

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

GIANINA TERIBELE VENTURIN

**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**

PORTO ALEGRE, 2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**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**

Gianina Teribele Venturin

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Neurociências.

Porto Alegre, 2008

Aos meus pais e irmão, Ildo, Miriam e
Gianfrancesco: vocês são minha vida,
meu exemplo, minha inspiração.

AGRADECIMENTOS

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

Ao professor Martín Cammarota por abrir as portas de seu laboratório para a execução de parte deste trabalho, mas também pela paciência e ajuda na solução de todo tipo de problema, sempre com grandes conselhos.

Aos professores Ricardo Ribeiro dos Santos e Milena Soares da Fiocruz – Bahia por tão gentilmente cederem camundongos transgênicos, primordiais para este estudo.

À Simone Salamoni pela acolhida calorosa de todo dia, entusiasmo contagiante e apoio incondicional. Aprendi muito contigo e continuo aprendendo. Sinto-me muito honrada e privilegiada por ter tua amizade. Obrigada por tudo.

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

Agradeço especialmente a Samuel e Daniela, meus dois braços direitos na realização desse trabalho; Ricardo e Zuzete pela força na resolução de problemas insolúveis para mim e pela constante disposição em ajudar; Daniel pelo grande apoio na reta final; Raquel, Simone de Paula e Fernanda Noal obrigada pela amizade e carinho, saibam que a recíproca é muito verdadeira.

Aos biólogos Christian Viezzer e Jeremiah Lubianca pela colaboração fundamental em preparar as células da medula óssea.

A todo o grupo do Centro de Memória, em especial Weber e Janine, sempre prestativos durante os testes comportamentais.

À Nelcy por sua infinita paciência e disposição em ajudar.

À UFRGS, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências pela oportunidade de desenvolver o mestrado.

Às secretárias, professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Neurociências pelo convívio, ensinamentos e atendimento sempre atencioso.

A todos os familiares e amigos que sempre me incentivaram a ir adiante e sempre acreditaram em mim, especialmente meu primo, quase irmão, Diogo, minha grande amiga Cristina e minha querida cunhada Camila.

Ali, que mesmo à distância sempre se manteve como um grande entusiasta e incentivador. Obrigada por seu amor, companheirismo e apoio.

Hobbes, meu amigo do peito, obrigada.

Ao meu irmão, Gianfrancesco pelo sorriso e carinho de sempre, e também pelo exemplo de luta e coragem.

Aos meus pais, Ildo e Miriam, obrigada, devo a vocês tudo o que sou.

Ao CNPq pela bolsa concedida e Decit/SCTIE/MS, CAPES, CNPq e Bauducco pelo apoio financeiro.

*“Science may set limits to knowledge,
but should not set limits to imagination.”*

Bertrand Russell

RESUMO

A epilepsia atinge cerca de 1% da população mundial, sendo que aproximadamente 30% desses pacientes não respondem ao tratamento medicamentoso. Por sua vez, as células-tronco representam uma esperança de tratamento da epilepsia, visto que têm grande capacidade de proliferação, diferenciação e regeneração de tecidos, podendo restaurar circuitos neurais e restabelecer a excitabilidade neuronal fisiológica. O objetivo deste estudo é verificar se as células mononucleares da medula óssea (CMMO) apresentam potencial terapêutico no controle das crises epiléticas e do dano neuronal progressivo induzido pela epilepsia experimental. Os animais foram injetados com lítio-pilocarpina (127 mg/kg e 60 Mg/kg i.p., respectivamente) para indução de status epilepticus (SE). As crises comportamentais foram classificadas de acordo com a escala de Racine e a duração do SE foi controlada com diazepam (10 mg/kg, i.p., 90 minutos). Os animais controle receberam solução salina. Após 22 dias, o total dos animais foi dividido em quatro grupos: Pilocarpina; Pilocarpina + CMMO, Salina e Salina + CMMO. Os grupos CMMO receberam transplante de células da camada mononuclear da medula óssea, obtidas de camundongos EGFP C57BL/6, via veia caudal (10^7 células, 200 μ L), e os demais salina. Os animais tratados com pilocarpina foram monitorados por vídeo durante sete dias pré-transplante e outros catorze dias após o procedimento, para observação e computação de crises espontâneas recorrentes (CERs). Ainda, 45 dias depois da injeção das células os animais foram avaliados na tarefa do labirinto aquático de Morris (LAM) e a seguir na tarefa de reconhecimento de objetos, e logo após utilizou-se o teste do eletrochoque máximo para avaliação do limiar convulsivo. Decorridos sete meses do transplante os animais foram sacrificados e foram coletados os hipocampus direito e esquerdo, e amostras de cerebelo, bulbo olfatório, coração, pulmão e fígado para análise da presença de EGFP por PCR. Nossos resultados demonstram que os animais tratados com pilocarpina que receberam injeção de CMMO têm melhor desempenho no LAM quando comparados com o grupo pilocarpina. Esta melhora foi significativa durante o primeiro e último dias de treino, e também durante o teste em todos os parâmetros avaliados: latência, número de cruzamentos e permanência no quadrante alvo. Ainda, as CMMO

reduziram o número de crises. Entretanto, na tarefa de reconhecimento de objetos e no teste do eletrochoque máximo não há diferença entre os animais epiléticos tratados ou não com CMMO. Finalmente, não foram detectadas bandas correspondentes à EGFP em nenhuma das amostras estudadas. Nos últimos anos, estudos que buscam tratamentos baseados em células-tronco para as mais diversas doenças neurodegenerativas foram vistos com muito interesse. Este tipo de tratamento pode ser útil também no tratamento da epilepsia crônica, dado o potencial que estas células têm de, independentemente do mecanismo, restaurar o micro ambiente neuronal e re-estabelecer a excitabilidade neuronal fisiológica.

