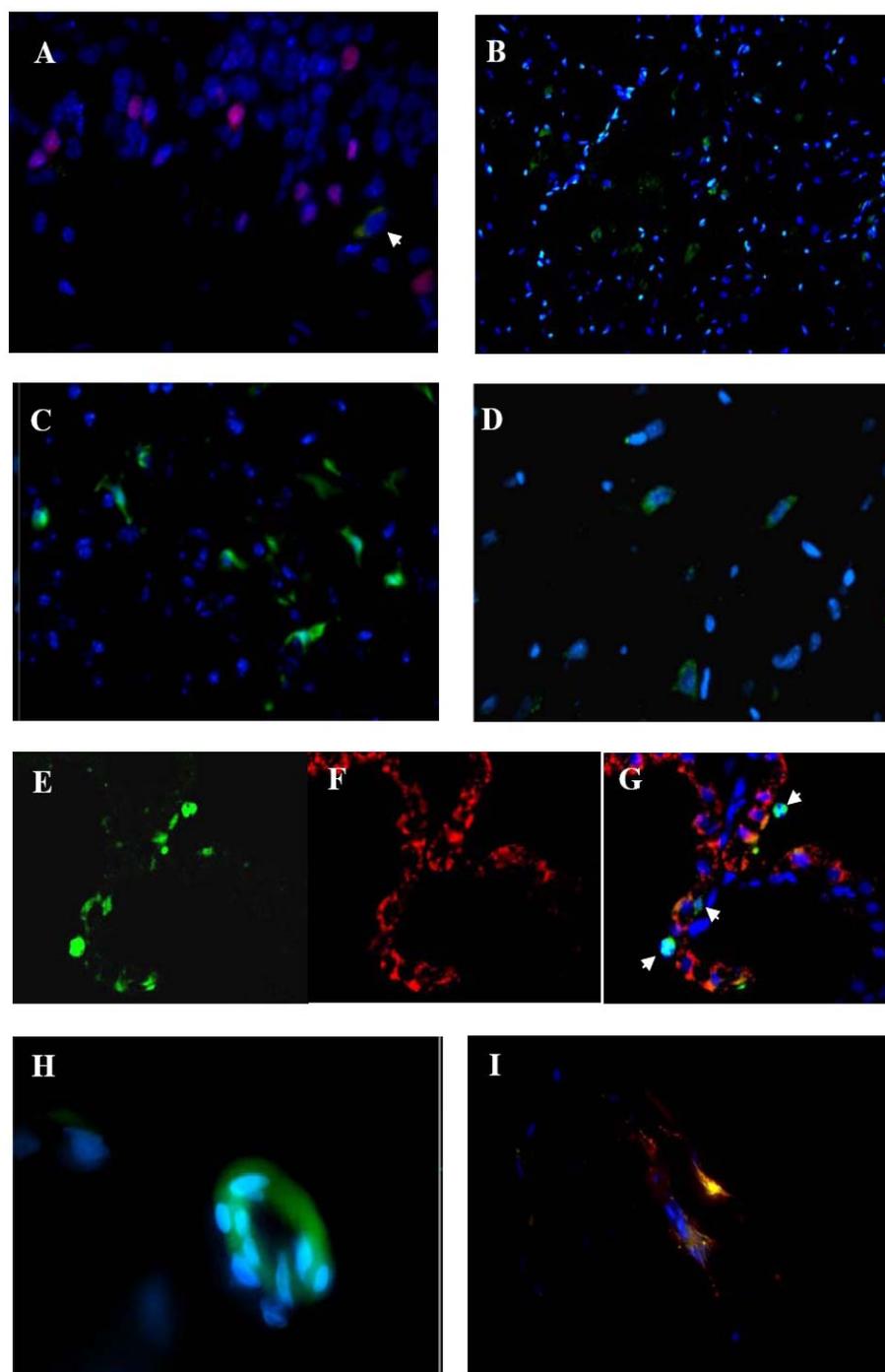


Figura 23 - Painel com microfotografias de células expressando o marcador GFP<sup>+</sup> em fatias de cérebro de animais epiléticos e transplantados com células de medula óssea de camundongos transgênicos C56/B1/6. Na região do giro denteado 24 h após o transplante das CMO, co-expressão com NeuN (vermelho) e as setas indicam o GFP<sup>+</sup> [(verde), (A)]. Na região de CA1, 3 dias após o transplante (B). No hilo do GD, 5 e 10 dias após o transplante, C e D, respectivamente. Na região do plexus 10 dias após o transplante, mostrando as células GFP<sup>+</sup> (E), células expressando o marcador de microglia [CD11b<sup>+</sup>, (F)] e a sobreposição [*merge* (G)]. As setas indicam células GFP<sup>+</sup> e CD11b<sup>+</sup>. Na região de CA3, 10 dias após o transplante das CMO (H). Na região do CA1, 120 dias após o transplante das CMO, co-expressando com Doublecortin [(CDX, vermelho) e GFP<sup>+</sup> (verde), (I)]. O marcador nuclear DAPI (azul).

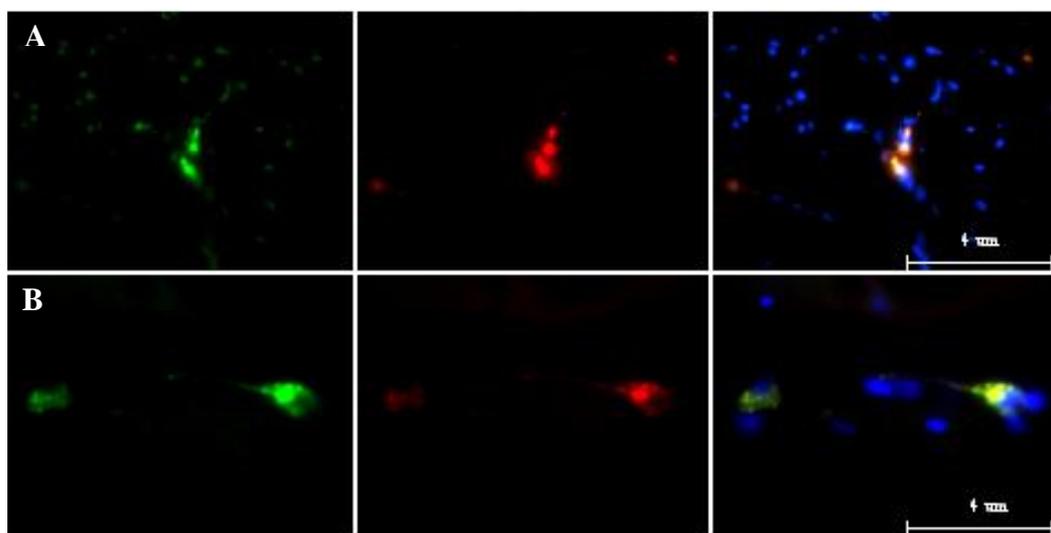


Figura 24 - Paineis com microfotografias de células expressando o marcador GFP<sup>+</sup> no córtex entorrinal em fatias de cérebro de animais epiléticos e transplantados com células de medula óssea de camundongos transgênicos C56/Bl/6. A avaliação foi realizada após 10 dias (**A**) e 120 dias (**B**) do transplante das CMO. Na linha, células expressando o marcador de EGFP em (verde), o marcador glial GFAP em (vermelho) e a sobreposição juntamente com o marcador nuclear DAPI, “merge”. Calibração de 4  $\mu$ m (aumento de 100x1).

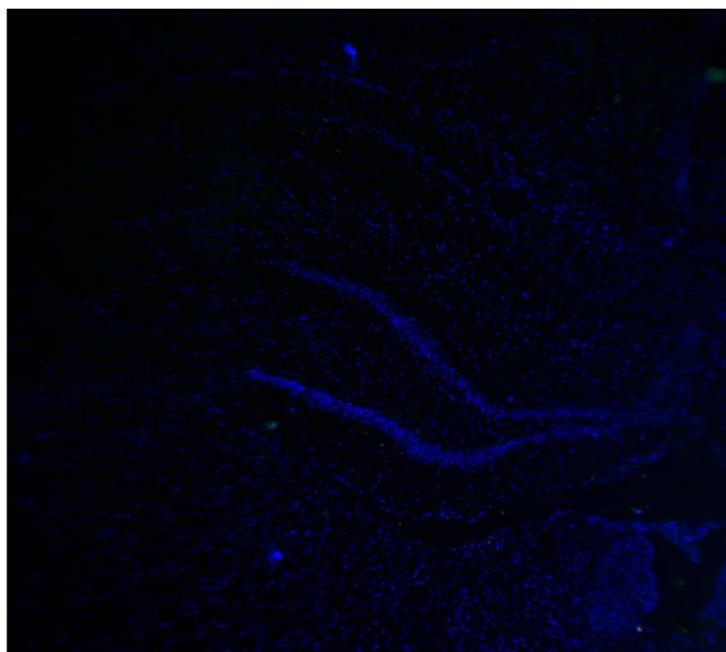


Figura 25- Microfotografia representativa obtida de fatias do cérebro de ratos não epiléticos que receberam células de medula óssea EGFP (controle-CMO). Na análise por microscopia de fluorescência não foi encontrada células GFP<sup>+</sup>, (aumento de 4x1).

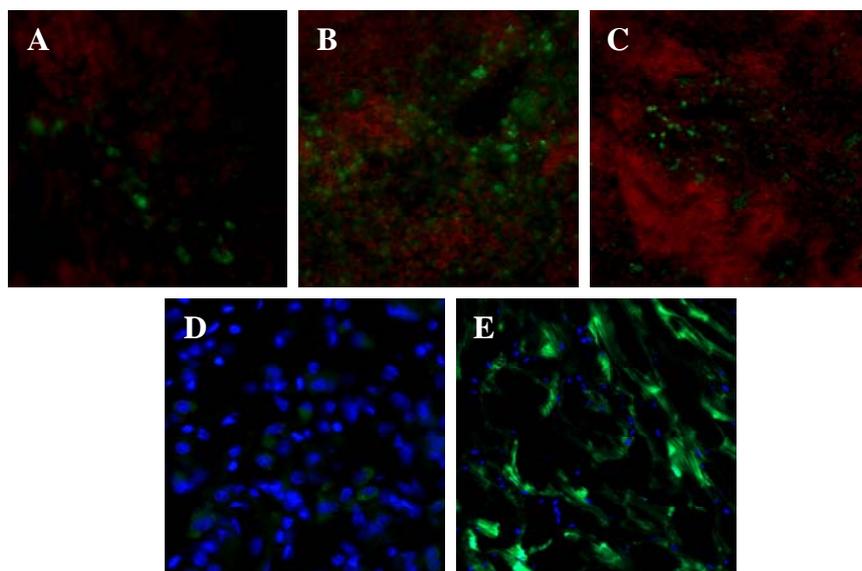


Figura 26- Painel com microfotografias representando células expressando o marcador GFP<sup>+</sup> em fatias dos órgãos de animais epiléticos transplantados com células de medula óssea de camundongos transgênicos C57bl/6. No baço, em 24hs (A), 2 (B) e 10 (C) dias após o transplante, [em vermelho o marcador nuclear TO-PRO, em verde GFP<sup>+</sup>, aumento de (20x1)]. Em 120 dias após o transplante, pulmão (D) e coração (E), [em azul o marcador nuclear DAPI e em verde GFP<sup>+</sup>, aumento de (40x2)].

### **II.3 Efeito das células mononucleares da medula óssea sobre os neurônios hipocampais**

A análise dos neurônios hipocampais pela técnica de Nissl observada no microscópio, não mostrou lesões histológicas no grupo controle, e uma substancial perda neuronal acompanhada de gliose no estrato piramidal do hipocampo nos animais epiléticos em 10 e 120 dias após o SE e transplante (grupo agudo). Alguns neurônios remanescentes apresentaram retração do citoplasma e núcleo pinótico (Figura 27).

Figura 27 - Representação da perda neuronal em secções coradas com cresil de violeta mostrando a estrutura hipocampal de ratos controles e epiléticos (colunas) e as regiões de CA1, CA3 e hilo do GD em 10 e 120 dias após SE (linhas). Escala=100  $\mu$ m.

Para análise quantitativa dos neurônios após 10 dias do SE, foram quantificadas (10 secções de cada hemisfério do hipocampo, 5 animais por grupo) nas três regiões de interesse CA1, CA3 e hilo do GD. Na região de CA1 do hipocampo observou-se uma redução estatisticamente significativa entre os grupos dos animais epiléticos Li-pilo-salina e (50,1%,  $p < 0,001$ ) e entre Li-pilo-CMO (34,3%,  $p < 0,001$ ), em relação ao grupo controle-salina. Entretanto, a densidade neuronal do grupo Li-pilo-CMO foi significativamente maior que no grupo Li-pilo-salina; ( $p < 0,05$ ; Figura 28).

Após 120 dias do SE a densidade neuronal observada no grupo Li-pilo-salina foi menor, com um decréscimo no número de neurônios de aproximadamente de 76,9% quando comparado com o grupo controle-salina ( $p < 0,001$ ). Estes resultados mostram uma progressão na perda neuronal quando analisado dos 10 para os 120 dias após SE. No entanto, nas fatias analisadas do grupo Li-pilo-CMO a perda neuronal foi moderada (32,0 %) quando comparado com os animais controle-salina, com aproximadamente 3 vezes mais neurônios que os quantificados no grupo Li-pilo-salina ( $p < 0,001$ ).

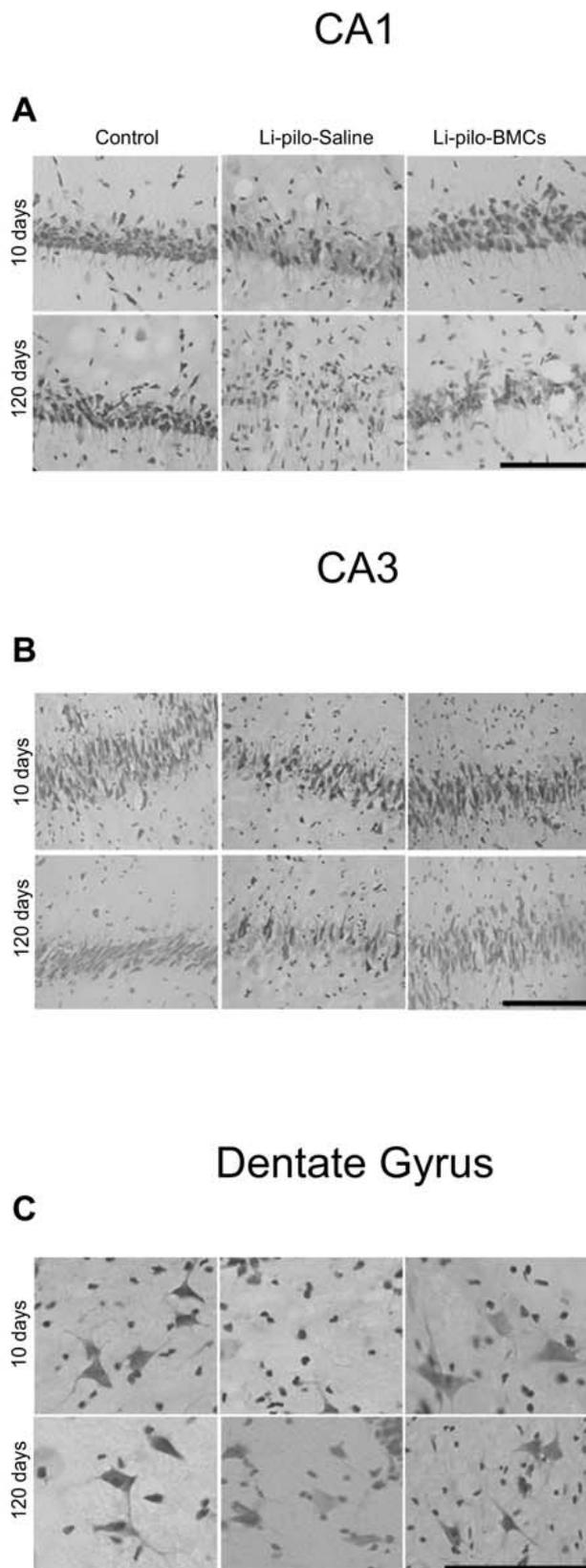


Figura 27 - Representação da perda neuronal em secções coradas com cresil de violeta mostrando a estrutura hipocampal de ratos controles e epiléticos (colunas) e as regiões de CA1, CA3 e hilo do GD em 10 e 120 dias após SE (linhas). Escala=100  $\mu$ m.

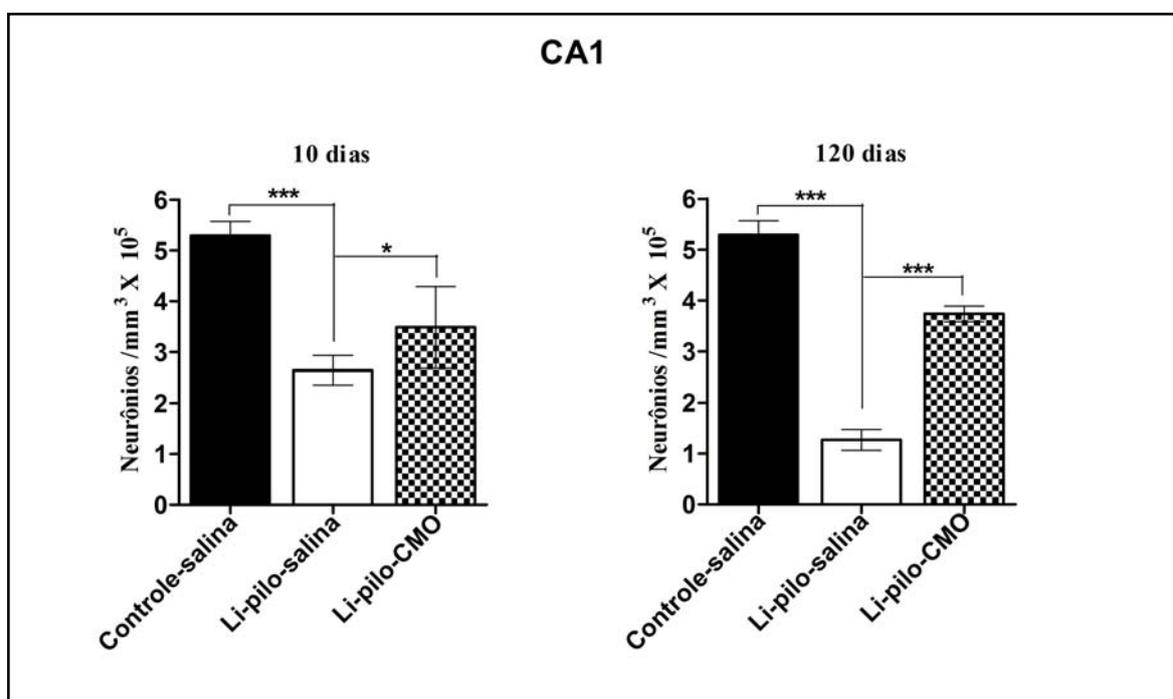


Figura 28- Efeito do transplante das células mononucleares da medula óssea sobre a densidade neuronal na região de CA1 em ratos submetidos à epilepsia por Li-pilo. No gráfico as barras representam a média  $\pm$  desvio padrão (número de neurônios/mm<sup>3</sup>) em ratos controles e epiléticos sacrificados 10 e 120 dias após SE. (\*\*\*) $p < 0,001$ ; \*) $p < 0,05$ ; comparação de Tukey pós ANOVA de uma via).

Na região de CA3 do hipocampo, após 10 dias do SE a redução da densidade neuronal foi observada no grupo Li-pilo-salina quando comparada com o grupo controle-salina em (26,3%;  $p < 0,01$ ) e em 120 dias após SE (34,1%;  $p < 0,001$ ). Nesta região, a densidade neuronal dos animais do grupo Li-pilo-CMO não foi estatisticamente diferente em relação ao grupo controle-salina ( $p > 0,05$ ; Figura 29) em ambos os tempos analisados (10 e 120 dias).