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

ABSTRACT

Epilepsy affects 1% of the world population and 30% of these patients are refractory to medication now available. Stem cells host hope in the treatment of epilepsy. Given their ability to proliferate, differentiate and regenerate tissues they could fix neural circuits and reestablish the physiological excitability of neurons. This study aimed to verify the therapeutic potential of bone marrow mononuclear cells (BMMC) on seizure control and on progressive neuronal loss induced by experimental epilepsy. Experimental *status epilepticus* (SE) was induced by lithium-pilocarpine injection (127 mg/kg; ip and 60 mg/kg; ip respectively). Seizures were scored by Racine's scale. The duration of SE was controlled with diazepam (10mg/kg; ip; 90 minutes after SE onset). Control animals received saline other than pilocarpine. Twenty-two days after SE, rats were randomly assigned into four groups: Pilocarpina; Pilocarpine+BMMC; Control and Control+BMMC. BMMC groups received cell transplantation (obtained from EGFP C57BL/6 mice) via tail vein (10^7 cells, 200 μ L). The other groups received saline in the same volume. Pilocarpine-treated animals were monitored for the presence of spontaneous seizures for 21 days (7 prior to cell transplant and 14 afterwards). Forty-five days after transplant rats underwent cognitive evaluation in the object recognition task and the Morris water maze (MWM), followed by the maximal electroshock test to evaluate seizure threshold. Rats were sacrificed seven months after transplantation. The hippocampi, cerebellum, olfactory bulb, and samples of the heart, lung and liver were collected in order to verify the presence of EGFP using PCR. Our results demonstrate that pilocarpine-treated rats injected with BMMC perform better in the MWM when compared to pilocarpine only. This difference was significant in the first and last training days and during the probe trial, when we evaluated the escape latency, time in target quadrant and number of crossings. In addition, seizure frequency was reduced by BMMC. Despite that, in the object recognition task and in the maximal electroshock test no difference was found between epileptic rats treated with BMMC or saline. Finally, we didn't detect the presence of EGFP in any of the analyzed samples. During the last years much has been done to study the application of stem cells in several neurodegenerative diseases. This kind of approach can also be valid in the treatment of chronic

epilepsy, given these cells have the potential of, whichever the mechanism might be, restore the neuronal micro environment and reestablish neuronal physiological excitability.

Keywords: Epilepsy, stem cells, behavioral tests.

LISTA DE ABREVIATURAS

BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro.
CERs	Crises espontâneas recorrentes.
CMMO	Células mononucleares da medula óssea.
CTMO	Células-tronco da medula óssea.
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGFP	Proteína verde fluorescente
ELT	Epilepsia do lobo temporal.
EMT	Esclerose mesial temporal.
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto.
GD	Giro denteado.
GDNF	Fator neurotrófico derivado de célula glial.
LAM	Labirinto aquático de Morris.
PCR	Reação em cadeia da polimerase.
MO	Medula óssea.
SE	<i>Status epilepticus.</i>

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Comparação entre hipocampo humano normal e esclerótico..	20
Figura 2 – Comparação entre ressonância magnética e histopatologia 24 h, 14 dias e 9 semanas após administração de lítio-pilocarpina.	25
Figura 3 – Plasticidade das células-tronco da medula óssea.	29
Figura 4 – Delineamento do estudo.	39
Figura 5 – Escala de Racine	40
Figura 6 – Obtenção de CMMO de camundongos C57BL/6-EGFP	41
Figura 7 – Vista geral do labirinto aquático.	45
Figura 8 – Animal durante treino na tarefa de reconhecimento de objetos.	47
Figura 9 – Equipamento de estimulação intra-auricular	49
Figura 10 – Teste do eletrochoque máximo em um animal controle.	50
Figura 11 – Média de CREs durante o período pré-transplante.	56
Figura 12 – Média de CREs durante o período pós-transplante A.	56
Figura 13 – Média de CREs durante o período pós-transplante B.	57
Figura 14 – Média de CERs dos animais do Grupo I durante os períodos pré-transplante e pós-transplante A e B.	58
Figura 15 – Média de CERs dos animais do Grupo II durante os períodos pré-transplante e pós-transplante A e B.	58
Figura 16 – Tratamento com CMMO melhora aquisição de memória espacial em ratos epilépticos.	61
Figura 17 – Animais tratados com CMMO têm preferência pelo quadrante alvo.	62
Figura 18 – Animais epilépticos tratados com CMMO cruzam mais vezes aro alvo em comparação com não-tratados.	63
Figura 19 – Animais epilépticos tratados com CMMO alcançam a plataforma virtual mais rapidamente do que não-tratados.	64
Figura 20 – Velocidade de natação durante o teste é comparável entre os grupos.	65
Figura 21 – O tratamento com lítio-pilocarpina impede a consolidação de memória de reconhecimento de longa duração, e as CMMO não revertem esse processo	66

Figura 22 – O tratamento com pilocarpina reduz o limiar convulsivo no teste do eletrochoque máximo, e a injeção de CMMO não leva o limiar elevado em animais epiléticos67

Tabela 1 – Constituição dos grupos a partir do tratamento com pilocarpina (PILO) e/ou células mononucleares da medula óssea (CMMO)..... 39

Tabela 2 – Freqüência de CERs no grupo I (PILO).....59

Tabela 3 – Freqüência de CERs no grupo II (PILO + CMMO)...59

SUMÁRIO

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
1.1 EPILEPSIA.....	16
1.2 EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL (ELT).....	18
1.3 MODELOS EXPERIMENTAIS	21
1.3.1 Modelo experimental de epilepsia induzida por pilocarpina	22
1.3.2 Modelo de epilepsia induzida por lítio-pilocarpina.....	24
1.4 CÉLULAS-TRONCO	26
1.4.1 Células-tronco da medula óssea (CTMO).....	30
1.4.2 Terapia celular no tratamento de doenças do sistema nervoso.....	31
1.4.3 Terapia celular no tratamento da epilepsia	32
2 OBJETIVOS	35
2.1 OBJETIVO GERAL	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 ANIMAIS	37
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	38
3.3 INDUÇÃO DA EPILEPSIA	40
3.4 PREPARAÇÃO DAS CMMO	40
3.5 MONITORAMENTOS DAS CRISES ESPONTÂNEAS RECORRENTES...	42
3.6 AVALIAÇÃO COGNITIVA	43
3.6.1 Labirinto aquático de Morris.....	44
3.6.2 Paradigma de reconhecimento de objetos.....	46
3.7 AVALIAÇÃO DO LIMIAR CONVULSIVO ATRAVÉS DO TESTE DO ELETROCHOQUE MÁXIMO.....	48
3.8 DETECÇÃO POR PCR DA EXPRESSÃO DE EGFP DAS CMMO TRANSPLANTADAS.....	50
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53

4 RESULTADOS	54
4.1 INDUÇÃO DE EPILEPSIA PELO MODELO LÍTIO-PILOCARPINA	54
4.2 AS CMMO REDUZEM CERs INDUZIDAS PELO LÍTIO-PILOCARPINA	55
4.3 O TRATAMENTO COM CMMO REVERTE O DÉFICIT COGNITIVO ASSOACIADO AO DANO HIPOCAMPAL PRODUZIDO PELO LÍTIO-PILOCARPINA	60
4.4 O TRATAMENTO COM LÍTIO-PILOCARPINA BLOQUEIA A MEMÓRIA DE LONGA DURAÇÃO NO PARADIGMA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS E AS CMMO NÃO REVERTEM O DÉFICIT COGNITIVO ASSOCIADO A ESTA TAREFA	65
4.5 O TRATAMENTO COM LÍTIO PILOCARPINA DIMINUI O LIMIAR CONVULSIVO NO TESTE DO ELETROCHOQUE MÁXIMO	66
4.6 NÃO HÁ PRESENÇA DETECTÁVEL DE DNA EXPRESSANDO EGFP NAS AMOSTRAS RETIRADAS DOS ANIMAIS QUE RECEBERAM CMMO SETE MESES APÓS O TRANSPLANTE	68
DISCUSSÃO.....	69
CONCLUSÕES.....	79
PERSPECTIVAS FUTURAS	80
REFERÊNCIAS	81

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Epilepsia

A epilepsia compreende uma ampla categoria de síndromes caracterizadas por crises espontâneas e recorrentes, resultantes de um disparo intenso, sincronizado e rítmico de populações neuronais no sistema nervoso central e de excitabilidade excessiva, na ausência de condição tóxico-metabólica ou febril (Gastaut 1973; Rogawski e Porter 1990; McNamara 1994). O seu desenvolvimento é resultado de um insulto prejudicial, podendo ser um trauma crânio-encefálico, doença cerebrovascular, tumor cerebral, infecções do SNC, convulsões febris, anóxia, distúrbios metabólicos ou *status epilepticus* (SE), este último compreendendo a situação na qual o indivíduo apresenta crises suficientemente prolongadas ou repetidas em intervalos curtos que resultam em um estado epiléptico contínuo e duradouro (Gastaut, 1973). Quase todas as doenças que atingem a substância cinzenta, algumas de substância branca (ex: doenças metabólicas) e numerosas doenças sistêmicas podem causar crises epiléticas. Três fatores causais podem estar envolvidos: predisposição individual, presença de lesão

epileptogênica cerebral e alterações bioquímicas ou elétricas cerebrais (Guerreiro *et al.*, 2000).

Apesar dos dados acerca da frequência de ocorrência de epilepsia serem muito variáveis, dadas as dificuldades metodológicas – desde definição de epilepsia até a fonte de obtenção dos dados – estima-se que a incidência de epilepsia atinja cerca de 1% da população nos países desenvolvidos e cerca de 2% nos países em desenvolvimento (Engel 2001; Sander e Hart 1999).

A característica principal da epilepsia é a presença de crises recorrentes. Porém, há muitos tipos de crises epiléticas, algumas das quais podem ser facilmente confundidas com sintomas de outras doenças. Assim, são muito importantes a classificação e descrição detalhada das crises epiléticas. A classificação das epilepsias e das síndromes epiléticas é baseada nas semelhanças em relação ao tipo de crise, idade de início, sinais clínicos ou neurológicos associados, histórico familiar, padrões eletroencefalográficos e prognóstico. Assim, são descritos vários tipos diferentes de epilepsias, somando em torno de 40 tipos distintos que constam no quadro de classificação internacional da epilepsia e síndromes epiléticas (Engel, 2001; Engel, 2006).