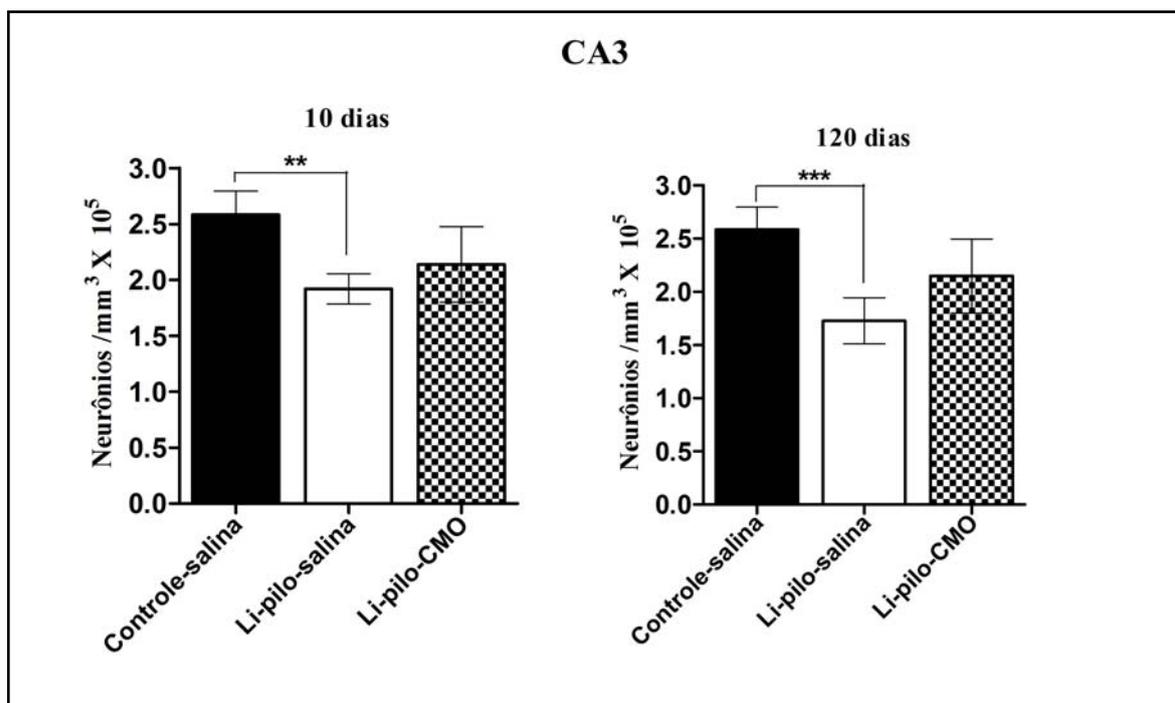


Figura 29 - Efeito do transplante das células mononucleares da medula óssea sobre a densidade neuronal na região de CA3 em ratos submetidos à epilepsia por Li-pilo. No gráfico as barras representam a média  $\pm$  desvio padrão (número de neurônios/mm<sup>3</sup>) em ratos controles e epiléticos sacrificados 10 e 120 dias após SE. (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ), comparação de Tukey pós ANOVA de uma via).

Na região do hilo do GD, a diminuição da densidade neuronal em 10 e 120 dias após o SE no grupo Li-pilo-salina foi de (34%;  $p < 0,05$  e 45%;  $p < 0,01$ , respectivamente), entretanto diferenças significativas não foram encontradas no grupo Li-pilo-CMO em comparação com o grupo controle-salina em ambos os tempos analisados (Figura 30).

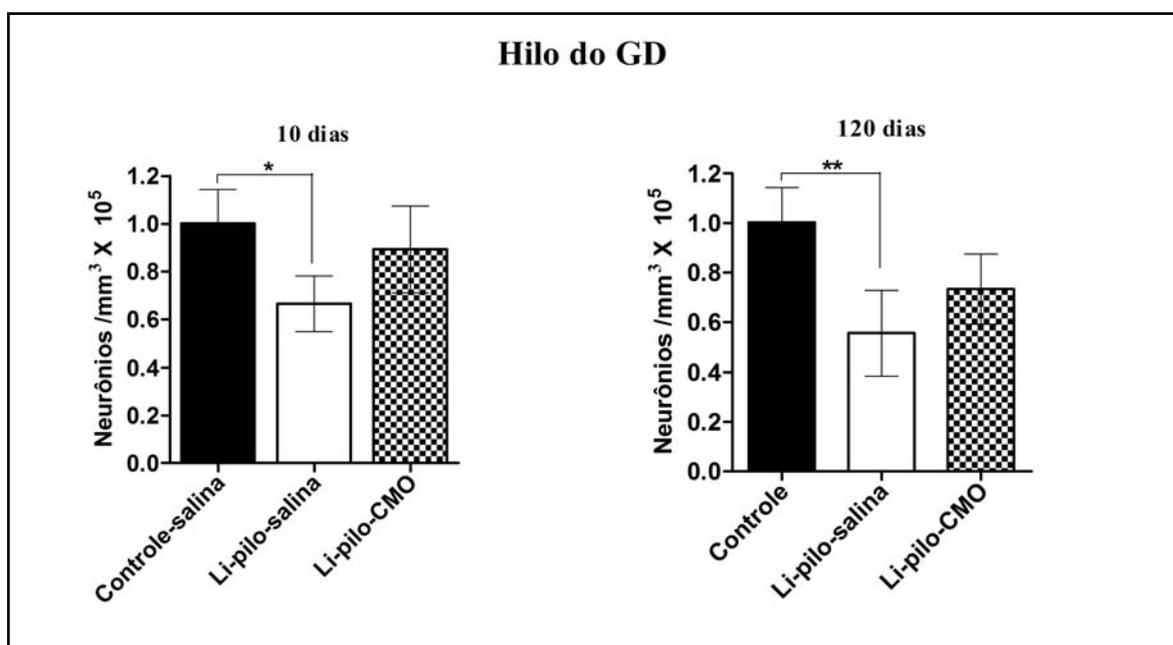


Figura 30 - Efeito do transplante das células mononucleares da medula óssea sobre a densidade neuronal na região do hilo do GD em ratos submetidos à epilepsia por Li-pilo. No gráfico as barras representam a média  $\pm$  desvio padrão (número de neurônios/mm<sup>3</sup>) em ratos controles e epiléticos sacrificados 10 e 120 dias após SE. (\*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ) em comparação de Tukey pós ANOVA de uma via.

#### **II. 4 Efeito das células mononucleares da medula óssea sobre o volume hipocampal**

As medidas do volume hipocampal revelaram que nos animais do grupo Li-pilo-salina em 10 e 120 dias após o SE houve uma diminuição deste volume quando comparado com o grupo controle-salina ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente). Assim como, uma significativa diminuição foi observada no grupo Li-pilo-salina 10 dias quando comparada com o mesmo grupo em 120 dias após SE ( $p < 0,01$ ). Entretanto, não foram observadas significantes diferenças entre o grupo Li-pilo-CMO quando comparado com o grupo controle-salina, tanto em 10 quanto em 120 dias após SE ( $p > 0,05$ ). No entanto, uma diferença significativa ( $p < 0,001$ ) foi observada no grupo Li-pilo-CMO quando comparado com o grupo Li-pilo-salina em 120 dias, mas não em 10 dias após SE ( $p > 0,05$ ), (Figura 31).

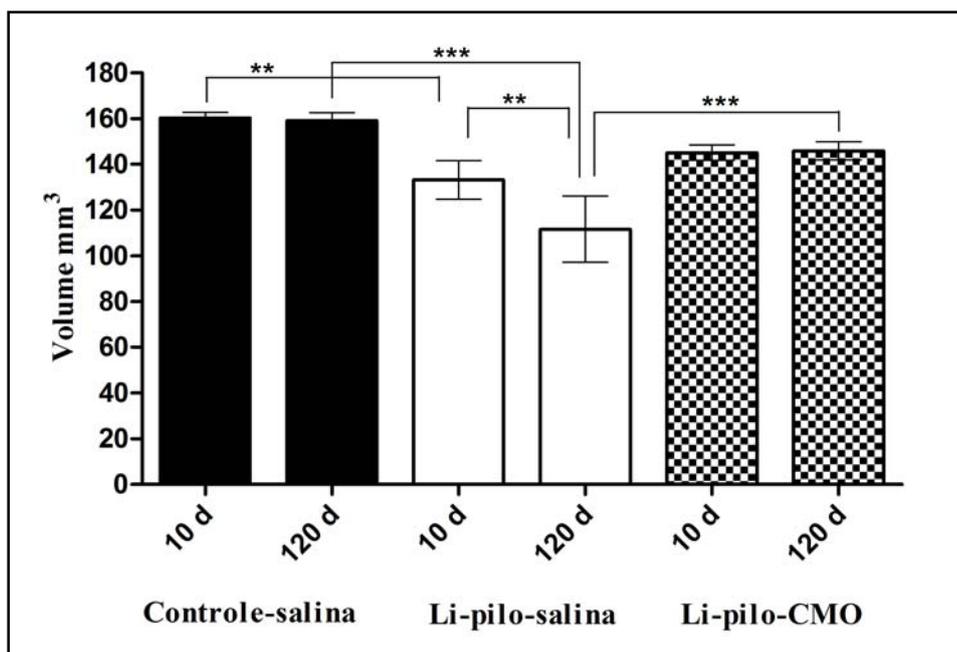


Figura 31 - Efeito do tratamento com células mononucleares da medula óssea sobre o volume hipocampal. A análise foi realizada em 5 ratos de cada grupo (Controle-salina, Li-pilo-salina e Li-pilo-CMO) sacrificados 10 e 120 dias após o SE. As barras representam média  $\pm$  desvio padrão. (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; em comparação por Tukey pós ANOVA de uma via. (Bregma = -3.60 mm, e Interaural = 5.40 mm).

## **II.5 Efeito das células de medula óssea sobre a indução da potenciação de longa duração (LTP)**

A obtenção do registro foi através de um estímulo aplicado pelo estimulador através de um eletrodo bipolar monofásico de baixa frequência, capaz de deflagrar respostas estáveis, mas não causar facilitação ou depressão sináptica (SELIG & MALENKA, 1997). A Figura demonstra a inclinação do potencial excitatório pós-sináptico (PEPS) em um registro durante a resposta basal e após a estimulação [protocolo: 4 estímulos de 1s à 100Hz aplicados quatro vezes, separados por um intervalo de 20 segundos (DALBEM et al., 2005)] obtida em uma fatia de animais dos grupos experimentais após 10 e 120 dias de SE e transplante. Observa-se que no registro obtido de uma fatia hipocampal de um animal do grupo Li-pilo-salina, (sacrificado 10 dias após SE) uma pequena inclinação do PEPS após o estímulo (Figura 32C) o que não ocorreu no registro obtido de uma fatia de um animal sacrificados em 120 dias após SE (Figura 32D). No entanto, em registros obtidos de animais do grupo Li-pilo-CMO, (sacrificado em 10 e 120 dias), observou-se um aumento da amplitude dos PEPS após a estimulação tetânica é conseqüente indução da LTP (Figura 32 (E e F), 10 e 120 dias, respectivamente).

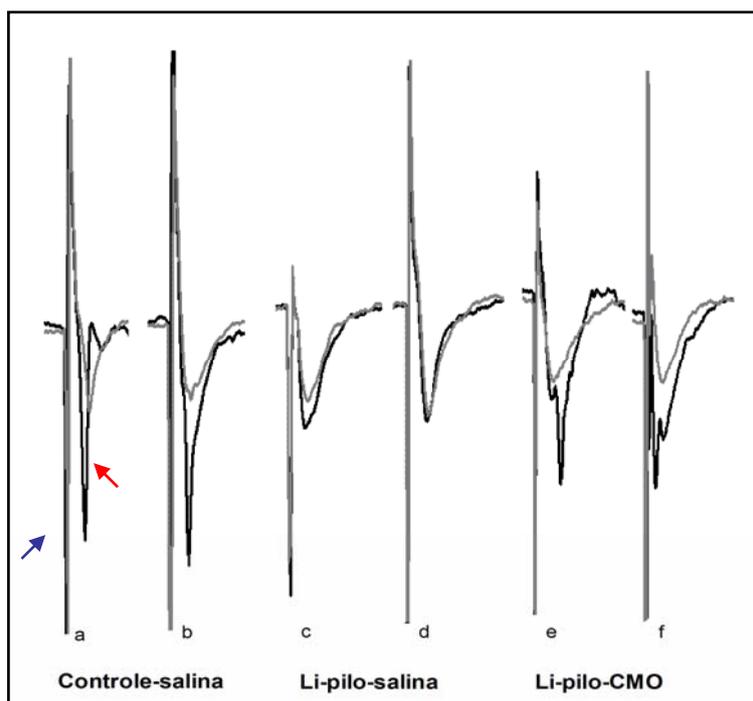


Figura 32 - Registro eletrofisiológico em fatias hipocâmpais, o traçado exemplifica o registro em um ponto entre 15 e 20 minutos antes da estimulação tetânica (em cinza) e após a referida estimulação entre os minutos 44 e 48 (em preto). Registro de uma fatia controle-salina (a e b), Li-pilo-salina (c e d), Li-pilo-CMO (e e f) em 10 e 120 respectivamente. Escala 20 ms/5mv. Observa-se o artefato do estímulo (seta azul) e o PEPS, que é a resposta pós-sináptica (seta vermelha).

A Figura 33 mostra a amplitude dos PEPS depois do trem de estímulo obtida nos dados brutos. Os dados foram expressos em percentual de fatias em que foi possível induzir LTP, entre parênteses a média percentual da amplitude do PEPS  $\pm$  erro padrão, e o número de fatias (n). Foram analisadas as amplitudes obtidas entre os minutos 44-48 após o trem de estímulo (grupos epiléticos em relação ao controle-salina) pelo Teste t.

Em 10 dias após SE, houve indução de LTP em 100% das fatias hipocampais do grupo controle (213,1 $\pm$ 19,61; n=10 fatias). No grupo Li-pilo-salina ocorreu a indução da LTP em 30% das fatias, a média da amplitude do grupo foi [(104,1 $\pm$ 12,49mV; n=10), (Li-pilo-salina versus controle salina ( $p=0,0002$ )). No grupo Li-pilo-CMO ocorreu à indução de LTP em 80% das fatias, a média da amplitude do grupo foi [(180,3 $\pm$ 14,25mV; n=10), (Li-pilo-CMO versus salina ( $p=0,1932$ ))].

Em 120 dias após SE, houve à indução da LTP em 90% das fatias hipocampais do grupo controle-salina (175,2 $\pm$ 12,85; n=10). No grupo Li-pilo-salina não ocorreu indução da LTP nenhuma fatia [(97,33 $\pm$ 5,62; n= 10), (Li-pilo-salina versus controle salina ( $p<0,0001$ )). No grupo Li-pilo-CMO ocorreu à indução de LTP em 100% das fatias [(174,4 $\pm$ 15,75; n=9 fatias), (Li-pilo-CMO versus controle-salina ( $p=0,9685$ ))].

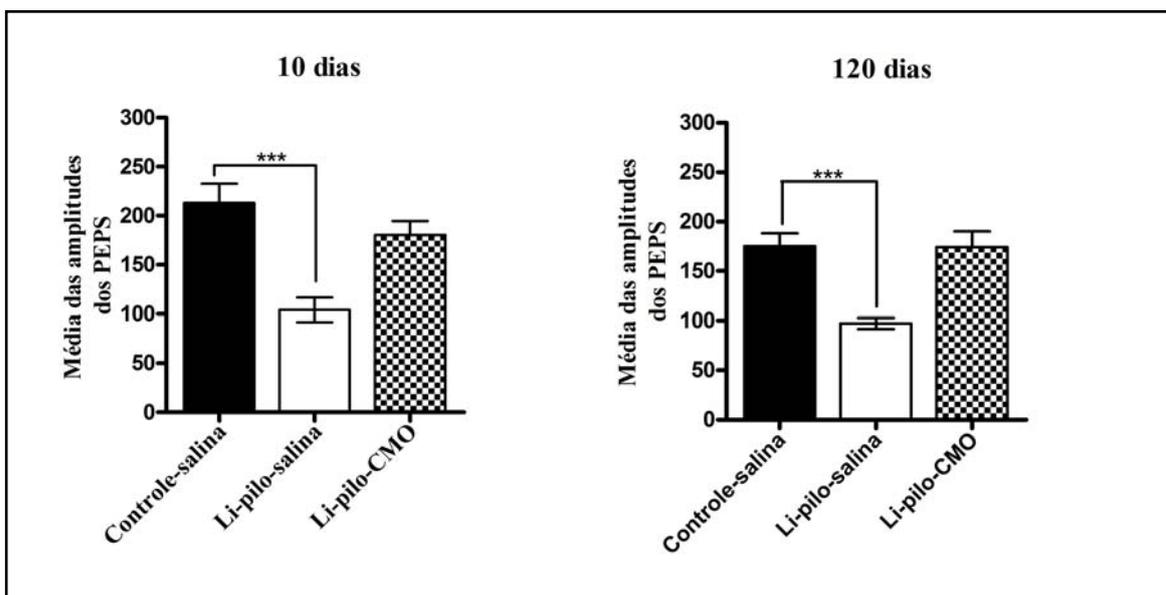


Figura 33 - Efeito das células mononucleares da medula óssea sobre a amplitude dos PEPS. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão, obtidos entre os minutos 44-48 após a estimulação tetânica avaliado pelo teste t entre os grupos Li-pilo versus controle-salina.\*\*\*  $p=0,0002$  (em 10 dias) e  $p<0,0001$  (em 120 dias após SE).

A Figura 34 mostra o curso temporal das amplitudes (20 minutos antes e 50 minutos depois) do trem de estímulo. Para reduzir a variabilidade que existe entre as fatias, normalizamos os valores das inclinações do PEPS, considerando 100% e analisamos pelo teste de Tukey pós ANOVA de uma via. Observou-se que a amplitude dos PEPS obtidos em fatias hipocampais (após 10 dias do SE), no grupo Li-pilo-salina foi significativamente menor quando comparada com os dados obtidos do grupo controle-salina ( $p < 0,001$ ). No grupo Li-pilo-CMO não houve diferença significativa quando comparada ao controle-salina ( $p > 0,05$ ). Entre os grupos Li-pilo a amplitude foi significativamente maior nas fatias hipocampais obtidas dos ratos Li-pilo-CMO ( $p < 0,01$ ).

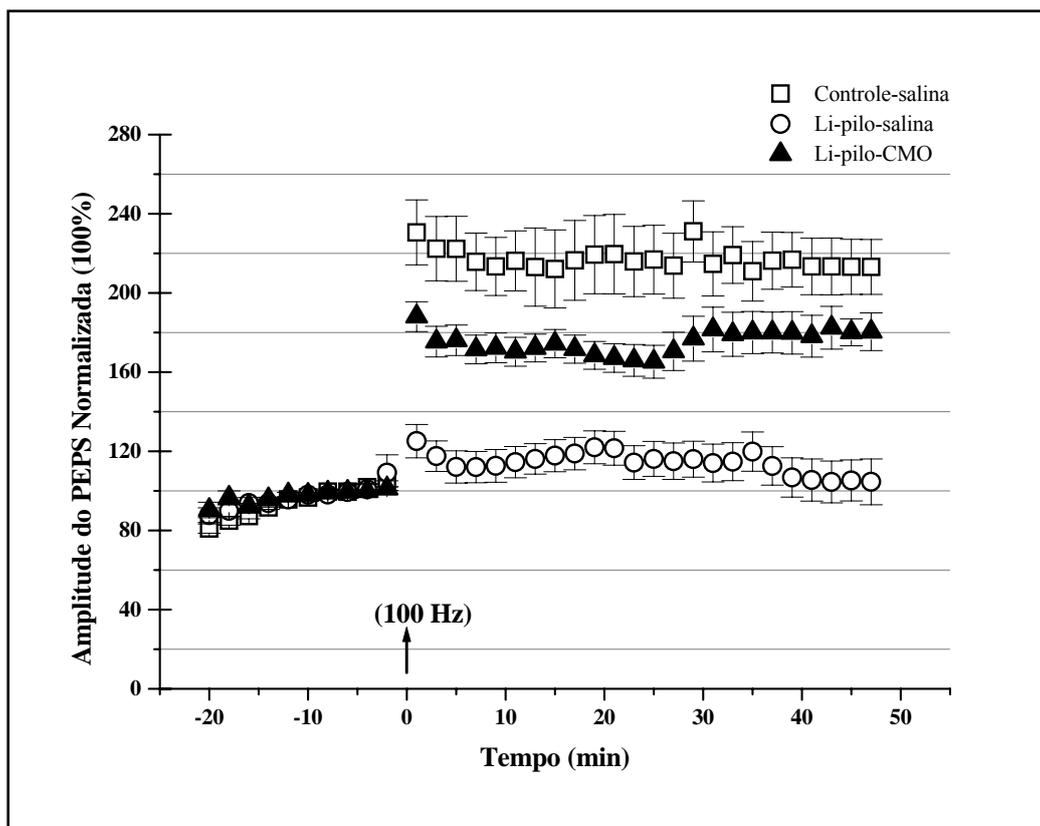


Figura 34 - Efeito das células mononucleares da medula óssea sobre a indução da LTP em fatias hipocâmpais de ratos normais e epiléticos, 10 dias após SE. Resposta basal antes do trem de estímulo de alta frequência (seta). Cada ponto no gráfico representa a média percentual das amplitudes dos PEPS (em cada 3 minutos  $\pm$  erro padrão). Em cada um dos grupos experimentais.

Em 120 dias após o SE a amplitude dos PEPS foi significativamente reduzida nas fatias obtidas do grupo Li-pilo-salina ( $2.67 \pm 5.62$  mV), ficando semelhante à média obtida nos 10 minutos anteriores a estimulação tetânica de ( $2,55 \pm 2,17$ ). Por outro lado, uma potenciação, extremamente significante, foi observada nas fatias do grupo Li-pilo-CMO em relação ao grupo Li-pilo-salina ( $p < 0,001$ ); sendo que, não foi estatisticamente significante em relação ao grupo controle-salina ( $p > 0,05$ ; Figura 35). A amplitude dos animais epiléticos foi significativamente maior nas fatias hipocampais obtidas dos ratos animais transplantados com as células mononucleares da medula óssea [(Li-pilo-salina versus Li-pilo-CMO ( $p < 0,001$ )]].

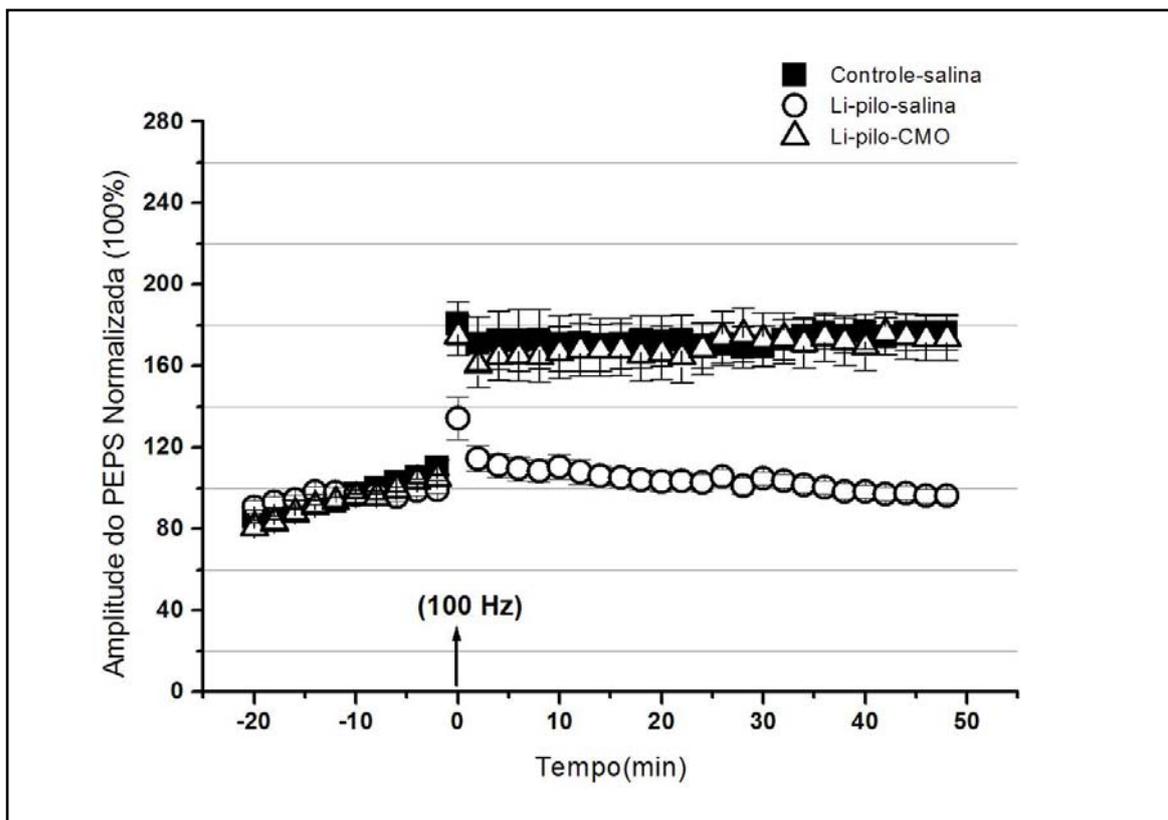


Figura 35 - Efeito das células mononucleares da medula óssea sobre a indução da LTP em fatias hipocâmpais de ratos normais e epiléticos, 120 dias após SE. Resposta basal antes do trem estímulo de alta frequência (seta). Cada ponto no gráfico representa a média percentual das amplitudes dos PEPS (em cada 3 minutos  $\pm$  erro padrão).

## **II.6 Efeito das células mononucleares da medula óssea sobre o teste de memória no Labirinto Aquático de Morris (LAM)**

Para analisar o efeito do transplante das CMO pela via da cauda sobre a aquisição da memória espacial, ratos controles e epiléticos foram treinados no LAM.

Em 10 dias após o SE, ao avaliarmos os dados do treino pelo teste de Newman-Keuls pós ANOVA de uma via, a latência (tempo gasto para encontrar a plataforma) dos animais de ambos os grupos epiléticos foi maior do que os animais não epiléticos [(Li-pilo versus controle-salina, ( $p < 0,001$ ); (Li-pilo-CMO versus controle-salina, ( $p < 0,05$ ), (Figura 36A)].

Ao avaliarmos os dados pelo teste de Bonferroni, observou-se que o tempo gasto para encontrar a plataforma dos animais epiléticos não transplantados foi maior que os controles em algumas sessões [Li-pilo-salina versus controle-salina (sessão 8,  $p < 0,01$ ; 9, e 13,  $p < 0,05$ ; 14-15,  $p < 0,01$ ; e 16,  $p < 0,001$ )]. O escape de latência dos animais transplantados foi similar aos controles em todas as sessões.

Após 120 dias do SE, ao avaliarmos os dados do treino pelo teste de Newman-Keuls pós ANOVA de uma via, observou-se que a média da latência de escape dos animais epiléticos foi maior que dos animais não epiléticos, [(Li-pilo-salina e Li-pilo-CMO versus controle-salina ( $p < 0,001$ ); Figura 36C)].

Avaliamos também os dados com o pós-teste de Bonferroni e observou-se uma grande variabilidade entre as sessões do grupo Li-pilo-CMO, sendo que o tempo gasto para encontrar a plataforma de escape foi estatisticamente semelhante aos controles apenas nas

sessões 11 e 15. Nos animais do grupo Li-pilo-salina todas as sessões foram estatisticamente significantes (Li-pilo-salina versus controle-salina,  $p < 0,001$ ).

A retenção da memória foi avaliada 24 horas após a última sessão de treino em uma sessão de teste sem reforço (sem a presença da plataforma), nos animais do grupo 10 dias, observou-se que não houve diferença estatística no escape de latência nos animais dos grupos epiléticos [Li-pilo-salina, Li-pilo-CMO versus controle-salina ( $p > 0,05$ ); (Figura 36B)]. No teste dos animais epiléticos após 120 dias do SE, observou-se que houve diferença entre os grupos epiléticos [(Li-pilo-CMO versus controle-salina, ( $p < 0,01$ ); Li-pilo versus controle-salina ( $p < 0,001$ )], mostrando que desempenho dos animais do grupo Li-pilo-CMO para encontrar a plataforma foi melhor que os animais não transplantados com CMO, entretanto ambos os grupos apresentaram o mesmo linear estatístico de latência de escape (Li-pilo-salina versus Li-pilo-CMO;  $p > 0,05$ ), Figura 36D.

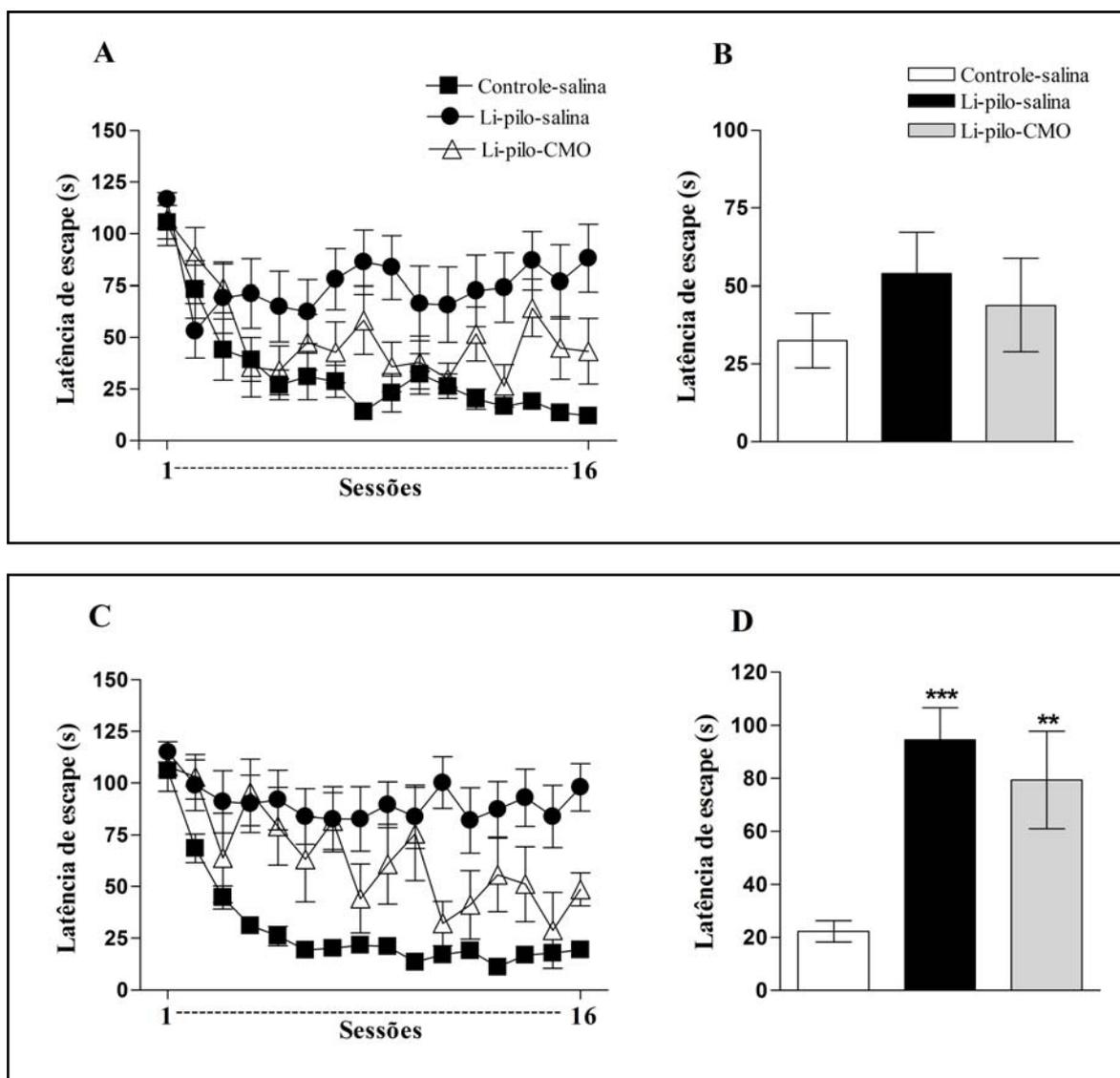


Figura 36 - Efeito das células mononucleares da medula óssea sobre a memória em animais epiléticos. Animais controle e tratados foram treinados em 16 sessões na versão espacial do Labirinto Aquático de Morris. Cada ponto no gráfico representa a média ( $\pm$  erro padrão) da latência de escape (tempo gasto para encontrar a plataforma de escape) em cada sessão do treino nos grupos 10 [(A) controle-salina,  $n=11$ ; Li-pilo-salina,  $n=9$  e Li-pilo-CMO,  $n=11$ ] e 120 [(C) controle-salina  $n=9$ , Li-pilo-salina  $n=7$  e Li-pilo-CMO  $n=10$ ] dias. As barras representam (média $\pm$ erro padrão) da latência, medida no teste para detectar o local exato onde a plataforma estava localizada, feito 24 hs após a última sessão de treino nos grupos 10 (B) e 120(D) dias, \*\*\* $p < 0,001$  e \*\* $p < 0,01$  em relação ao controle no Newman-Keuls pós ANOVA de uma via.

## SEÇÃO II

Nesta seção descreveremos os resultados referentes ao **Grupo Crônico**, animais que receberam o transplante de células mononucleares da medula óssea de ratos Wistar ou de camundongos EGFP (C57/BL6), aos 22 dias após o SE.

## II. 1 Efeito das células mononucleares da medula óssea sobre as crises espontâneas recorrentes em ratos com epilepsia induzida por lítio e pilocarpina

No **experimento 1**: Animais com epilepsia induzida por lítio e pilocarpina e que receberam transplante da fração mononuclear da medula óssea de ratos Wistar. Durante o SE todos os animais que tiveram crises classe V de Racine foram observados por 90 minutos e a média de latência para a primeira crise foi ( $33,41 \pm 13,03$  segundos). A média da frequência das CER no primeiro período de observação nos animais epiléticos foi de ( $1,36 \pm 0,83/\text{dia}$ ) sendo que foi de [ $1,21 \pm 0,17/\text{dia}$  (nos animais que receberiam o transplante de solução-salina)], [ $1,48 \pm 0,05/\text{dia}$ , (nos animais que receberiam o transplante de CMO). Entretanto, uma semana após o transplante o número de CER aumentou aproximadamente em 35% nos ratos do grupo epiléticos-salina em comparação com o período pré-tratamento ( $1,63 \pm 0,12$  versus  $1,21 \pm 0,17$  dia; respectivamente,  $p > 0,05$ ). Enquanto que os ratos do grupo epiléticos-CMO-r tiveram uma diminuição na frequência das CER neste mesmo período de aproximadamente 50% quando comparado com o período pré-tratamento [ $(0,74 \pm 0,05$  versus  $1,48 \pm 0,05/\text{dia}$ ); ( $p < 0,0001$ ) (Figura 37)].

O número de episódios de crises recorrentes espontâneas dos animais estudados, em um período de registro de 12 horas por dia, durante 7 dias antes e após o transplante esta representado na Figura 38. A duração das CER nos animais do grupo epiléticos-CMO-r em média foi menor que no grupo epiléticos-salina ( $32,71 \pm 1,43$  e  $46,66 \pm 2,31$  segundos, respectivamente).

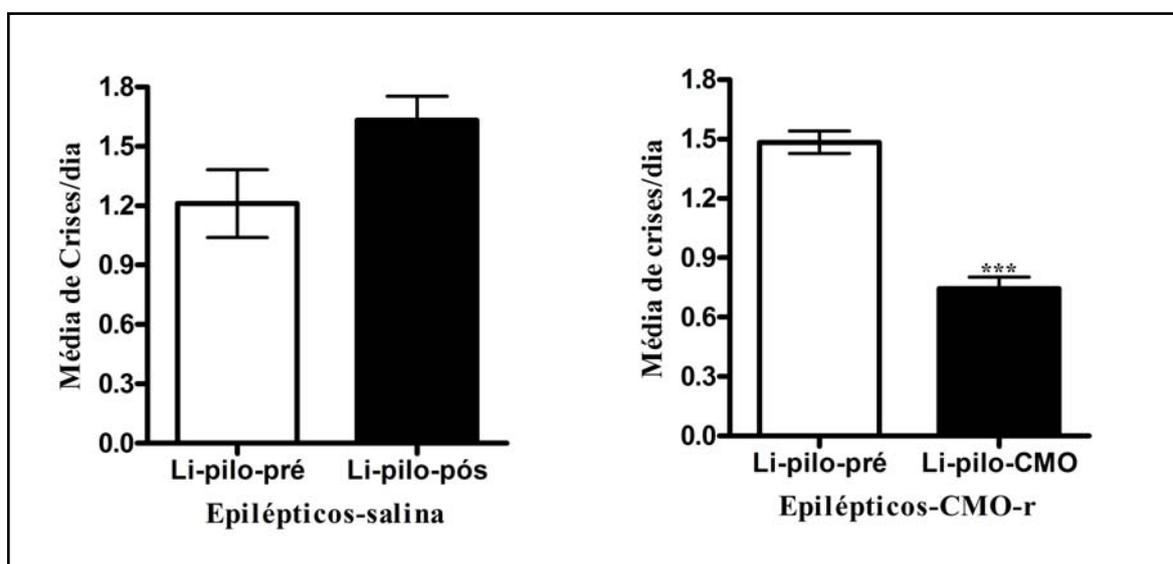


Figura 37 - Efeito do transplante das células mononucleares da medula óssea de ratos sobre as crises espontâneas recorrentes em ratos epiléticos. As barras representam a média do número de crises do grupo, observadas em 12 hs por dia, durante 7 dias no período pré-transplante (barras brancas) e pós-transplante (barras pretas). Os ratos epiléticos (n=14) após 22 dias do SE foram tratados com CMO obtidos de ratos wistar (Li-pilo-CMO, n=8) ou com solução salina (Li-pilo-pós, n=6), \*\*\* $p < 0,0001$  comparação pelo pós-teste de Tukey após ANOVA de uma via.

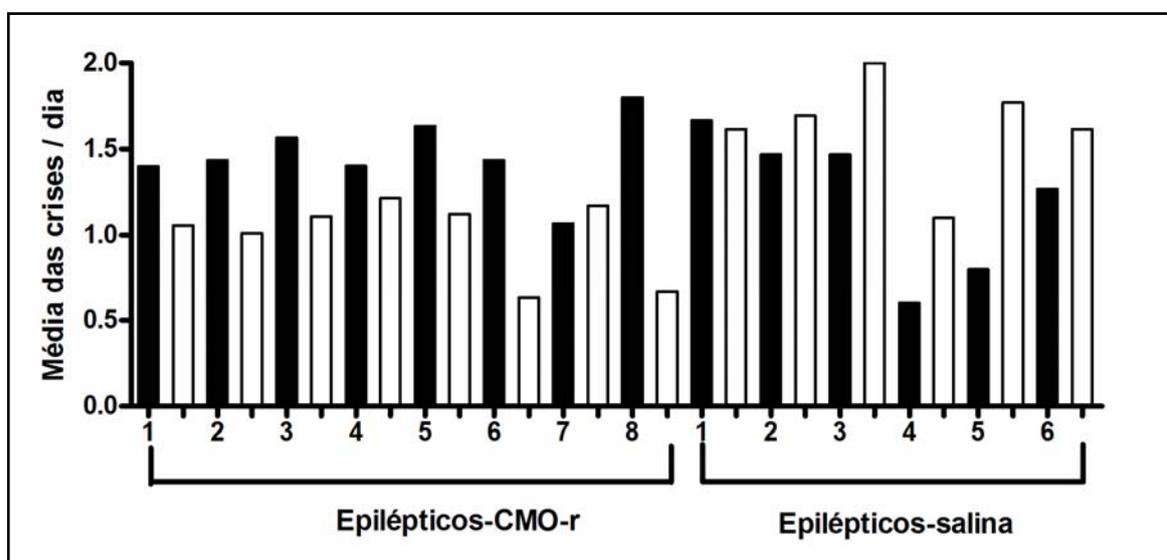


Figura 38- Efeito do transplante das células mononucleares da medula óssea de ratos sobre as crises espontâneas recorrentes em ratos epiléticos. As barras representam a média do número de crises de cada animal, observadas em 12 hs por dia, durante 7 dias no período pré-transplante (barras pretas) e pós-transplante (barras brancas). Os ratos epiléticos (n=14) após 22 dias do SE foram tratados com CMO obtidos de ratos wistar (n=8) ou com solução salina (n=6).