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

Dentro desse panorama, torna-se fundamental que sejam estudadas e disponibilizadas novas alternativas terapêuticas, entre elas a terapia com células-tronco.

1. 2 Epilepsia do Lobo Temporal (ELT)

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

As crises do lobo temporal tendem a seguir uma seqüência de eventos relativamente fixa. Um fenômeno clínico bastante comum nos pacientes com ELT é a presença da aura na fase ictal, ou seja, imediatamente antes do início da crise epiléptica. Esta consiste de uma sensação de mal epigástrico ascendente, sensações dismnésticas (*déjà vu*) e psíquicas – medo súbito desproposital, alucinações olfatórias e gustativas. As manifestações decorrentes das crises parciais

complexas, que geralmente duram 1 a 2 minutos, iniciam com parada de atividade, olhar fixo não responsivo, postura distônica, automatismos oroalimentares e motores estereotipados. Após a remissão da crise, o paciente pode apresentar desorientação, amnésia do evento, déficit de memória recente e afasia. Uma avaliação neuropsicológica do paciente com ELT pode revelar distúrbios de memória. Esta disfunção é proporcional ao grau de atrofia das estruturas mesiais, sobretudo do hipocampo (Yacubian, 1998).

Na maioria das ELT (60-65%) há comprometimento das estruturas mesiais do lobo temporal, estabelecendo-se a esclerose mesial temporal (EMT) (Leite e Cavalheiro, 1998). As principais modificações fisiopatológicas da EMT incluem morte neuronal, gliose reativa, brotamentos de colaterais axônicas das células granulares (fibras musgosas) na região da camada molecular interna do giro denteado, alterações na morfologia e localização dos dendritos, e neurogênese na camada subgranular do giro denteado (Guedes *et al.*, 2006; Blümcke *et al.*, 1999; Blümcke *et al.* 2002).

A perda de sub-populações neuronais específicas é uma característica de diversos distúrbios neurológicos, e em grande parte dos casos de epilepsia do lobo temporal ocorre extensiva perda neuronal dentro de regiões específicas do hipocampo. Em estudos sobre a EMT, observou-se uma perda neuronal gradual nos vários subcampos hipocâmpais (Figura 1) atingindo em ordem decrescente: CA1 e setor de Sommer (pró-subículo); hilo do giro denteado (GD) e CA3; células granulares do GD e CA2 (Blümcke *et al.* 1999). Também aparece perda neuronal em outras áreas mesiais temporais como na camada III do córtex entorrinal (DU *et al.* 1993) e no núcleo lateral da amígdala (Pitckämen *et al.* 1998).

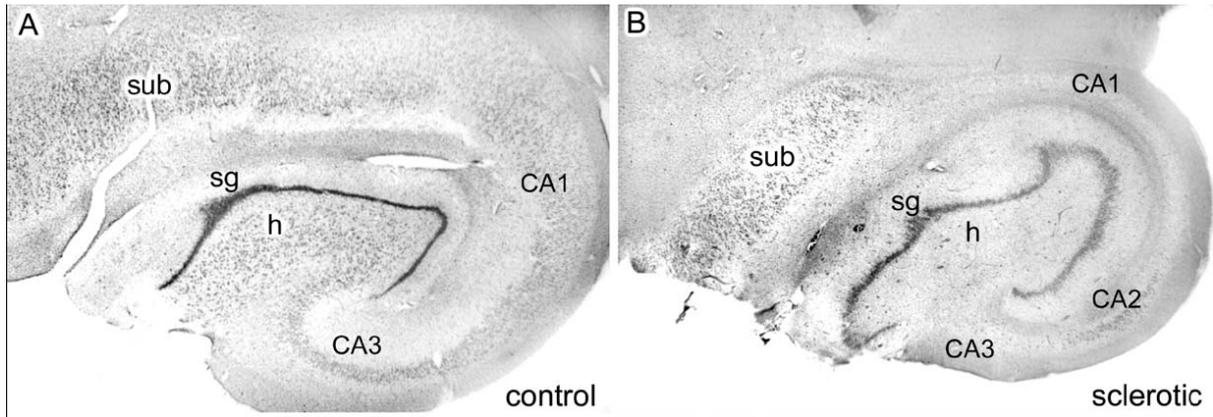


Figura 1 - Comparação entre hipocampo humano normal e esclerótico. Em A: Espécimen de autópsia controle mostrando hipocampo humano normal. Em B: Esclerose hipocampal em Espécimen cirúrgico, com perda neuronal extensiva no hilo (h) e nas áreas de CA3 e CA1, e sobrevivência de neurônios de CA2 e subiculares (sub). Fonte: Sloviter 2005.

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

1.3 Modelos Experimentais

Existem numerosos modelos animais de epilepsia ou de crises epilépticas. Os principais induzem uma cascata de eventos moleculares e estruturais que resultam em modificações nas propriedades neuronais intrínsecas, bem como nas redes neuronais, tornando-as epileptogênicas. Nos modelos denominados agudos, o animal apresenta crises convulsivas somente durante a ação do agente indutor, enquanto que nos modelos ditos crônicos as crises ocorrem a intervalos variados de tempo após a indução, podendo acompanhar toda a vida do animal (Cavalheiro *et al.*, 1991; Sanabria e Cavalheiro, 2000).

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

Os modelos de epilepsia adquirida são muito usados no estudo da patofisiologia da epilepsia, bem como na pesquisa de alvos para prevenção dessa doença. Da mesma forma, as crises induzidas por estes modelos podem ser usadas para a busca de tratamentos mais eficazes para epilepsias refratárias. Em comparação com os modelos de epilepsia adquirida, a maioria dos modelos genéticos são modelos de epilepsia generalizada que têm sido mais úteis para a

compreensão dos mecanismos básicos da epilepsia do que para o estudo de novas possibilidades terapêuticas (Löscher 2002a).

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

1.3.1 Modelo Experimental de Epilepsia Induzida por Pilocarpina

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

durante uma crise epiléptica, bem como alterações morfológicas idênticas às observadas em tecido epiléptico humano (Cavalheiro *et al.*, 1991).

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

A partir da ativação de muitos neurônios durante o SE induzido pela PILO, ocorre uma ativação secundária do sistema glutamatérgico e assim, excitotoxicidade no hipocampo e demais estruturas. O dano neuronal excitotóxico agudo associado a outras alterações moleculares leva a morte neuronal, mecanismos de reorganização sináptica, sinaptogênese e neurogênese no giro denteado, bem como mudanças nas propriedades eletrofisiológicas neuronais. Alterações decorrentes na circuitaria hipocampal compõem um quadro permanente de epileptogênese (Sanabria e Cavalheiro, 2000).

Ao receber PILO, os animais ficam em SE duradouro, ou seja, há persistência de crises contínuas durante, no mínimo, 30 minutos. Os ratos apresentam crises epilépticas de intensidade variável, caracterizadas por imobilidade, tremor, automatismo bucofaciais, abalos de extremidades, ataxia e crises tônico-clônicas.

Esta crise aguda é seguida por um período silencioso, com normalização progressiva do EEG, sendo uma fase em que o animal permanece sem crises comportamentais e que dura em média de 14 a 25 dias. A partir daí, surgem crises epiléticas espontâneas recorrentes, caracterizando a fase crônica. (Cavalheiro *et al.*, 1991).

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

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

1.3.2 Modelo de Epilepsia Induzida por Lítio-Pilocarpina

Ao modelo epileptogênico da PILO tem sido acrescentado lítio, uma vez que este é responsável por potencializar a habilidade da PILO na indução do SE, incrementando a morte neuronal seletiva inerente à epilepsia (Figura 2), possivelmente por uma *up-*

regulation da síntese dos receptores dopaminérgicos e dos receptores colinérgicos muscarínicos. (De Bruin *et al.* 2000). O pré-tratamento com cloreto de lítio antes da injeção de pilocarpina pode reduzir a dose necessária desta em até 10 vezes. Ainda, as manifestações comportamentais agudas e o padrão de lesão induzido pela crise após altas doses de pilocarpina ou pelo modelo lítio-pilocarpina são muito parecidos (Löscher, 2002a).