Resultados similares foram obtidos no **experimento 2**: animais que receberam o transplante da camada mononuclear de células da medula óssea de camundongos transgênicos EGFP. A média geral das crises dos animais epiléticos no pré-tratamento foi de  $(1,26 \pm 0,81/\text{dia})$ . Os animais que receberam o transplante das CMO (epilépticos-CMO-m) apresentavam em média  $(1,07 \pm 0,10/\text{dia})$  crises por dia no período observado pré-transplante enquanto que no período observado pós transplante esta média foi de  $(0,50 \pm 0,07/\text{dia})$ , apresentando após o tratamento uma diminuição da frequência das crises em aproximadamente 53,5% ( $p < 0,0001$ , Figura 39). Enquanto que, os animais que receberam transplante de solução salina (epilépticos-salina) apresentaram em média um número maior de CER após o tratamento, no entanto, este aumento não foi estatisticamente significativo ( $1,45 \pm 0,09$  versus  $1,51 \pm 0,09/\text{dia}$ ; respectivamente;  $p > 0,05$ , Figura 39). Entretanto, a duração das CER dos animais do grupo epiléticos-CMO-m foi (em média) menor que às dos animais do grupo epiléticos-salina ( $30,36 \pm 1,18$  e  $41,8 \pm 2,83$  segundos, respectivamente). A figura 40 mostra a média das crises em cada animal. Observa-se que em alguns animais as crises foram completamente suprimidas após o transplante das CMO (ver no gráfico animal, 4, 5 e 16, Figura 40A).

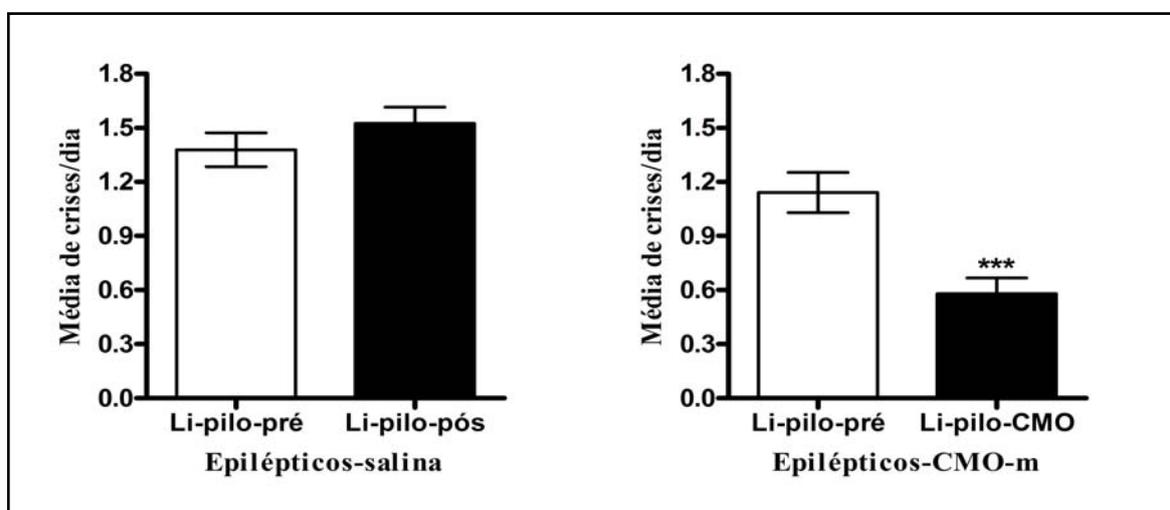


Figura 39 - Efeito das células de medula óssea de camundongos GFP<sup>+</sup> sobre as crises recorrentes espontâneas em ratos epiléticos. Aos 22 dias após o SE induzido por Li-pilo, foram tratados com CMO obtidos de camundongos transgênicos GFP<sup>+</sup> (C57Bl/6) ou solução salina. O comportamento foi vídeo-monitorado por 12 hs, durante 7 (antes do tratamento) e 14 (após o tratamento) dias. As barras representam a média do número de CER por dia no grupo, primeiro período de observações (Li-pilo-pré, barras brancas) e no segundo período de observações (animais tratados com solução salina e/ou CMO, barras pretas) \*\*\* $p < 0,0001$  comparação pelo pós-teste de Tukey após ANOVA de uma via.

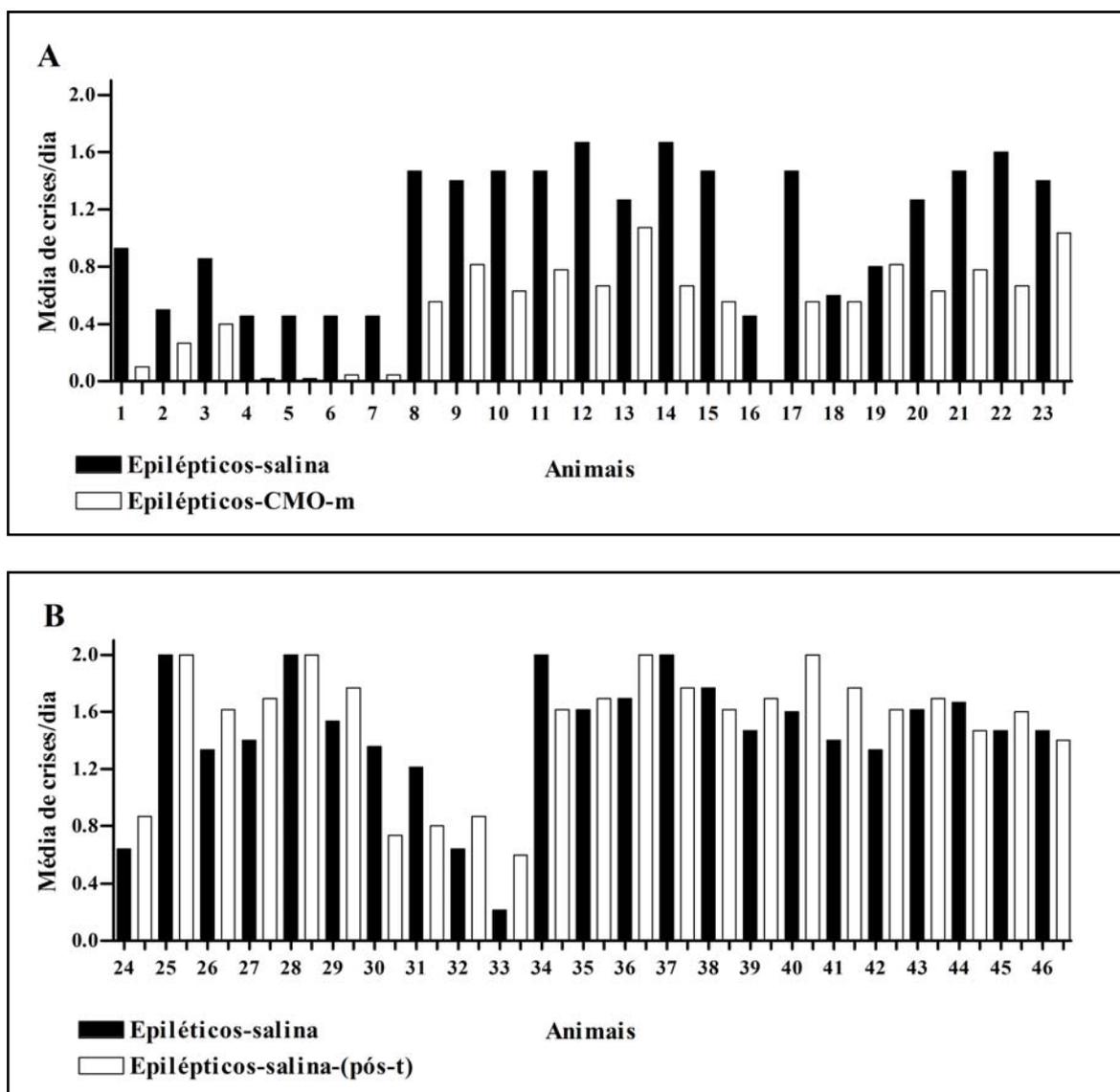


Figura 40 - Efeito das células mononucleares de medula óssea de camundongos GFP<sup>+</sup> sobre as crises recorrentes espontâneas em ratos epiléticos. Quarenta e seis ratos Wistar, 22 dias após o SE induzido por Lipilo, foram tratados com CMO obtidos de camundongos transgênicos GFP<sup>+</sup> (C57Bl/6; n=23) ou solução salina (n=23). O comportamento foi vídeo-monitorado por 12hs, durante 7 (antes do tratamento) e 14 (após o tratamento) dias. As barras representam a média do número de CER por dia de cada animal, primeiro período de observações (barras pretas) e no segundo período de observações (barras brancas). Na Figura, Epiléticos-salina-(pós-t): animais epiléticos que receberam transplante de solução salina e foram observados por 14 dias.

## **II.2 Migração das células mononucleares da medula óssea EGFP no cérebro de ratos epilépticos**

Para verificar a presença das células EGFP no cérebro dos animais. Os encéfalos foram perfundidos e preparados conforme os protocolos descritos anteriormente (I.6 e I.11) e analisado no microscópio de fluorescência.

Observou-se a presença de um número muito pequeno de células GFP<sup>+</sup> no cérebro dos animais. Elas estavam presentes principalmente no GD do hipocampo e no córtex entorrinal. Algumas destas células expressaram o marcador de neurônio adulto (NeuN) no GD [(Figura 41 (B e D), (42A e C)] e marcador glial GFAP no córtex entorrinal (Figura 43).

Os órgãos de alguns animais epilépticos foram avaliados e verificamos a presença das células GFP<sup>+</sup>, no entanto, não constatamos formação de teratomas. A Figura 44 demonstra a presença das células no baço. Nas fatias preparadas do grupo controle-CMO-m (animais normais que receberam células de MO) não foram encontradas células GFP<sup>+</sup> (dados não mostrados).

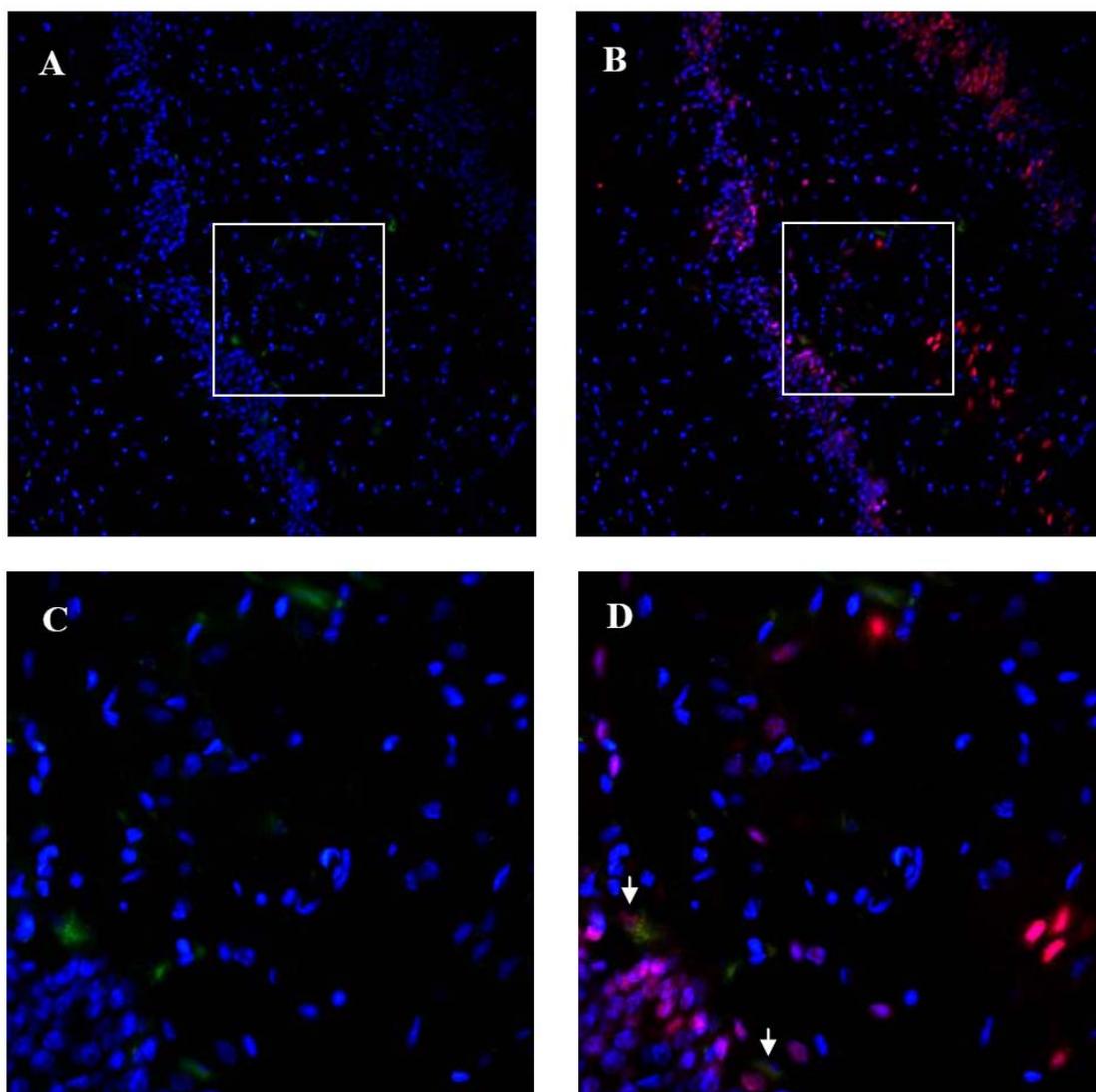


Figura 41 - Paineis com microfotografias de células expressando o marcador GFP<sup>+</sup> em fatias de cérebro de animais epiléticos após 45 dias do transplante das CMO (A e C). As setas indicam células GFP<sup>+</sup> (verde) expressando o marcador neuronal NeuN (Vermelho) e o marcador nuclear DAPI (Azul) (B e D) na região do GD do hipocampo, (aumento de 100x1).

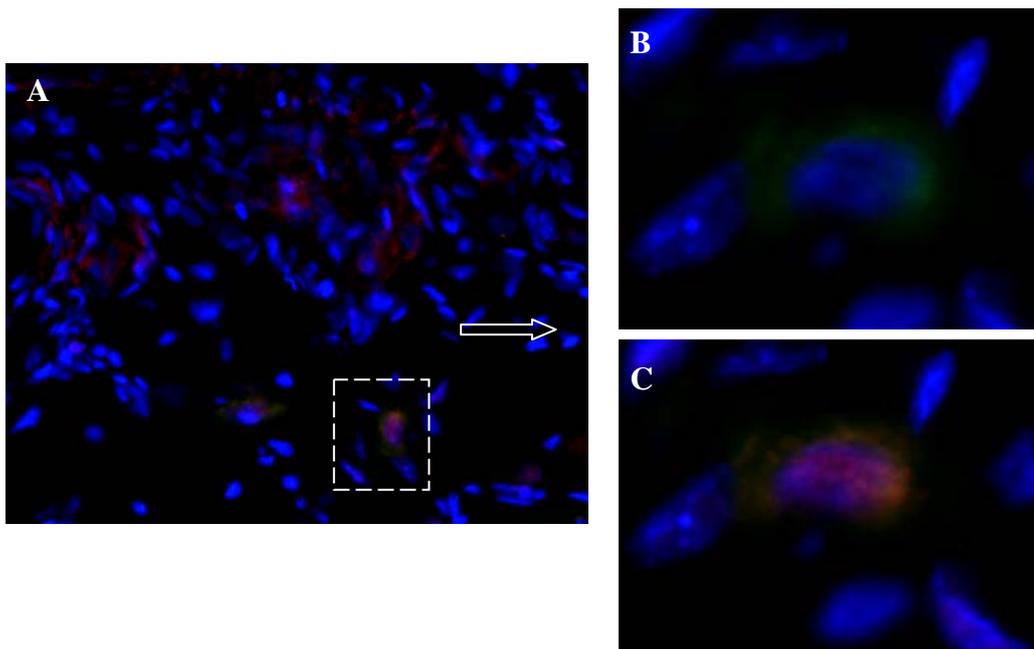


Figura 42 - Painel com microfotografias de células expressando o marcador  $GFP^+$  em fatias de cérebro de animais epiléticos após 45 dias do transplante das CMO. Célula  $GFP^+$  (verde) expressando o marcador neuronal NeuN (Vermelho), marcador nuclear DAPI [(Azul), (A) aumento 20x2]. Detalhe da imagem da célula  $GFP^+$  (B) e com a expressão do NeuN (C), (aumento de 100x1).

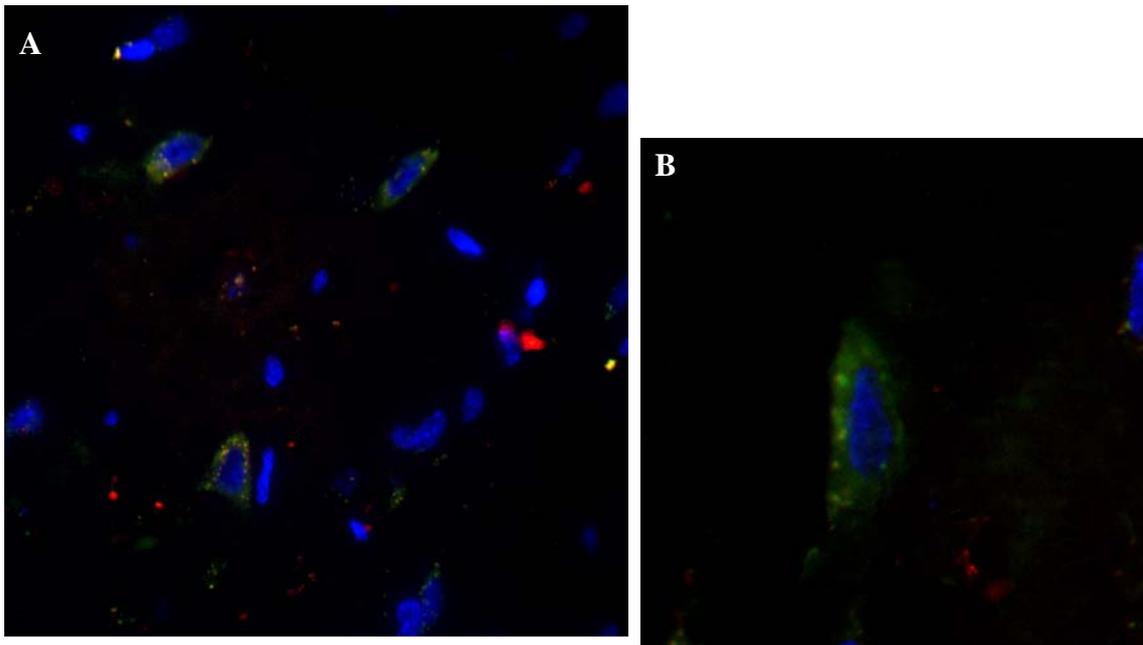


Figura 43 - Paineis com microfotografias de células expressando o marcador GFP<sup>+</sup> em fatias de cérebro de animais epiléticos após 45 dias do transplante das CMO. Sobreposição de células co-expressando o marcador glial (GFAP) e GFP<sup>+</sup> em amarelo e o DAPI [(Azul), (A) aumento 60x1] e co-expressando GFP<sup>+</sup> em verde e DAPI [(Azul), (B) aumento 60x2] na região córtex entorrinal.

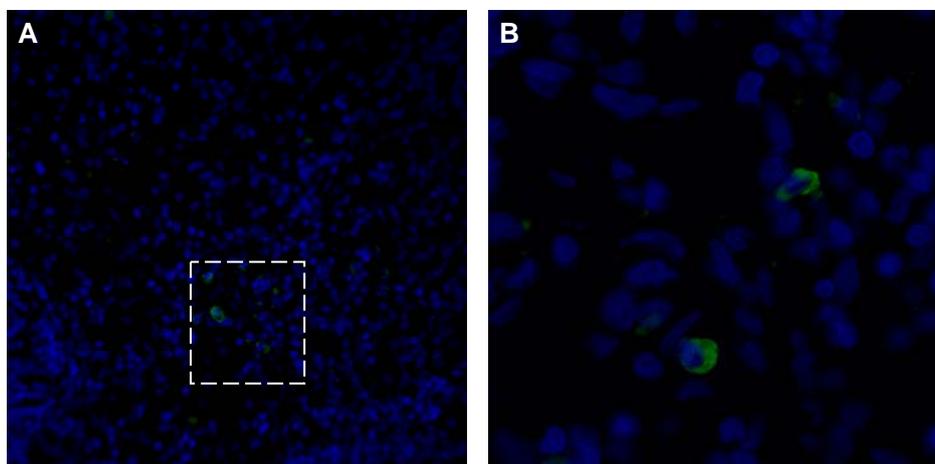


Figura 44 - Painel com microfotografias de células expressando o marcador GFP<sup>+</sup> em fatias do baço de animais epiléticos após 45 dias do transplante de CMO. Células GFP<sup>+</sup> (verde) e o marcador nuclear DAPI (Azul), (A) aumento 20x1 e (B) 20x2.

### **II.3 Efeito das células mononucleares da medula óssea sobre os neurônios hipocâmpais**

A Figura 45 mostra que uma substancial perda neuronal nos animais do grupo epilépticos-salina, acompanhado de gliose na camada piramidal do hipocampo.

A Figura 46 mostra a análise quantitativa dos dados em comparação de Tukey pós ANOVA de uma via. Observou-se perda neuronal nos animais do grupo epilépticos-salina de aproximadamente 31,42% na região de CA1 ( $p < 0,001$ ), e de 50,97% no hilo do GD ( $p < 0,001$ ), em comparação com o grupo controle-salina. Entretanto, nos animais do grupo epilépticos-CMO-m a perda neuronal foi de aproximadamente 5,74% na região de CA1 ( $p > 0,05$ ), e 30,29% no hilo do GD em comparação com o grupo controle-salina ( $p < 0,001$ ). Entre os grupos Li-pilo a perda neuronal foi maior em 120 dias após o SE, foi [(epilépticos-salina versus epilépticos-CMO-m: (na região de CA1,  $p < 0,001$ ); (hilo do GD,  $p < 0,01$ )].

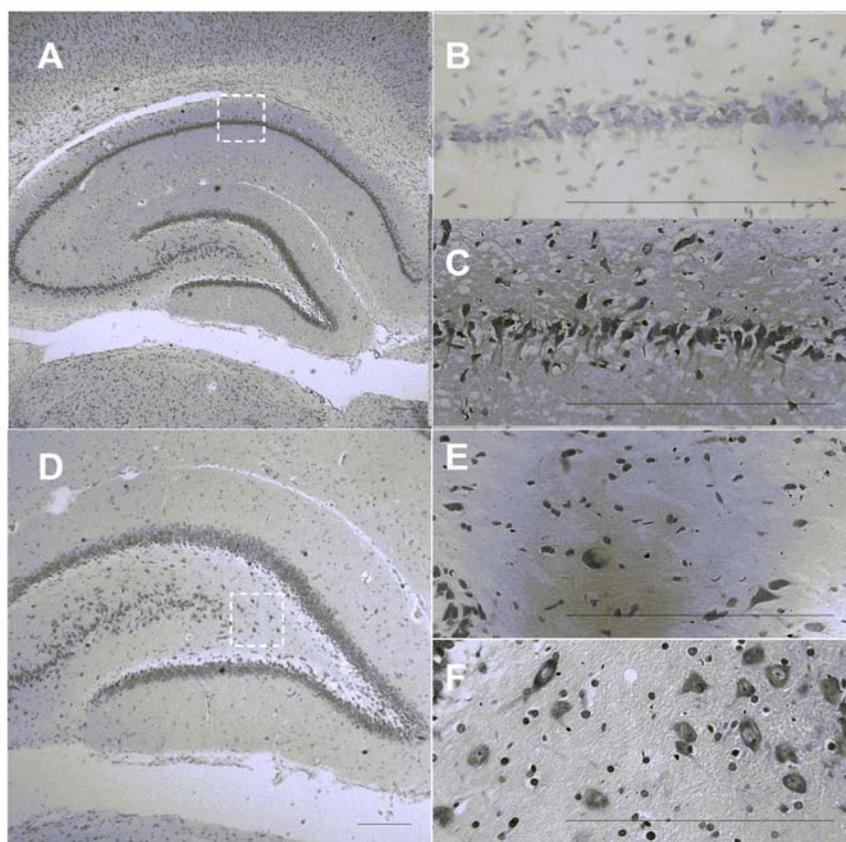


Figura 45 – Painele com microfotografias da coloração de cresil violeta em fatias de cérebro de ratos controle-salina (**A** e **C**). Na região de CA1 de ratos epiléticos-salina (**B**) epiléticos-CMO-m (**C**). No hilo do GD em ratos epiléticos-salina (**E**), epiléticos-CMO-m (**F**), sacrificados 45 dias após o transplante. Aumento de 4x1 (A e D) e 40x1 (B, C, E e F).

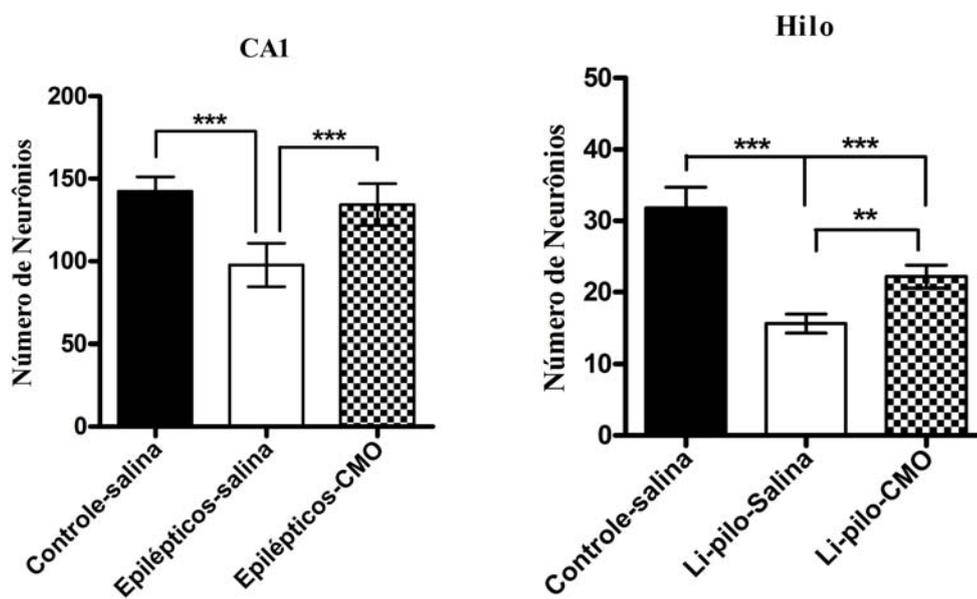


Figura 46 - Efeito das células mononucleares da medula óssea sobre a perda neuronal em animais epiléticos na região de CA1 e hilo do giro denteado. As barras representam média  $\pm$  desvio padrão. A análise foi realizada por ANOVA de uma via seguido de Tukey (\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

## **II. 4 Efeito do transplante de células mononucleares da medula óssea sobre a indução da potenciação de longa duração em ratos epilépticos**

Para verificar os a amplitude dos PEPS nós avaliamos fatias do cérebro de animais não epilépticos e com epilepsia induzida por Li-pilo. A estimulação da via colateral de *Schaffer* induziu PEPS em fatias hipocampais preparadas de ratos do grupo controle-salina (Figura 47a), Li-pilo transplantados com solução salina (Figura 47b) e Li-pilo transplantados com células mononucleares da medula óssea GFP (Figura 47c).

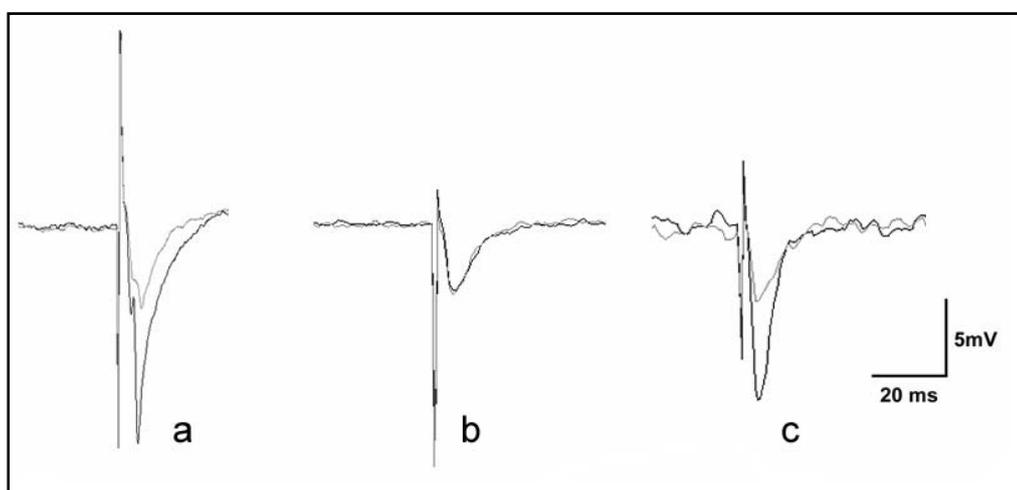


Figura 47 - Registro eletrofisiológico em fatias hipocâmpais de ratos, o traçado exemplifica o registro em um ponto entre 15 e 20 minutos antes da estimulação tetânica (em cinza) e após a referida estimulação entre os minutos 44 e 48 (em preto). Registro em 45 dias após SE em controle-salina, Li-pilo-salina, Li-pilo-CMO (a-b-c) respectivamente. Escala 20 ms/5mv.

A figura 48 mostra a indução da LTP analisada com os dados brutos (média  $\pm$  erro padrão) pelo teste t em relação ao grupo controle-salina. Observou-se que houve indução de LTP em 100% das fatias hipocampais do grupo controle ( $219,7 \pm 1,95$  n=10 fatias). No grupo Epiléticos-salina não ocorreu à indução da LTP em nenhuma fatia ( $103,3 \pm 0,34$   $p < 0,0001$ ). No grupo Epiléptico-CMO ocorreu à indução de LTP em 100% das fatias ( $203,9 \pm 2,04$ ,  $p = 0,0005$ ).

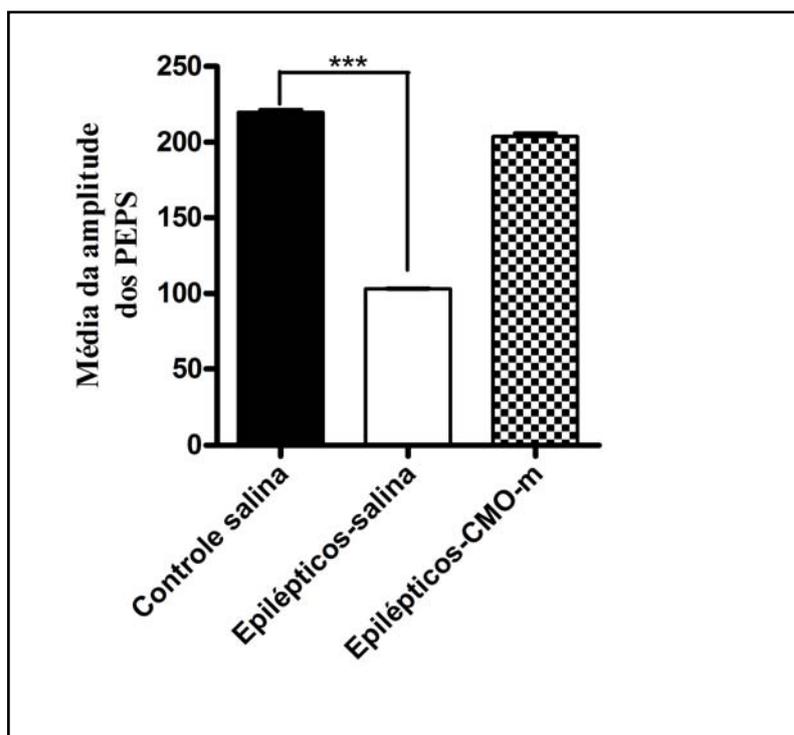


Figura 48 - Efeito das células de medula óssea sobre a indução da LTP. As barras representam a amplitude (média  $\pm$  erro padrão) de 44-48 minutos após a estimulação tetânica. A análise estatística foi realizada através do teste t dos grupos Li-pilo versus controle-salina, \*\*\* $p < 0,0001$ .

Para reduzir a variabilidade que existe entre as fatias, normalizamos os valores das inclinações do PEPS, em 100% e analisamos os dados pelo teste de Tukey após ANOVA de uma via (média  $\pm$  erro padrão). Observa-se na Figura 49 que amplitude dos PEPS após a estimulação tetânica foi significativamente menor no grupo Epilépticos-salina quando comparada com o grupo controle-salina ( $p < 0,001$ ). No entanto, a amplitude dos PEPS foi significativamente aumentada após a estimulação tetânica nas fatias do grupo epilépticos-CMO-m em comparação ao grupo controle-salina ( $p < 0,001$ ). As amplitudes dos PEPS entre os grupos Li-pilo foram extremamente significante, ( $p < 0,001$ ).

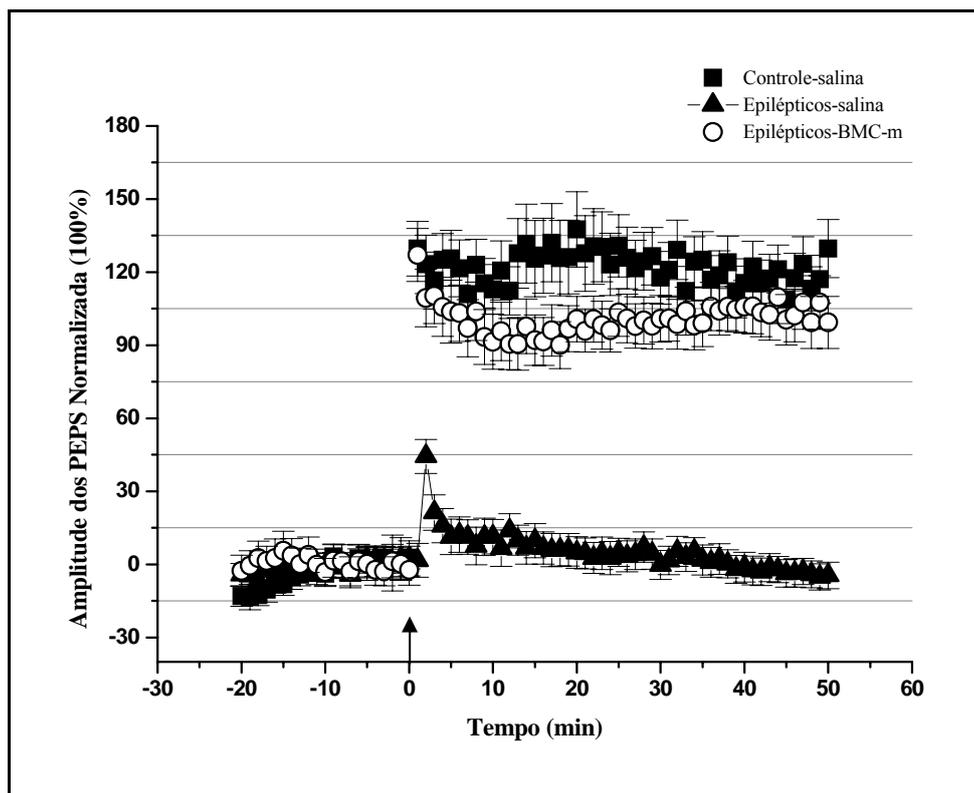


Figura 49 - Efeito das células mononucleares da medula óssea sobre a amplitude dos PEPS em ratos epilépticos e não epilépticos. Avaliados por 20 minutos de resposta basal e aplicação do estímulo de alta frequência (seta). Cada ponto no gráfico representa a média percentual das amplitudes dos PEPS (3 PEPS em 1 minuto  $\pm$  erro padrão), comparação de Tukey pós ANOVA de uma via), (controle-salina, n=14; epilépticos-salina e epilépticos-CMO-m, n=12 fatias em cada grupo).

## **II.5 Efeito das células mononucleares da medula óssea sobre o brotamento das fibras musgosas**

A análise do brotamento neuronal foi realizada aos 45 dias após o transplante dos ratos, utilizando-se a técnica de marcação histoquímica de Neo-Timm. Todos os animais destinados a este estudo que sofreram SE e foram transplantados com solução salina apresentaram brotamento das fibras musgosas, enquanto que nos animais que foram transplantados com as células mononucleares da medula óssea, observou-se que aproximadamente 60% apresentaram brotamento na camada molecular interna do hilo do giro denteado (Figura 50).

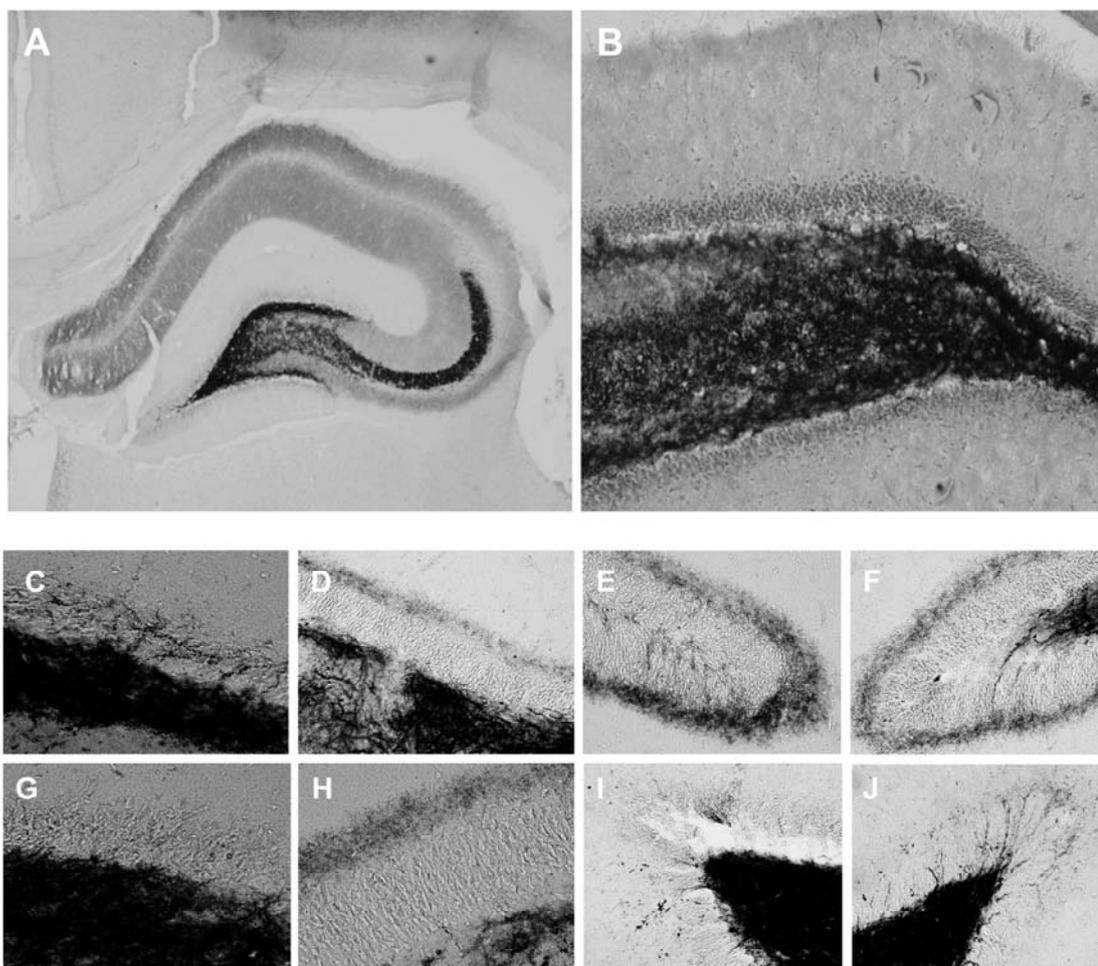


Figura 50 – Painele com microfotografias representativas do brotamento neuronal. Grupo controle-salina (A e B), grupos epiléticos transplantados 22 dias após SE, epiléticos-salina (C-F), epiléticos-CMO (G-J). Aumento de 4X1 em B, de 40x1 em A e C-J.