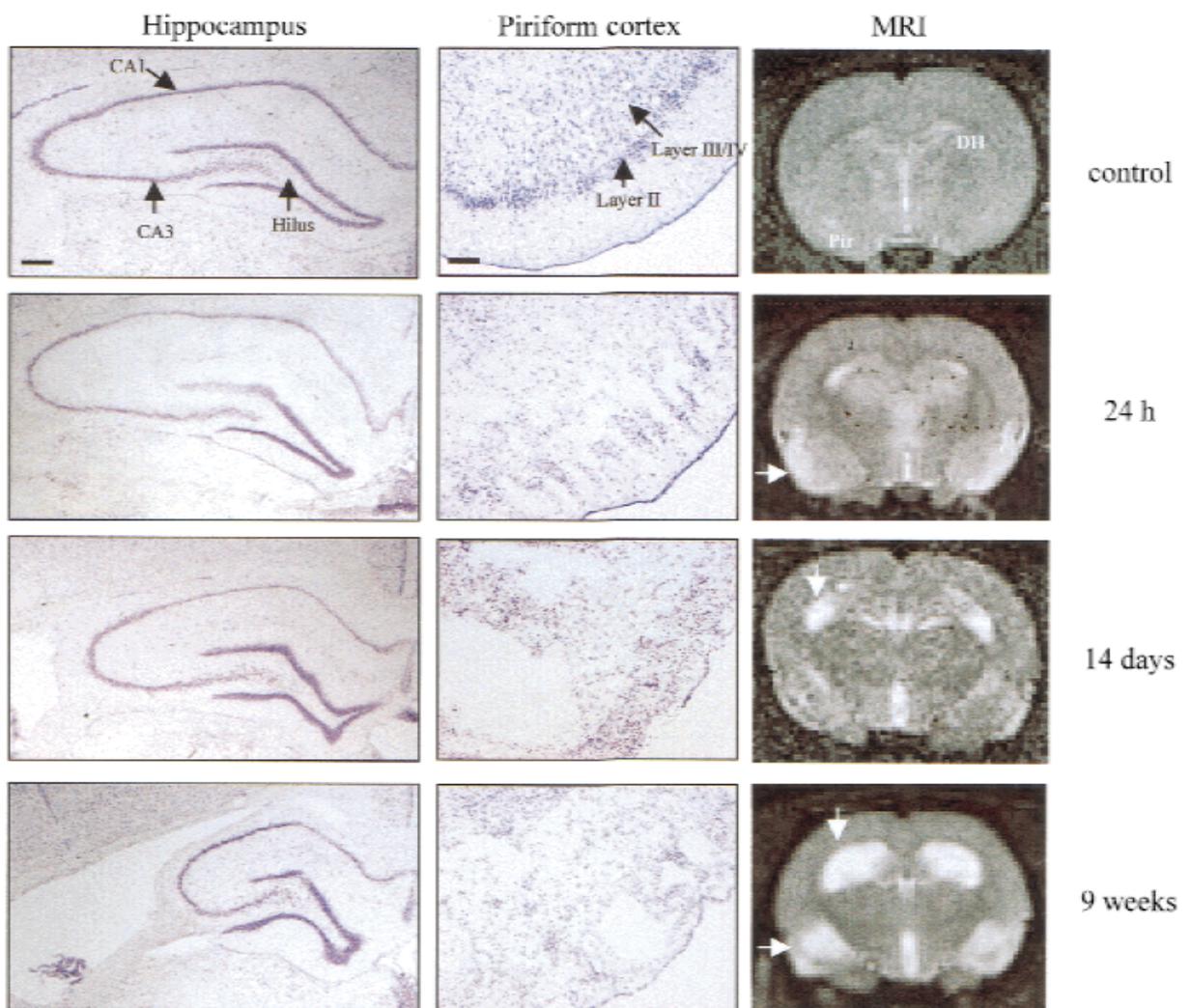


Figura 2 – Comparação entre ressonância magnética e histopatologia 24 h, 14 dias e 9 semanas após administração de lítio-pilocarpina: a esclerose hipocámpal se desenvolve progressivamente acompanhando o hiper-sinal na ressonância magnética. Fonte Roch *et al.* 2002.

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

1.4 Células-tronco

Durante a embriogênese, um único oócito fertilizado dá origem a um organismo multicelular cujas células e tecidos adotam características ou têm destinos diferentes para dar a cada órgão do corpo suas estrutura e funções específicas. À medida que o embrião se desenvolve, as células vão proliferando, permitindo que os tecidos e órgãos cresçam. Mas mesmo quando um animal já está completamente desenvolvido, muitos tecidos e células mantêm um processo conhecido como homeostase, onde células que morrem, seja por morte natural ou lesão, precisam ser substituídas. Esta característica notável tem origem filogenética muito antiga, e mesmo que pareça que durante a evolução os mamíferos perderam uma parte desta plasticidade, seu fígado, por exemplo, pode regenerar-se parcialmente (se a lesão não for muito grave). Outros exemplos disso são a epiderme e o sistema hematopoiético. A incrível capacidade que certos tecidos têm de regenerar-se durante a vida ou a de um embrião de diversificar-se são um resultado direto das células-tronco (Fuchs e Segre 2000).

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

As células-tronco são em geral classificadas como células-tronco embrionárias e células-tronco “adultas” ou somáticas. As células-tronco embrionárias são derivadas do blastocisto e são consideradas pluripotentes, isto é, têm a capacidade de originar células derivadas das três camadas germinativas: mesoderma, endoderma e ectoderma. Já as células-tronco adultas ou somáticas são células indiferenciadas que, no entanto, se encontram em tecidos diferenciados (especializados). Essas células são responsáveis pelo reabastecimento tecidual ao longo da vida e estão presentes na maioria dos tecidos, tais como, o sangue, a pele, o fígado, o coração e o cérebro. (Kaji e Leiden; 2001) Tipicamente, as células-tronco geram tipos celulares intermediários antes de se diferenciar completamente. A célula intermediária é chamada célula precursora ou célula progenitora. As células precursoras nos tecidos fetal ou adultos são células parcialmente diferenciadas que se dividem e dão origem a células diferenciadas (revisado por Morrison *et al.*, 1997).

As células-tronco “adultas” são melhor denominadas como somáticas por encontrarem-se na intimidade dos tecidos do corpo (soma). Acreditava-se que estas células teriam opções mais restritas de diferenciação, podendo selecionar um programa de diferenciação dentre apenas poucas vias possíveis, ou seja, já

comprometidas com determinada linhagem celular, não seriam pluripotentes à exemplo das embrionárias. Atualmente discute-se até que ponto isso é verdade, já que evidências apontam que estas células poderiam sim, ignorar as restrições de sua linhagem específica, transdiferenciando-se em células com origem germinativa distinta. Exemplos disto são os estudos de Bjornson e colaboradores (Bjornson *et al.* 1999) que demonstraram que células isoladas a partir do encéfalo de camundongos transgênicos podem se diferenciar em células hematopoiéticas bem como os achados de Mezey e col. (Mezey *et al.* 2000), os quais comprovaram que células da medula óssea diferenciam-se em células que expressam marcadores neuronais.

Neste mesmo sentido, muito se tem estudado sobre a plasticidade das células-tronco da medula óssea (CTMOs) e sua habilidade em selecionar linhagens atípicas quando colocadas em ambientes não-hematopoiéticos (Figura 3). Por exemplo, quando implantadas no encéfalo de ratos, células da medula óssea humanas não se transdiferenciaram em neurônios, mas perderam algumas de suas características e migraram por vias bem estabelecidas de migração neuronal (Azizi *et al.*, 1998).