A Figura 51 mostra a análise quantitativa do brotamento das células musgosas, observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos epiléticos. Animais do grupo epiléticos-CMO apresentaram uma marcação menor de aproximadamente 78,6% em comparação com o grupo epiléticos-salina. A média do escore do grupo epiléticos-salina foi 1.4 (1,0-2,0), epiléticos-CMO foi 0,3 (zero-0,5) e do controle-salina foi zero, indicando a ausência de brotamento.

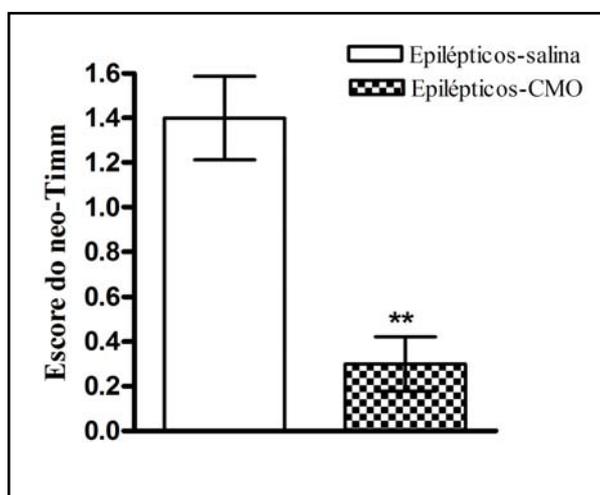


Figura 51 - Efeito das células mononucleares da medula óssea sobre o brotamento das células musgosas no giro dentado de ratos com epilepsia induzida por Li-pilo. A média do escore do grupo epilético-salina foi de 1,4 (1,0-2,0) e para epiléticos-CMO 0,3 (0-0,5), [ $p= 0,0079$ ;  $n=5$  por grupo, comparação de Mann Whitney, dados expressos em (média  $\pm$  erro padrão)]. O escore do grupo controle-salina foi zero (dado não mostrado).

**PARTE III**

**CAPITULO I**

**DISCUSSÃO**

Neste estudo, investigamos os efeitos terapêuticos das células mononucleares da medula óssea em ratos com *status epilepticus*, induzidos por lítio e pilocarpina, por que: (a) foi mostrado que as células da medula óssea poderiam gerar células neurais (revisado por MEZEY, 2007); (b) a medula óssea contém uma população de células mesenquimais com a capacidade de diferenciar em células neuronais e gliais *in vitro* (SANCHEZ-RAMOS et al., 2000; WOODBURY et al., 2000; BOSSOLASCO et al., 2005) e em *in vivo* (MAHMOOD et al., 2002; AKIYAMA et al., 2002); (c) a medula óssea é o recurso prontamente acessível de células-tronco para uma terapia, permitindo estudos transversais com o uso de células de medula óssea autólogas transplantadas em humanos (MIMEAULT, HAUKE & BATRA, 2007).

Utilizamos o modelo experimental de epilepsia induzida por lítio e pilocarpina e realizamos o transplante das células mononucleares da medula óssea na fase aguda e crônica da doença. Demonstrou-se que células mononucleares da medula óssea transplantadas em ratos epiléticos na fase aguda, inicialmente inibem as manifestações das crises, mas não as bloqueiam totalmente, visto que alguns animais apresentaram crises quando observados num período mais tardio (120 dias da indução do SE e transplante). Entretanto, observou-se que estas crises ocorriam em menor frequência e duração em comparação aos ratos epiléticos não tratados com células mononucleares da medula óssea. Nossos resultados mostram que, os animais que apresentaram crises espontâneas recorrentes e foram tratados, 22 dias após a indução do *status epilepticus*, com células mononucleares da medula óssea obtidos de dois diferentes doadores, ratos Wistar (isotransplante) e camundongos transgênicos EGFP (xenotransplante), independentemente do tipo de doador, tiveram menos crises espontâneas recorrentes por dia e com menor duração, em comparação aos animais controles epiléticos.

Estes resultados são similares àqueles previamente encontrados por outros autores. CHU e colaboradores (2004) induziram *status epilepticus* por lítio e pilocarpina em ratos, um dia após transplantaram células-tronco neuronais humanas e descrevem que entre os dias 28-35 após *status epilepticus*, a frequência das crises diminuíram no grupo tratado em ~86%. Acharya e colaboradores (2007) induziram *status epilepticus* em ratos com ácido caínico e 5 meses após, transplantaram células-tronco neuronais expandidas de ratos. Observaram uma diminuição na frequência das crises em ~50% em comparação com os controles epiléticos.

Nossos resultados confirmam que as células mononucleares da medula óssea de camundongos GFP-positivas migram para o cérebro de ratos epiléticos. Também verificamos que esta migração foi rápida, um dia após o transplante, encontramos células do doador distribuídas por todo o cérebro. Observou-se que em 10 e 120 dias após o transplante, células do doador estavam presentes na região hipocampal, e cortical, e em estruturas vasculares do plexo coróide, mas em quantidades muito pequenas. Também descobrimos que algumas células GFP-positivas co-expressaram marcadores para microglia (CD11b) e neurônios imaturos doblecortina (DCX), sugerindo um estágio intermediário de diferenciação destas células.

Nos animais transplantados aos 22 dias após o *status epilepticus*, observou-se células GFP-positivas na região do giro denteado, co-expressando o marcador neuronal NeuN. Assim como, a co-expressão do marcador glial (GFAP) no córtex entorrinal. Estes resultados são consistentes com estudos anteriores, mostrando a migração de células da medula óssea, administradas intravascularmente ou intraperitonealmente, para o cérebro de roedores e expressando marcadores específicos de neurônios e células da glia (revisado por MEZEY, 2007). Em 2000, dois grupos independentes demonstraram que células-tronco derivadas da medula óssea de humanos e roedores podem se diferenciar *in vitro* em

células-positivas para marcadores neuronais (SANCHEZ-RAMOS et al., 2000; WOODBURY, 2000 ). No mesmo ano, mais dois grupos independentes reportam similar resultados obtidos em camundongos – *in vivo* (BRAZELTON et al., 2000 e MEZEY et al., 2000) e mais tarde outros dois grupos confirmaram estes resultados em humanos (MEZEY et al., 2003 e COGLE et al., 2004). Priller e colaboradores (2001) descrevem que em camundongos irradiados letalmente e transplantados pela veia da cauda com células hematopoiéticas, em 15 semanas após o transplante células do doador foram detectadas em todo o cérebro. Neste período, 26% das microglias cerebelares eram de origem hematopoiética.

Evidências na literatura mostraram que *status epilepticus* induzido por lítio e pilocarpina leva a perda neuronal. Foi relatado que 24 horas após o *status epilepticus*, ocorre formação de edema na amígdala, córtices piriforme e entorrinal, juntamente com uma rápida e extensiva perda neuronal. Entretanto, nas regiões hipocampais a perda neuronal é mais lenta, porém progressiva; nas sub-regiões hipocampais, a morte celular ocorre mais rapidamente no hilo do giro denteado (ROCH et al., 2002a, 2002b).

Em nosso estudo, foi detectada perda neuronal crescente em 10, 45 e 120 dias na região hipocampal nos animais submetidos ao *status epilepticus* em comparação aos animais não epiléticos. No entanto, nos animais epiléticos tratados com as células mononucleares da medula óssea esta perda foi menor, independente do tempo de transplante após *status epilepticus*, este dado é compatível com a menor redução do volume total do hipocampo. Sugere-se que as células mononucleares da medula óssea exercem efeito neuroprotetor, prevenindo a perda neuronal na formação hipocampal, quando transplantadas imediatamente após o *status epilepticus* e que atenuam esta perda quando transplantadas na fase crônica.

Além disso, é possível que na fase crônica as células mononucleares da medula óssea possam ter se diferenciado em células neuronais e gliais. Assim, ambos os mecanismos podem estar contribuindo para a prevenção de perda celular no hipocampo após *status epilepticus*, em ratos tratados com células mononucleares da medula óssea.

Por outro lado, associamos a menor perda neuronal no hipocampo com o fato de que os animais tratados também mostraram menor frequência de crises espontâneas recorrentes, uma vez que, a perda celular no hipocampo está associada tanto à duração das crises quanto à presença de um insulto precipitante inicial (MATHERN et al., 2002).

Considerando que crises espontâneas recorrentes induzem a várias formas de plasticidade no giro denteado de roedores adulto, reorganização axonal, ativação de astrócito, remodelação dentrítica e dispersão das células da camada granular (revisado por PARENT, 2003), o mesmo autor e colaboradores descrevem que, crises prolongadas por *status epilepticus* induzido por quimio-convulsivantes (pilocarpina ou cainato), induzem neurogênese aberrante no giro denteado de ratos adultos (PARENT et al., 2005). E que esses novos neurônios diferenciados de células granulares do giro denteado, migram para camada molecular e hilo após o SE. Esses neurônios granulares ectópicos conservam muitos, mas não todas, das propriedades intrínsecas de células granulares. Scharfman e colaboradores (2000), examinando neurônios hilar ectópicos em fatias hipocâmpais de ratos epiléticos adultos, observaram que estas células têm muitas das características eletrofisiológicas e morfológicas das células granulares do giro denteado. Dashtipour e colaboradores (2001) descrevem que os dendritos das células ectópicas no hilo aumentam a rede de sinapses excitatórias, desta forma, explicando sua hiperexcitabilidade. Entretanto, quando são infundidos agentes antimitóticos após SE induzido por pilocarpina, esta neurogênese é inibida. Em nosso estudo, células do doador foram encontrada no GD, e algumas destas células eram NeuN-positivas. Estudos subseqüentes são necessários para

investigar porque as células do doador têm preferência pelo GD. Por outro lado, se são as crises que aumentam a proliferação de células granulares ectópicas, como descrito anteriormente, neste estudo os animais transplantados apresentavam menos crises, sugerindo que células do doador não têm relação com a gênese das células granulares ectópicas.

No mesmo contexto, a neurogênese induzida por crises aparece antes do brotamento das fibras musgosas, podendo sugerir que esses novos neurônios podem ser importantes na gênese de inervação ectópica do *cornu de Ammon* por estas fibras. Arisi e colaboradores (2007), utilizando o modelo de *status epilepticus* induzido por pilocarpina, encontraram neurogênese doublecortina-positiva e modificações das árvores dendríticas dos novos neurônios em lugares coincidentes com aqueles onde o brotamento das fibras musgosas acontece. Em nosso estudo observamos que o brotamento das fibras musgosas das células granulares foi menor em aproximadamente 78,6% nos ratos transplantados com células mononucleares da medula óssea, em comparação aos ratos epiléticos que não receberam o referido transplante. Nós relacionamos este resultado ao fato de ter ocorrido uma diminuição no número e na duração das CER, uma vez que o brotamento das células musgosas é um achado comum em animais que apresentam crises espontâneas recorrentes (DUDEK et al., 1994). Assim como, o fato de o transplante ter sido realizado aos 22 dias após o *status epilepticus* pode ter sido um fator determinante, visto que Cavalheiro e colaboradores (1991) e Mello e colaboradores (1993) descrevem que em epilepsia induzida por pilocarpina, o brotamento das fibras musgosas típico, começa na segunda semana após o *status epilepticus* e chega ao máximo dentro de 2 meses. Este resultado também está de acordo com Shetty e Turner (1997) que demonstraram que células hipocâmpais fetal administrada no hipocampo de ratos com SE induzido por ácido caínico suprimiram o brotamento das fibras musgosas.

Outro enfoque que investigamos neste trabalho foi o efeito das células mononucleares da medula óssea sobre a aquisição de memórias. Apesar de haver algumas diferenças entre os mecanismos bioquímicos envolvidos no aprendizado de novas memórias e o fenômeno da potenciação de longa duração, esta é apontada como um processo chave necessário para a formação de memórias (BLISS & COLINGRIDGE, 1993).

Os resultados apresentados neste estudo mostraram uma maior amplitude do potencial excitatório pós-sináptico em fatias hipocampais de ratos epiléticos transplantados com células mononucleares da medula óssea, ao serem comparados com as amplitudes obtidas em fatias hipocampais de ratos não tratados, em 10 e 120 dias após a SE. Curiosamente, em 120 dias não se observou diferenças significativas na indução de potenciação de longa duração, em comparação com os controles não-epiléticos.

Resultados similares foram obtidos em fatias hipocampais de ratos epiléticos tratados com células mononucleares da medula óssea aos 22 dias após a indução do *status epilepticus*, enquanto que a amplitude registrada nos ratos epiléticos sem o tratamento foi significativamente reduzida. O sucesso da indução da potenciação de longa duração nas fatias hipocampais dos ratos tratados sugerem: a) um aumento na eficiência de transmissão sináptica e/ou na excitabilidade do neurônio, após o transplante; b) as células transplantadas participam da preservação ou regeneração do circuito neurosináptico envolvido com a LTP. Portanto, estes resultados demonstram claramente que o transplante de células mononucleares da medula óssea melhora significativamente as sinapses funcionais no hipocampo de ratos epiléticos.

Recentemente, Ruschenschmidt e colaboradores (2005) avaliaram as características de precursores neurais derivados de células-tronco embrionárias de camundongos transplantados no hipocampo de ratos epiléticos crônicos e controles.

Os autores descrevem que as células do doador possuíam a capacidade de gerar potencial de ação, exibindo propriedades intrínsecas características de neurônios.

Posteriormente investigamos a memória espacial, visto que no modelo da epilepsia do lobo temporal por pilocarpina, déficits cognitivos na tarefa do labirinto aquático de Morris foram amplamente demonstrados (HORT et al., 1999, RICE et al., 1998 e WU et al., 2001). Em nosso estudo observamos que os ratos tratados com células de medula óssea foram mais eficientes, no aprendizado de localizar a plataforma de escape, em comparação com os animais não tratados. Entretanto, no teste realizado 24 horas após o último treino, na ausência da plataforma, eles apresentaram latência de escape no mesmo linear que os animais epiléticos não tratados. Este resultado foi atribuído ao fato de termos utilizado um protocolo de treino de um único dia. Mais recentemente, experimentos realizados em nosso grupo mostraram que quando se utiliza um protocolo de 5 dias de treino, durante o teste na ausência da plataforma alvo (realizado 24 horas após a última sessão de treino) os animais epiléticos tratados com células medula óssea tiveram preferência pelo quadrante alvo e apresentam latência de escape inferior ao dos animais tratados com pilocarpina que, porém, não foram transplantados (VENTURIN, 2008). Esses dados são indicativos de que as células mononucleares da medula óssea administradas a animais submetidos ao modelo lítio e pilocarpina influenciam positivamente na retenção da memória relacionada à aprendizagem do labirinto aquático de Morris.

E finalmente, com base nos dados obtidos no presente estudo, sugerimos que as células mononucleares da medula óssea têm efeito neuroprotetivo. Estudos prévios sugeriram que as células da medula óssea induzem modificações no tecido danificado através de diferentes mecanismos, como a produção de fatores neurotróficos (EATON & WHITTEMORE, 1996; RAO & MATTSON, 2001.), através da estimulação de

proliferação endógena (CHEN et al, 2003), ou através de interação de células-tronco, exógenas e endógenas, idealizadas para propiciar neuroproteção por suporte trófico (NOMURA et al., 2005). Por outro lado, células da medula óssea contêm diferentes tipos de células, incluindo células mesenquimais. Muitos estudos estabeleceram evidências de que transplantes de células mesenquimais de medula óssea causam significativa recuperação funcional em animais, após isquemia (CHEN et al., 2001; 2003; LI et al., 2001), neurite auto-imune (KRAMER et al., 1995), e doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer (STALDER et al., 2005; SIMARD et al., 2006). Zhao e colaboradores (2002) descrevem uma melhora funcional em ratos isquêmicos transplantados de células-tronco mesenquimais humana, ainda que as células transplantadas não tivessem estabelecido novos circuitos neuronais com o hospedeiro.

Por um lado, observou-se recuperação funcional em nosso estudo, na potenciação de longa duração, no labirinto aquático de Morris, na diminuição da frequência e duração das crises espontâneas recorrente, e por outro, poucas células do doador estavam presentes no cérebro. Sugere-se que estas células podem exercer um efeito agudo, persistente antes de morrerem. Células aplicadas intravenosamente podem, eventualmente, não ter que entrar no cérebro para induzir um efeito, mas preferencialmente podem agir na periferia para aumentar a expressão de fatores tróficos no cérebro, como relatado por Borlongan e colaboradores (2004).

Em suma, uma vez que a epileptogênese é um processo dinâmico com várias conseqüências e deterioração cognitiva (ENGEL, 2002; 2004), o presente estudo demonstra que o transplante de células de medula óssea, durante a fase aguda e/ou crônica da epilepsia induzida por lítio e pilocarpina, tem potencial terapêutico. Estudos subseqüentes devem ser conduzidos para esclarecer seus mecanismos de ação, permitindo-se o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para esta patologia.

**CAPITULO II****CONCLUSÕES**

O transplante de células mononucleares da medula óssea em ratos com *status epilepticus* induzido por lítio e pilocarpina possibilitou as seguintes conclusões:

1. Quando realizado logo após a indução do *status epilepticus* impede a ocorrência das crises recorrentes espontâneas quando avaliada 10 dias pós-transplante e somente 20% dos animais apresentaram crises recorrentes espontâneas aos 120 dias pós-transplante.
2. Quando realizado em animais que já têm a doença estabelecida reduz a frequência e duração das crises em aproximadamente 50%, independente do tipo de doador (isotransplante ou xenotransplante).
3. As células transplantadas foram identificadas em várias regiões do cérebro, em 24 horas pós-transplante e expressaram marcadores de microglia, astroglia, neurônios jovens e adultos.
4. A perda neuronal e o brotamento das fibras musgosas no hipocampo foram menores nos animais transplantados; mantendo-se o volume hipocampal e a capacidade de responder à indução da LTP.
5. Na avaliação da memória espacial, o desempenho dos animais transplantados foi melhor que os não transplantados durante o treino, embora a retenção aos 10 e 120 dias pós-transplante tenha sido semelhante aos não tratados.

## II.1 PERSPECTIVAS:

Este estudo tornou-se complexo pelo interesse em estudar a avaliação terapêutica em eletrofisiologia e a investigação estrutural. A necessidade de buscar evidências da migração celular e a expressão de marcadores gliais e neuronais levou-me a buscar camundongo doador transgênico e ao estudo do ciclo celular por imunohistoquímica.