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

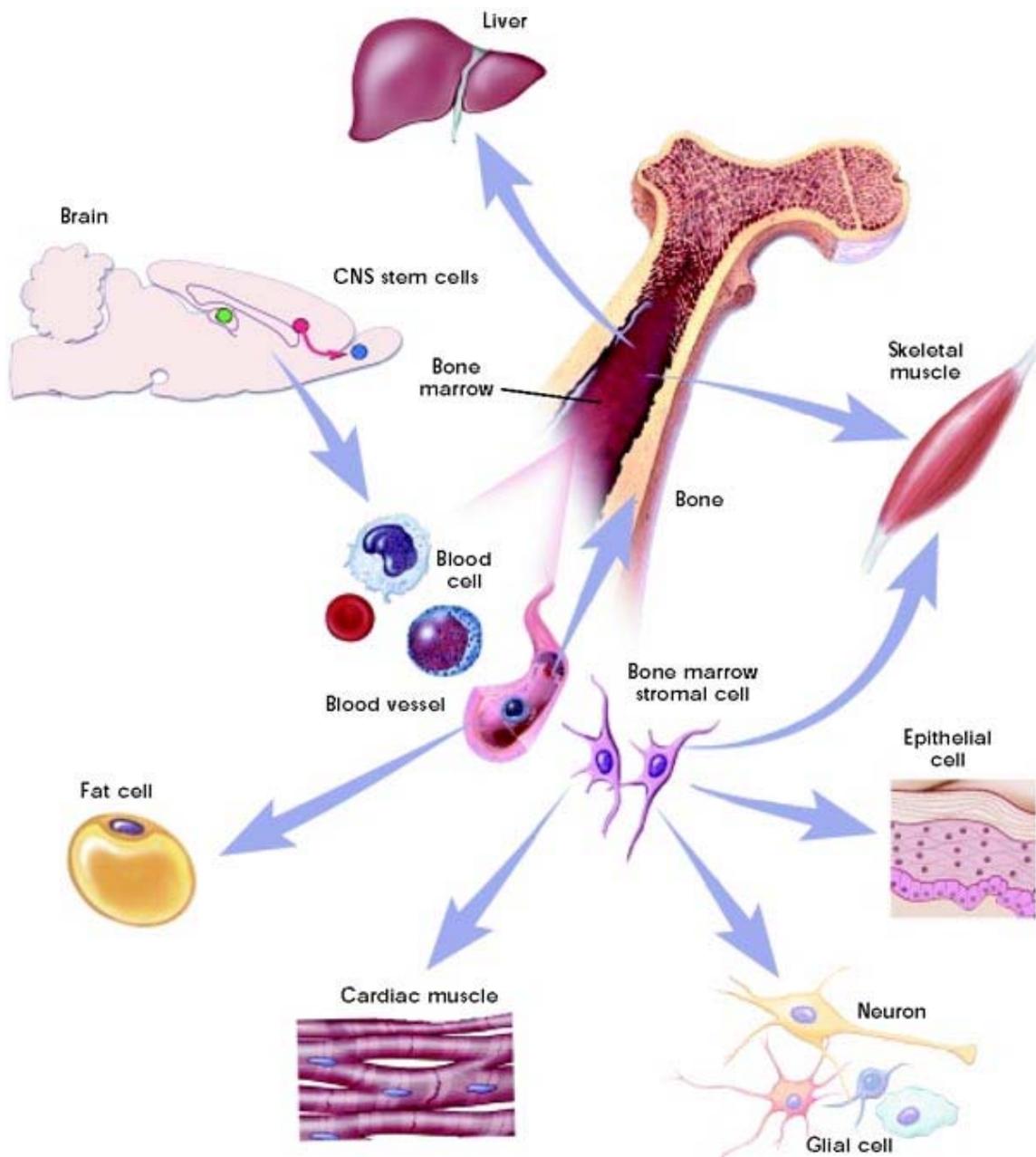


Figura 3: Plasticidade das células-tronco da medula óssea. Fonte: *Stem Cell Information, The National Institutes of Health resource for stem cell research.*

1.4.1 Células-tronco da medula óssea (CTMO)

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

Como já mencionado, muito se tem discutido sobre a plasticidade de células-tronco adultas, incluindo as células-tronco da medula óssea. Por exemplo, já foi demonstrado que células da medula óssea de camundongos podem derivar-se em microglia (Eglitis *et al.* 1997), e neurônios *in vivo* (Brazelton *et al.* 2000; Mezey *et al.* 2000). Porém, ainda não se sabe qual subpopulação(ões) da MO foi capaz de expressar este desenvolvimento neuronal. Além disso, a transdiferenciação de células da MO em neurônios no sistema nervoso central foi também demonstrada em seres humanos (Cogle *et al.* 2004). Parece que a incorporação destas células no tecido nervoso é intensificada frente a um dano tecidual. Ainda, mesmo que estas células não regeneram o tecido lesado por transdiferenciarem-se em determinado tipo celular, é provável que a recuperação de funções cerebrais ou estabilização da doença neurológica ocorra por outros mecanismos biológicos tais como a fusão

celular, a liberação de fatores tróficos, citocinas ou ativação de células endógenas (Terada *et al.* 2002).

As vantagens em se estudar células-tronco adultas em contraste com as embrionárias incluem a maior facilidade de obtenção das primeiras, sendo que as células-tronco da MO podem ainda ser obtidas em maior quantidade (ideal para aplicação clínica) do que as demais células-tronco adultas. Ainda mais, elas podem ser obtidas a partir de uma pequena amostra de MO de um dado paciente, expandidas em cultura, e re-administradas a este mesmo paciente. Assim, seria possível evitar problemas associados com a rejeição imunológica dos tecidos ou células transplantados. Finalmente, existem questões ético-religiosas que envolvem o uso de células-tronco embrionárias, que se anulam no caso de uso de células-tronco da medula óssea.