Por outro lado, este estudo permitiu o desenvolvimento de nova linha de pesquisa em nosso laboratório, com vários projetos em andamento. Seguindo esta linha de pesquisa pretendo realizar outros projetos na tentativa de esclarecer o mecanismo de ação das células mononucleares da medula óssea na epilepsia experimental. Assim, pretendo (a) avaliar o potencial elétrico das células transplantadas através da técnica de *Pach clamp*, (b) avaliar se as células transplantadas integram-se ao cérebro epiléptico por diferenciação ou fusão e (c) avaliar a migração e a diferenciação celular após diferentes períodos pós-transplante celular.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ACHARYA MM, RAI KS, HATTIANGADY B ET AL. Potential of hippocampal stem/progenitor cell grafts for restraining spontaneous motor seizures during chronic temporal lobe epilepsy. Society for Neuroscience Abstracts; San Diego.:Acta Neurol Scand. 2004;110(5):291-300.

AGGARWAL S, PITTENGER MFB. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;15;105(4):1815-22.

AKIYAMA, Y., RADTKE, C. AND KOCSIS, J.D. Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow stromal cells. *J Neurosci*. 2002; 22:6623–6630.

AKMAN CI, HU Y, FU DD, HOLMES GL. The influence of cognitive reserve on seizure-induced injury. *Epilepsy Behav*. 2003; 4(4):435-40.

AMARAL DG, WITTER MP. The three dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*. 1989; 31:571-591.

ANDERSON AE, HRACHOVY RA, ANTALFFY BA, Armstrong DL, Swann JW A chronic focal epilepsy with mossy fiber sprouting follows recurrent seizures induced by intrahippocampal tetanus toxin injection in infant rats. *Neuroscience*. 1999; 92:73-82.

ANDREWS PW, MATIN MM, BAHRAMI AR, DAMJANOV I, GOKHALE P, DRAPER JS. Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin. *Biochem Soc Trans*. 2005; 33(Pt 6):1526-30.

ANGELERI F, MAJKOWSKI J, CACCHIÒ G, SOBIESZEK A, D'ACUNTO S, GESUITA R, BACHLEDA A, POLONARA G, KRÓLICKI L, SIGNORINO M, SALVOLINI U. Posttraumatic epilepsy risk factors: one-year prospective study after head injury. *Epilepsia*. 1999; 40(9):1222-30.

ARIDA RM, SCORZA FA, DOS SANTOS NF, PERES CA, CAVALHEIRO EA. Effect of physical exercise on seizure occurrence in a model of temporal lobe epilepsy in rats. *Epilepsy Res*. 1999; 37(1):45-52.

ARISI GM, GARCIA-CAIRASCO N. Doublecortin-positive newly born granule cells of hippocampus have abnormal apical dendritic morphology in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Brain Res*. 2007; (24)1165:126-34.

ASAHARA T, KAWAMOTO A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004; 287(3):C572-9.

AVANZINI G, FRANCESCHETTI S. Prospects for novel antiepileptic drugs. *Curr Opin Investig Drugs*. 2003; 4(7):805-14.

BABB TL & BROWN WJ. Neuronal, dendritic, and vascular profiles of human temporal lobe epilepsy correlated with cellular physiology in vivo. *Adv Neurol*. 1986; 44:949-66.

BEN-ARI Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*. 1985; 14:375-403.

BEN-ARI & REPRESA A. Brief seizure episodes induce long-term potentiation and mossy fibre sprouting in the hippocampus. *Trends Neurosci.* 1990; 13(8):312-8.

BENARDO LS. Prevention of epilepsy after head trauma: do we need new drugs or a new approach? *Epilepsia.* 2003; 44 (Suppl 10):27-33.

BJORNSON CR, RIETZE RL, REYNOLDS BA, MAGLI MC, VESCOVI AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science.* 1999; 22; 283(5401):534-7.

BLISS TV & LOMO T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path, *J. Physiol.* 1973; 232:331–356.

BLISS TVP & COLLINGRIDGE GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature.* 1993; 361:31-39.

BLÜMCKE I, BECK H, LIE AA, WIESTLER OD. Molecular neuropathology of human mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 1999; 36(2-3):205-23.

BORLONGAN CV, HADMAN M, SANBERG CD, SANBERG PR. Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke. *Stroke.* 2004; 35(10):2385-9.

BOSSOLASCO, P., COVA, L., CALZAROSSA, C., RIMOLDI, S.G., BORSOTTI C., DELILIERI G.L. ET AL. Neuro-glial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro, *Exp Neurol.* 2005; 93:312–325.

BRAZELTON TR., ROSSI FMV, KESHET GI, BLAU HM. From marrow to brain expression of neural phenotypes in adult mice, *Science.* 2000; 290:1775–1779.

BROWN TH & ZADOR AM. Hippocampus (Shepherd GM Ed) *The Synaptic Organization of the Brain*, Oxford University Press, New York. 1990. pp 346-388.

BRYDER D, ROSSI DJ, WEISSMAN IL. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol.* 2006; 169(2):338-46. Erratum in: *Am J Pathol.* 2006.

CAPLAN AI & DENNIS JE. Links Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem.* 2006; 98(5):1076-84.

CAVALHEIRO EA, LEITE J.P, BORTOLOTTO ZA, TURSKI WA, IKONOMIDOU C, TURSKI L. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia.* 1991; 32:778–782.

CAVALHEIRO A, VARGAS MA, ARMSTRONG SR, DAWSON DV, GRATTON DG. Effect of incorrect primer application on dentin permeability. *J Adhes Dent.* 2006; 8(6):393-400.

CAVAZOS JE & SUTULA TP. Progressive neuronal loss induced by kindling: a possible mechanism for mossy fiber synaptic reorganization and hippocampal sclerosis. *Brain Research*.1990; 527:1-6.

CHEN J, LI Y, KATAKOWSKI M, CHEN X, WANG L, LU D, LU M, GAUTAM SC, CHOPP M. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *Journal of Neuroscience Research*. 2003 73:778–786.

CHEN YT, LI W, HAYASHIDA Y, HE H, CHEN SY, TSENG DY, KHEIRKHAH A, TSENG SC. Human amniotic epithelial cells as novel feeder layers for promoting ex vivo expansion of limbal epithelial progenitor cells. *Stem Cells*. 2007; 25(8):1995-2005.

CLIFFORD DB, OLNEY JW, MANIOTIS A, COLLINS RC, ZORUMSKI CF. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. *Neuroscience*. 1987; 23:953-68.

CHU K, KIM M, JUNG KH, JEON D, LEE ST, KIM J, JEONG SW, KIM SU, LEE SK, SHIN HS, ROH JK. Human neural stem cell transplantation reduces spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus in adult rats. *Brain Research*. 2004; 1023; (2), 15:213-221.

COCKERELL OC, JOHNSON AL, SANDER JW, SHORVON SD. Prognosis of epilepsy: a review and further analysis of the first nine years of the British National General Practice Study of Epilepsy, a prospective population-based study. *Epilepsia*. 1997; 38:31-46.

COLLINGRIDGE GL, BLISS TVP. Memories of NMDA receptors and LTP. *TINS* 1995; 18:54–56.

COTMAN CW, KAHLE JS (1997) *Synaptic Plasticity* (George Adelman, Barry Smith Eds) *Encyclopedia of Neuroscience* — CD-rom Elsevier Science BV.

COULTER DA. Sprouted Mossy Fibers Form Primarily Excitatory Connections. *Epilepsy Curr*. 2002; 2(6):194-195.

COVOLAN L & MELLO LE. Temporal profile of neuronal injury following pilocarpine or kainic acid-induced status epilepticus. *Epilepsy Res*. 2000; 39:133-152.

CRONIN J & DUDEK FE. Chronic seizures and collateral sprouting of dentate mossy fibers after kainic acid treatment in rats. *Brain Res*; 1988; 474:181-184.

CRONIN J, OBENAU A, HOUSER CR, DUDEK FE. Electrophysiology of dentate granule cells after kainate-induced synaptic reorganization of mossy fibers. *Brain Res*. 1992; 573:305-310.

CRUZ-ORIVE LM. On the estimation of particle number. *J Microsc*. 1980; 120:15-27.

Da COSTA J C, Palmmini A, Yacubian EMT, Cavalheiro E. Fundamentos neurobiológicos das epilepsias Aspectos clínicos e cirúrgicos. 1998; (1), 3:149-161. São Paulo: Lemos editorial.

DALBEM, A; SILVEIRA, CV; PEDROSO, MF; BREDA, RV; BAES, CVW; BARTMANN, AP; DA COSTA, JC. Altered distribution of striatal activity-dependent synaptic plasticity in the 3-nitropropionic acid model of Huntington's disease. *Brain Research*. 2005; 1047:148-158.

DANSCHER G. HISTOCHEMICAL DEMONSTRATION OF HEAVY METALS. A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electronmicroscopy. *Histochemistry*. 1981; 71:1-16.

DASHTIPOUR K, TRAN P H., OKAZAKI, M M., NADLER, J. V, RIBAK, C. E. Ultrastructural features and synaptic connections of hilar ectopic granule cells in the rat dentate gyrus are different from those of granule cells in the granule cell layer. *Brain Research*. 2001; 890, 2:261-271.

DASHTIPOUR K, YAN XX, DINH TT, OKAZAKI MM, NADLER JV, RIBAK CE. Quantitative and morphological analysis of dentate granule cells with recurrent basal dendrites from normal and epileptic rats. *Hippocampus*. 2002; 12(2):235-44.

DEANS RJ & MOSELEY AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*. 2000; 28(8):875-84.

DE OLIVEIRA ALVARES L, GENRO BP, VAZ BREDA R, PEDROSO MF, DA COSTA JC, QUILLFELDT JA. AM251, a selective antagonist of the CB1 receptor, inhibits the induction of long-term potentiation and induces retrograde amnesia in rats. *Brain Res*. 2006; 1075(1):60-7.

DEXTER TM. Stromal cell associated haemopoiesis. *J Cell Physiol Suppl*. 1982; 1:87-94.

DOMEN J & WEISSMAN IL. Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate. *Mol Med Today*. 1999; 5(5):201-8.

DRAPER JS, MOORE HD, RUBAN LN ET AL. Culture and characterization of human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2004; 13:325-336.

DUDEK FE, OBENAU A, SCHWEITZER JS, WUARIN JP. Functional significance of hippocampal plasticity in epileptic brain: electrophysiological changes of the dentate granule cells associated with mossy fiber sprouting. *Hippocampus*. 1994; 4(3):259-65.

EATON MJ & WHITTEMORE SR. Autocrine BDNF secretion enhances the survival and serotonergic differentiation of raphe neuronal precursor cells grafted into the adult rat CNS. *Exp Neurol*. 1996; 140(2):105-14.

EGLITIS MA. & MEZEY E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci*. 1997; 94:4080-4085.

ELMÉR E, KOKAIA Z, KOKAIA M, LINDVALL O, MCINTYRE DC. Mossy fiber sprouting: evidence against a facilitatory role in epileptogenesis. *NeuroReport*. 1997; 8:1193-1196.

ENGEL JJ. Clinical neurophysiology, neuroimaging, and the surgical treatment of epilepsy. *Curr Opin Neurol Neurosurg*. 1993; 6(2):240-9.

ENGEL J JR & PEDLEY TA. Introduction: what is epilepsy?. IN:Engel JJr,Pedley TA (Eds) *Epilepsy: A Comprehensive Textbook* Lippincott-Raven Publishers, 1997. p. 1-7.

ENGEL J. Multimodal approaches in the evaluation of epileptic patients for surgery. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*. 1997; 103(1):5.

ENGEL J, BABB, T.L. AND CRANDALL, P.H. Surgical treatment of epilepsy: opportunities for research into basic mechanisms of human brain function. *Acta Neurochirug. Suppl*. 1989; 46:3-8.

ENGEL J. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology, *Epilepsia*. 2001; 42:796-803.

ENGEL J. So what can we conclude — do seizures damage the brain? *Progress in Brain Research*, 2002; 135:509-512.

ENGEL J. Models of focal epilepsy. *Suppl Clin Neurophysiol*. 2004; 57:392-9.

HORT, J., BROZEK, G., MARES, P., LANGMEIER, M. AND KOMAREK, V. Cognitive functions after pilocarpine-induced status epilepticus? Changes during silent period precede appearance of spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia*. 1999; 40:1177-1183.

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

FISHER RS, ESKOLA J, BLUM D, KERRIGAN JF, DRAZKOWSKI JMD., DUNCAN B "Open label pilot study of oxcarbazepine for inpatients under evaluation for epilepsy surgery" *Drug Development research*. 1998; 38:43-49.

FISHER RS, van EMDE BOAS W, BLUME W, ELGER C, GENTON P, LEE P, ENGEL J JR. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*. 2005; 46(4):470-2.

FRANCK JE, POKORNY J , KUNKEL DD, SCHWARTZKROIN, PA. Physiologic and Morphologic Characteristics of Granule Cell Circuitry in Human Epileptic Hippocampus. *Epilepsia*. 1995; (36) 6:543-558.

FROTSCHER M, HEIMRICH B, DELLER T. Sprouting in the hippocampus is layer-specific. *TINS*. 1997; 20:218-223.

GALLAGHER M, BURWELL R, BURCHINAL M. Severity of spatial learning impairment in aging: development of a learning index for performance in the Morris water maze. *Behav Neurosci.* 1993;107(4):618-26.

GAGE FH, BUZSÁKI G, ARMSTRONG DM. NGF-dependent sprouting and regeneration in the hippocampus. *Prog Brain Res.* 1990; 83:357-70.

GAGE FH. Mammalian neural stem cells. *Science.* 2000; 287(5457):1433-8.

GARCÍA-FIÑANA M. & CRUZ-ORIVE LM. New approximations for the efficiency of Cavalieri sampling. *J. Microsc.* 2000; 199:224–238.

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

GASTAUT H, GASTAUT JL, GONÇALVES E SILVA GE, FERNANDEZ SANCHEZ GR. Relative frequency of different types of epilepsy: a study employing the classification of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia.* 1975; 16(3):457-61.

GARZILLO CL, MELLO LE. Characterization of reactive astrocytes in the chronic phase of the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsia.* 2002; 43(5):107-9.

GEDDES JW & COTMAN CW. Plasticity in hippocampal excitatory amino acid receptors in Alzheimer disease. *Neurosci Res.* 1986; 3:672-678.

GLENNIE S, SOEIRO I, DYSON PJ, LAM J, LAM EWF, DAZZI F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood.* 2005; 105, (7):2821-2827.

GOULD E, BEYLIN A, TANAPAT P, REEVES A, SHORS TJ. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci.* 1999; 2 (3):260-265.

GOULD E, MCEWEN BS, TANAPAT P, GALEA LA, FUCHS E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci.* 1997; 17(7):2492-2498.

GOULD E, TANAPAT P, MCEWEN BS, FLÜGGE G, FUCHS E. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 17; 95(6):3168-3171.

GUNDERSEN HJ, BAGGER P, BENDTSEN TF, EVANS SM, KORBO L, MARCUSSEN N, MØLLER A, NIELSEN K, NYENGAARD JR, PAKKENBERG B, et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS.* 1988; 96(10):857-881

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

HATTIANGADY B, RAO MS, SHETTY AK. Chronic temporal lobe epilepsy is associated with severely declined dentate neurogenesis in the adult hippocampus. *Neurobiol Dis* 2004; 17:473 – 490.

HENDRIKS MP, ALDENKAMP AP, ALPHERTS WC, ELLIS J, VERMEULEN J, VAN DER VLUGT H. Relationships between epilepsy-related factors and memory impairment. *Acta Neurol Scand*. 2004; 110 (5):291-300.

HERZOG EL, CHAI L & KRAUSE DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*. 102; (10):3483-3493.

HICKEY WF & KIMURA H. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *SCIENCE*.1998; 239:290-292.

HIRSCH E, BARAM TZ, SNEAD OC 3RD. Ontogenic study of lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Brain Res*. 1992; 26; 583(1-2):120-126.

Houser CR. Morphological changes in the dentate gyrus in human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res Suppl*. 1992; 7:223-234.

IANUS A, HOLZ G.G, THEISE N.D, HUSSAIN M.A. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest*. 2003; 111:843–850.

INSAUSTI R, AMARAL DG, COWAN WM. The entorhinal cortex of the monkey: II Cortical afferents. *J Comp Neurol*. 1987; 264:356-395.

INSAUSTI AM, MEGÍAS M, CRESPO D, CRUZ-ORIVE LM, DIERSSEN M, VALLINA IF, INSAUSTI R, FLÓREZ J. Hippocampal volume and neuronal number in Ts65Dn mice: a murine model of Down syndrome. *Neurosci Lett*.1998; 253(3): 175-178.

ISOKAWA M. Remodeling dendritic spines in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Neurosci Lett*. 1998; 258(Pt 2):73-76.

IZQUIERDO LA, BARROS DM, MEDINA JH, IZQUIERDO I. Exposure to novelty enhances retrieval of very remote memory in rats. *Neurobiol Learn Mem*. 2003; 79(1):51-56.

IZQUIERDO, I. *Memória*. Artmed, Porto Alegre. 2002.

IZQUIERDO I, BARROS DM, MELLO-E-SOUZA T, SOUZA MM, IZQUIERDO LA, MEDINA JH. Mechanisms of memory types differ. *Nature*. 1998; 393:635-636.

JACKSON K.A., S.M. MAJKA, H. M.A. GOODELL. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*. 2001; 107:1395–1402.

KAPLAN MS, HINDS JW. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science*. 1977; 9; 197(4308):1092-1094.

KOYAMA R, IKEGAYA Y. Mossy fiber sprouting as a potential therapeutic target for epilepsy. *Current Neurovascular Research*. 2004; 1:3-10.

KIM CF, JACKSON EL, WOOLFENDEN AE, LAWRENCE S, BABAR I, VOGEL S, CROWLEY D, BRONSON RT, JACKS T. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell*. 2005; 121:823-835.

KONDO M, WAGERS AJ, MANZ MG, PROHASKA SS, SCHERER DC, BEILHACK GF, SHIZURU JA, WEISSMAN IL. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol*. 2003; 21:759-806.

KOPEN GC, PROCKOP DJ, PHINNEY DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(19):10711-10716.

KORBLING M, ESTROV Z, CHAMPLIN R. Adult stem cells and tissue repair, *Bone Marrow Transplant*. 2003; 1:S23-S24.

KRAMPERA M, PIZZOLO G, APRILI G, FRANCHINI M. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone*. 2006; 39(4):678-683.

KRAMPERA M; PASINI A, PIZZOLO G, COSMI L, ROMAGNANI S, ANNUNZIATO F. Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. *Curr Opin Pharmacol*. 2006; 6(4):435-441.

KRAUSE DS, THEISE ND, COLLECTOR MI, HENEGARIU O, HWANG S, GARDNER R, NEUTZEL S, SHARKIS SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*. 2001; 105:369-377.

KRAMER R, ZHANG Y, GEHRMANN J, GOLD R, THOENEN H, WEKERLE H. Gene transfer through the blood-nerve barrier: NGF-engineered neuritogenic T lymphocytes attenuate experimental autoimmune neuritis. *Nat Med*. 1995; 1(11):1162-1166.

LAGASSE E, CONNORS H, AL-DHALIMY M, REITSMA M, DOHSE M, OSBORNE L, WANG X, FINEGOLD M, WEISSMAN IL, GROMPE M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature Med*. 2000; 6:1229-1234.

LAURBERG S, ZIMMER J. Lesion-induced sprouting of hippocampal mossy fiber collaterals to the fascia dentata in developing and adult rats. *J Comp Neurol*. 1981; 200(3):433-459.

LANSKRON SM, COLLECTOR MI, SHNKIS SJ. Hematopoietic stem cell tracking in vivo: a comparison of short-term and long-term repopulating cells. *Blood*. 1999; 93:1916-1921.

LEITE J P, CAVALHEIRO EA. Effects of conventional antiepileptic drugs in a model of spontaneous recurrent seizures in rats. *Epilepsy Research*. 1995; 20(2):93-104.

LEMOS T, CAVALHEIRO EA. Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats. *Exper Brain Res.* 1995; 102:423-428.

LI Y, CHEN J, WANG L, LU M, CHOPP M. Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells. *Neurology.* 2001; 56(12):1666-16672.

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

LÖSCHER W. Animal models of intractable epilepsy. *Prog Neurobiol.* 1997; 53(2):239-258.

LÖSCHER W. Current status and future directions in the pharmacotherapy of epilepsy. *Trends in Pharmacological Science.* 2002; 23(3):113-118.

RAO MS & MATTSON MP. Stem cells and aging: expanding the possibilities. *Mechanisms of Ageing and Development.* 2001; 122(7):713-734.

MAHMOOD A, LU D, WANG L, CHOPP M. Intracerebral transplantation of marrow stromal cells cultured with neurotrophic factors promotes functional recovery in adult rats subjected to traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2002; 19:1609–1617.

MALENKA RC & NICOLL RA. Long-term potentiation--a decade of progress? *Science.* 1999; 17; 285(5435):1870-1874.

MAREN S, BAUDRY M. Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationships to learning and memory. *Neurobiol Learn Mem.* 1995; 63(1):1-18.

MATHERN G, ANDELSON PD, CAHAN LD, LEITE JP. Hippocampal neuron damage in human epilepsy: Meyers hypothesis revisited. *Progress in Brain Research.* 2002; 135:237-251.

MARGERISON JH, CORSELLIS JAN. Epilepsy and the temporal lobes: A clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. *Brain.* 1966; 89:499-530.

ISOKAWA M. Remodeling Dendritic Spines of Dentate Granule Cells in Temporal Lobe Epilepsy Patients and the Rat Pilocarpine Model. *Epilepsia.* 2000; 41(s6):S14-S17.

MASUYA M, DRAKE CJ, FLEMING PA, REILLY CM, ZENG H, HILL WD, MARTIN-STUDDARD A, HESS DC, OGAWA M, Hematopoietic origin of glomerular mesangial cells. *Blood.* 2003;101:2215–2218.

McEWEN K. Making waves: what Mary Glover taught us! *Axone.* 2001; 23(2):8-12.

MCKAY R. Stem cells and the cellular organization of the brain. *J Neurosci Res* 2000; 59:298–300.

- MCKAY R. Stem cells in the central nervous system. *Science*. 1997; 4; 276(5309):66-71.
- MCKINNEY RA, DEBANNE D, GÄHWILER BH, THOMPSON SM. Lesion-induced axonal sprouting and hyperexcitability in the hippocampus in vitro: implications for the genesis of post-traumatic epilepsy. *Nature Med*. 1997; 3:990-996.
- MEBERG PJ & ROUTTENBERG A. Selective expression of protein F1/(GAP-43) mRNA in pyramidal but not granule cells of the hippocampus. *Neuroscience*. 1991; 45(3):721-733.
- MEDINA JH & IZQUIERDO I. Involvement of the hippocampus, amygdala, entorhinal cortex and posterior parietal cortex in memory consolidation. *Braz J Med Biol Res*. 1997; 30(2):235-240.
- MELDRUM B. Amino acid neurotransmitters and new approaches to anticonvulsant drug action. *Epilepsia*. 1984; 25 (2):S140-149.
- MELDRUM BS & BRUTON CJ (Adams JH, Duchen, LW Eds) *Greenfield's Neuropathology* Edward Arnold, London, Melbourne, Auckland. 1992; pp1246-1283.
- MELDRUM BS. Antiepileptic drugs potentiating GABA. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl*. 1999; 50:450-457.
- MELLO LE, CAVALHEIRO EA, TAN AM, KUPFER WR, PRETORIUS JK, BABB T.L AND FINCH D.M., Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia*. 1993:985-995.
- MEZEY E ET AL. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000; 290:1779-1782.
- MEZEY E, & CHANDROSS KJ. Bone marrow: a possible alternative source of cells in the adult nervous system. *European Journal of Pharmacology*. 2000; 405 (1-3):297-302.
- MEZEY E. Bone marrow-derived stem cells in neurological diseases: stones or masons? *Regenerative Med*. 2007; 2(1), 37-49.
- MEZEY E, KEY S, VOGELSANG G, SZALAYOVA I, LANGE GD, CRAIN B. Transplanted bone marrow generates new neurons in the human brains, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003; 100:1364-1369.
- MIMEAULT M & BATRA SK. Recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. *Stem Cells*. 2006; 24(11):2319-2345.
- MIMEAULT M, HAUKE R, BATRA SK. Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. *Clin Pharmacol Ther*. 2007; 82(3):252-264.
- MORRIS GM, GARRUD P, RAWLINS JNP, 'KEEFE JO "Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions". *Nature*. 1982; (297):681-683

MORRIS RG, HAGAN JJ, RAWLINS JN. Allocentric spatial learning by hippocampectomised rats: a further test of the "spatial mapping" and "working memory" theories of hippocampal function. *Q J Exp Psychol B*. 1986; 38(4):365-395.

MORRISON SJ, HEMMATI HD, WANDYCZ AM, WEISSMAN IL. The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92:10302-10306.

MOURITZEN-DAM A. Epilepsy and neuron loss in the hippocampus. *Epilepsia*. 1980; 21:617-629.

NADLER J, PERRY B, GENTRY C, COTMAN C. Loss and reacquisition of hippocampal synapses after selective destruction of CA3-CA4 efferents with kainic acid. *Brain Res* 1980; 191:387-403.

NISHIO S, MORIOKA T, HISADA K, FUKUI M. Temporal lobe epilepsy: a clinicopathological study with special reference to temporal neocortical changes. *Neurosurg Rev*. 2000; 23 (2):84-89.

NOMURA T, HONMOU O, HARADA K, HOUKIN K, HAMADA H, KOCSIS JD. I.v. infusion of brain-derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. *Neuroscience*. 2005; 136 (1):161-169.

OBENAU A, ESCLAPEZ M, HOUSER CR. Loss of glutamate decarboxylase mRNA-containing neurons in the rat dentate gyrus following pilocarpine-induced seizures. *J Neurosci* 1993; 13:4470-4485.

OKAZAKI MM, EVENSON DA, NADLER JV. Hippocampal mossy fiber sprouting and synapse formation after status epilepticus in rats: visualization after retrograde transport of biocytin. *J Comp Neurol*. 1995; 352:515-534.

OKAZAKI MM, NADLER JV. Antidromically-evoked NMDA synaptic currents in dentate granule cells from rats with and without recurrent mossy fiber growth. *Soc Neurosci Abst*. 1997; 23:2155.

O'KEEFE J & NADEL L. *The Hippocampus as a Cognitive Map*, Clarendon Press, Oxford. 1978.

ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, JAKONIUK I, ANDERSON SM, LI B, PICKEL J, MCKAY R, NADAL-GINARD B, BODINE DM, LERI A, ANVERSA P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001; 410:701-705.

OSAWA M, HANADA K, HAMADA H, NAKAUCHI H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*. 1996; 273:242-245.

PAGNI CA, ZENGA F. Prevention and treatment of post-traumatic epilepsy. *Expert Rev Neurother*. 2006; 6(8):1223-33.

PARENT JM, YU TW, LIBOWITZ RT, GESCHWIND DH, SLOVITER RS, LOWENSTEIN DH. Dentate Granule Cell Neurogenesis Is Increased by Seizures and Contributes to Aberrant Network Reorganization in the Adult Rat Hippocampus. 1997; 17, 10, (15):3727-3738.

PARENT JM. Injury-induced neurogenesis in the adult mammalian brain, *Neuroscientist*. 2003; 9:261–272.

PARENT JM. When newborn neurons stray. *Epilepsy Curr*. 2005; 5(6):231-3.

PARENT JM. Adult neurogenesis in the intact and epileptic dentate gyrus. *Prog Brain Res*. 2007; 63:529-40.

PAXINOS G & WATSON C. The rat brain in stereotaxic coordinates (2<sup>nd</sup> ed.). San Diego: Academic Press, 1986.

PETERSEN BE, BOWEN WC, PATRENE KD, MARS WM, SULLIVAN AK, MURASE N, BOGGS SS, GREENBERGER JS, GOFF JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*. 1999; 284:1168–1170.

PITTINGER MF, MACKAY AM, BECK SC, JAISWAL RK, DOUGLAS R, MOSCA JD, MOORMAN MA, SIMONETTI DW, CRAIG S, MARSHAK DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999. 2; 284(5411):143-7.

PITTINGER MF & MARTIN BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res*. 2004, 95(1):9-20.

PITTINGER MF. Mesenchymal stem cells from adult bone marrow. *Methods Mol Biol*. 2008; 449:27-44.

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

RAMÍREZ-AMAYA V, ALVAREZ-BORDA B, ORMSBY CE, MARTÍNEZ RD, PÉREZ-MONTFORT R, BERMÚDEZ-RATTONI F. Insular cortex lesions impair the acquisition of conditioned immunosuppression. *Brain Behav Immun*. 1996; 10(2):103-14.

RIBAK CE, TRAN PH, SPIGELMAN I, OKAZAKI MM, NADLER JV. Status epilepticus-induced hilar basal dendrites on rodent granule cells contribute to recurrent excitatory circuitry. *J. Comp. Neurol*. 20004; 28:240-253.

RIBAK CE, KORN MJ, SHAN Z, OBENAU A. Dendritic growth cones and recurrent basal dendrites are typical features of newly-generated dentate granule cells in the adult hippocampus. *Brain Res*. 2004; 1000:195-199.

ROBERTS PE. Failure of GABAergic inhibition: a key to local and global seizures. 1986. In: *Basic Mechanisms of the Epilepsies: Molecular and cellular approaches*. Delgado-Escueta AV, Ward AAJ, Woodbury DM, Porter RJ, (eds), p 319-341. New York: Raven Press.

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

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

RAMÍREZ-AMAYA V, ESCOBAR ML, CHAO V, BERMÚDEZ-RATTONI F. Spatial Long-Term Memory Is Related to Mossy Fiber Synaptogenesis *Neuroscience*. 2001; 21(18):7340-7348.

RATZLIFF AH, SANTHAKUMAR V, HOWARD A, SOLTESZ I. Mossy cells in epilepsy: rigor mortis or vigor mortis?. *Trends Neurosci*. 2002; 25(3):140-144.

RIGOULOT MA, KONING E, FERRANDON A, NEHLIG A. Neuroprotective properties of topiramate in the lithium-pilocarpine model of epilepsy. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004; 308(2):787-795.

RODRIGUES AL, ARTENI NS, ABEL C, ZYLBERSZTEJN D, CHAZAN R, VIOLA G, XAVIER L, ACHAVAL M, NETTO CA. Tactile stimulation and maternal separation prevent hippocampal damage in rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. *Brain Res*. 2004; 1002(1-2):94-99.

ROGAWSKI MA & PORTER RJ. "Antiepileptic drugs: pharmacological mechanisms and clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds. *Pharmacol Rev*. 1990; 42(3):223-286.

ROGAWSKI MA & DONEVAN SD. AMPA receptors in epilepsy and as targets for antiepileptic drugs. *Adv Neurol*. 1999; 79:947-963.

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

RICE, AC, FLOYD CL, LYETH BG, HAMM RJ, DELORENZO, RJ. Status epilepticus causes long-term NMDA receptor-dependent behavioural changes and cognitive deficits. *Epilepsia*. 1998; 39:1148–1157.

ROCH C, LEROY C, NEHLIG A, NAMER IJ. Magnetic resonance imaging in the study of the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in adult rats. *Epilepsia*. 2002a; 43:325–335.

ROCH C, LEROY C, NEHLIG A, NAMER IJ. Predictive value of cortical injury for the development of temporal lobe epilepsy in 21-day-old rats: an MRI approach using the lithium-pilocarpine model. *Epilepsia*. 2002b; 43(10):1129-1136.

SALAMONI SD, DA COSTA JC, PALMA MS, KONNO K, NIHEI K, AZAMBUJA NA, NETO EP, VENTURIN GT, TAVARES AA, DE ABREU DS, BREDA RV. "Antiepileptic effect of acylpolyaminetoxin JSTX-3 on rat hippocampal CA1 neurons in vitro." *Brain Res*. 2005;1048 (1-2):170-176

SANCHEZ-RAMOS J., SONG S., CARDOZO-PELAEZ F., HAZZI C., STEDEFORD T. and Willing A. et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro, *Exp Neurol*. 2000; 164:247–256.

SANTOS AMGD."aprendizagem e memória no labirinto aquático de morris".Técnicas para o Estudo do Sistema Nervoso: 1999; 131-239.

SCHATTEMAN GC, DUNNWALD M, JIAO C. Biology of bone marrow-derived endothelial cell precursors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 292(1):H1-18.

SCHARFMAN HE, GOODMAN JH, SOLLAS AL. Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis. *J Neurosci*. 2000; 20(16):6144-58

SIMARD AR & RIVEST S. Neuroprotective properties of the innate immune system and bone marrow stem cells in Alzheimer's disease. *Molecular Psychiatry*. 2006; 11:327–335.

SEKI T & ARAI Y. Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat. *J Neurosci*. 1993; 13(6):2351-2358.

SHETTY AK & HATTIANGADY B. Prospects of Stem Cell Therapy for Temporal Lobe Epilepsy. *Stem Cells*. 2007; 25:2396 -2407.

SHETTY AK, TURNER DA. Fetal hippocampal cells grafted to kainatelesioned CA3 region of adult hippocampus suppress aberrant supragranular sprouting of host mossy fibers. *Exp Neurol* 1997; 143:231–245.

SHETTY AK & HATTIANGADY B. Survival and differentiation of stem/progenitor cells from the postnatal hippocampus following grafting into the intact or injured young adult and aged hippocampus. *Society for Neuroscience Abstracts*. 2006; 1016.

SLOVITER RS. Decreased hippocampal inhibition and selective loss of interneurons in experimental epilepsy. *Science*.1987; 235:73-76.

SLOVITER RS. Permanently altered hippocampal structure, excitability, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: the “dormant basket cell” hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy. *Hippocampus*. 1991; 1:41-66.

SOLTER D. From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. *Nat Rev Genet*. 2006; 7(4):319-327.

SPIGELMAN I, YAN XX, OBENAU A, LEE EY, WASTERLAIN CG, RIBAK CE. Dentate granule cells form novel basal dendrites in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*. 1998; 86(1):109-120.

SQUIRE LR. & KANDEL ER. Memória: da mente às moléculas. Artmed, Porto Alegre, 2003.

STALDER K., ERMINI F., BONDOLFI L., KRENGER W., BURBACH G.J., DELLER T., COOMARASWAMY J., STAUFENBIEL M., LANDMANN R. AND JUCKER M. Invasion of hematopoietic cells into the brain of amyloid precursor protein transgenic mice, *J. Neurosci.* 2005; 25:11125–11132.

STATLER KD. Pediatric posttraumatic seizures: epidemiology, putative mechanisms of epileptogenesis and promising investigational progress. *Dev Neurosci.* 2006; 28(4-5):354-363.

STERIO DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the dissector. *J. Microsc* 1984; 134:127-136.

STEWART AND MORRIS, The watermaze In: *Behavioural Neuroscience-A Practical Approach*, (Sahgal, A) Volume I Oxford University Press, New York, 1993.

SUTULA T, XIAO-XIAN H, CAVAZOS J, SCOTT G. Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. *Science.* 1988; 239:1147-1150.

SUTULA T, CASCINO G, CAVAZOS J, PARADA I, RAMIRES L. Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *Annals of Neurology.* 1989; 26:321-330.

SZILVASSY & STEPHEN J. The biology of hematopoietic stem cells. *Archives of Medical Research.* 2003; 34 (6):446-460.

TAUCK DL & NADLER JV. Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. *J Neurosci.* 1985; 5:1016-1022.

TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, NARITA M, ICHISAKA T, TOMODA, K, YAMANAKA S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell.* 2007; 131:861-872.

TREIB J, HAASS A, GRAUER MT. High-velocity bullet causing indirect trauma to the brain and symptomatic epilepsy. *Mil Med.* 1996; 161(1):61-64.

TREMBLAY E & BEN-ARI Y. Usefulness of parenteral kainic acid as a model of temporal lobe epilepsy. *Rev Electroencephalogr Neurophysiol Clin.* 1984; 14(3):241-246.

TROUNSON A. The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. *Endocr Rev.* 2006; 27(2):208-219.

TURSKI WA, CAVALHEIRO EA, SCHWARZ M, CZUCZWAR SJ, KLEINROK Z, TURSKI L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res.* 1983; 9(Pt 3):315-335.

TURSKI L, IKONOMIDOU C, TURSKI WA, BORTOLOTTA ZA, CAVALHEIRO EA. Cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: A novel experimental model of intractable epilepsy, *Synapse.* 1989; 3:154-171.

van PRAAG H, SCHINDER AF, CHRISTIE BR, TONI N, PALMER TD, GAGE FH. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*. 2002; 28; 415(6875):1030-1034.

VENTURIN, GT. 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. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Departamento de Neurociências. 2008, pp 91. Porto Alegre. BR-RS.

VERFAILLIE CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol*. 2002; 12(11):502-8.

WHETTON AD & GRAHAM GJ. Homing and mobilization in the stem cell niche. *Trends Cell Biol*. 1999; 9(6):233-238.

WOODBURY D, SCHWARZ EJ, PROCKOP DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res*. 2000; 61:364–370.

WRIGHT DE, WAGERS AJ, GULATI AP, JOHNSON FL, WEISSMAN IL. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science*. 2001; 294(5548):1933-1936.

WILSON A & TRUMPP A. Bone-Marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat. Rev. Immunol*. 2006; 6:93-106.

WU CL, HUANG LT, LIOU CW, WANG TJ, TUNG YR, HSU HY, LAI MC. Lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in immature rats result in long term deficits in spatial learning and hippocampal cell loss. *Neurosci. Lett*. 2001; 312:113–117.

WUARIN J & DUDEK E. Electrographic seizures and new recurrent excitatory circuits in the dentate gyrus of hippocampal slices from kainate-treated epileptic rats. *J Neurosci*. 1996; 16:4438-4448.

ZIGMOND MJ. When it comes to communications between neurons, synapses are over-rated: insights from an animal model of parkinsonism. *Prog Brain Res*. 2000;125:317-326.

ZHAO LR, DUAN WM, REYES M, KEENE CD, VERFAILLIE, CM, LOW WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats, *Exp. Neurol*. 2002; 174:11-20.

ZOLA-MORGAM S, SQUIRE LR, CLOWER RP, REMPEL NL. Damage to the perirhinal cortex exacerbates memory impairment following lesions to the hippocampal formation. *J Neurosci*. 1993; 13:251-265.

## ARTIGO CIENTÍFICO

A parte dos resultados apresentados nesta Tese de Doutorado referentes ao Grupo Agudo está submetida à revista STEM CELLS, conforme segue abaixo, enquanto que a parte dos resultados referente ao Grupo Crônico está para ser submetida em breve.

**From:** Editors@StemCells.com

**To:** jcc@pucls.br

**Cc:** annmurphy@alphamedpress.com, christenbrady@alphamedpress.com, lesliebroberg@alphamedpress.com

**Subject:** Your Stem Cells submission has been received

**Body:** Dear Dr. DaCosta:

This confirms receipt of your manuscript, "REORGANIZATION OF HIPPOCAMPAL FUNCTIONS AND PREVENTION OF SEIZURES BY TRANSPLANTATION OF BONE MARROW CELLS IN THE ACUTE PHASE OF EXPERIMENTAL EPILEPSY."

The Stem Cells Editorial Office will begin processing your submission as soon as possible. However, submissions that do not include the completed required forms and permissions, or those that deviate from file requirements of no more than seven figures or tables, will be delayed until all the requirements are met. If you have not done so, please review our submission information here: <http://stemcells.alphamedpress.org/misc/ifora.shtml>.

If you find that you have not met all of our requirements, you are welcome to email Christen Brady ([christenbrady@alphamedpress.com](mailto:christenbrady@alphamedpress.com)) in our office to outline your plan for completing or amending your submission. Please be sure to refer to your assigned manuscript number: SC-08-0619.

Thank you for your submission. We wish you continued progress in your important research.

Sincerely,

Donald G. Phinney, Ph.D.  
Miodrag Stojkovic, Ph.D.  
Co-Editors  
Stem Cells

**Date Sent:** 30-Jun-2008