1.4.2 Terapia celular no tratamento de doenças do sistema nervoso

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

Estudos recentes têm demonstrado que o transplante de células-tronco melhora a função cerebral fisiológica em modelos de isquemia cerebral, doença de Huntington e traumatismo raquimedular (Haas *et al.*, 2005; Dunnet e Rosser, 2004; Koda *et al.*, 2005). Kim e colaboradores observaram melhora dos sintomas parkinsonianos em ratos que receberam células-tronco embrionárias neurais, com a geração de neurônios dopaminérgicos que detinham propriedades eletrofisiológicas e bioquímicas semelhantes às células mesencefálicas não-transplantadas (Kim *et al.* 2003). Mais, estudos recentes têm demonstrado a capacidade de diferenciação das CTMO em progenitores celulares com características de células de Schwann, capazes de apoiar a regeneração em nervos ciáticos de ratos lesados após três semanas do transplante (Dezawa *et al.* 2001). Mimura e colaboradores demonstraram em ratos adultos com nervos ciáticos seccionados um aumento significativo na velocidade de condução e no índice de escala funcional para nervo ciático no grupo transplantado com células-tronco comparado ao grupo controle não transplantado após seis meses (Mimura *et al.* 2004). Outros dados indicam que CTMO migram da corrente sanguínea para a área isquêmica e, uma percentagem pequena delas, expressa marcadores neurais. (Azizi *et al.* 1998; Eglitis *et al.* 1999; Li e Chopp, 2001).

1.4.3 Terapia celular no tratamento da epilepsia

Na epilepsia, a exemplo de outros distúrbios do sistema nervoso central, há perda de sub-populações neuronais, o que representa uma consequência importante na patogenia da doença. Esta observação vem estimulando a pesquisa que objetiva repor seletivamente os neurônios perdidos durante o processo da doença, bem

como os mediadores fisiológicos que eles produzem. Estratégias terapêuticas envolvendo o transplante de células-tronco e terapia gênica começam a ser estudadas em modelos experimentais de epilepsia. Entre elas está o uso células neurais fetais (Zaman *et al.*, 2000), células liberadoras de adenosina (Huber *et al.*, 2001), células produtoras de GABA (Gernet *et al.*; 2002) e células-tronco neurais (Chu *et al.*, 2004).

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

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

Visando explorar este potencial, nosso estudo se propôs a verificar o efeito das células-tronco da medula óssea no tratamento da epilepsia através da injeção periférica de células da porção mononuclear da MO (CMMO) de camundongos C57BL/6-EGFP em ratos com epilepsia induzida por lítio-pilocarpina.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

O objetivo deste projeto é verificar se células mononucleares da medula óssea apresentam potencial terapêutico no controle das crises epiléticas e do dano neuronal progressivo induzido pela epilepsia experimental, através da restauração da população e/ou conexões neurais perdidas.

2.2 Objetivos Específicos:

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

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

3. Avaliar o limiar convulsivo dos animais após o transplante das células mononucleares.

4. Avaliar se as células transplantadas migram até o hipocampo lesionado, bem como cerebelo, bulbo olfatório, coração, pulmão e fígado

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Durante este estudo foram utilizados 55 ratos machos, da linhagem Wistar, pesando entre 90 e 120 gramas, com 30 dias de vida. Todos os animais eram procedentes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Durante os experimentos, os ratos foram mantidos no alojamento do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, sob iluminação e temperatura controladas (ciclo claro-escuro de 12 horas e aproximadamente 24°C), ração e água *ad libitum*. Também foram utilizados 10 camundongos C57BL/6N transgênicos machos e adultos (C57BL/6-EGFP), pesando entre 25 e 30 gramas. Estes animais foram doadores de CMMO e expressam EGFP (*enhanced green fluorescent protein*), proteína verde fluorescente (Okabe *et al.*, 1997) que serviu como marcador das células transplantadas. Estes animais eram provenientes da Fundação Oswaldo Cruz – Bahia, e foram mantidos no Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, sob as mesmas condições citadas acima. Todos os estudos foram realizados com a aprovação do Comitê de Ética da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

3.2 Delineamento Experimental

Foram estabelecidos quatro grupos de estudo (Tabela 1) segundo o protocolo descrito abaixo (Figura 4).

Grupo I – PILO: Neste grupo foi induzido SE mediante aplicação do modelo lítio-pilocarpina. Para isto, os ratos receberam primeiramente cloreto de lítio (127 mg/kg; i.p.; Sigma). Vinte e quatro horas depois receberam via intraperitoneal PILO (60 mg/kg, Sigma) conforme previamente descrito (Cavalheiro *et al.* 1991). Para cessar as manifestações comportamentais da PILO (Priel *et al.* 1996) os ratos receberam diazepam (10 mg/kg, i.p., 90 minutos após a instalação do SE), Os ratos foram pré-tratados com metilescopolamina (1mg/kg, i.p.) para atenuar as manifestações periféricas da pilocarpina. Durante toda a semana seguinte ao tratamento com pilocarpina, os animais receberam Hidrafix® por gavagem (Composição: cloreto de sódio, 4,68 mg; citrato de potássio, 2,16 mg; citrato de sódio, 0,98 mg; e glicose, 20,0 mg) para reposição de água e sais. Ao completarem-se 22 dias da injeção de PILO (52 dias de vida) os animais receberam 200 µL de solução salina via veia da cauda.

Grupo II – PILO + CMMO: Os animais receberam tratamento idêntico ao do grupo I, exceto que aos 52 dias de vida, receberam transplante de CMMO no lugar de salina (200 µL contendo 10^7 células mononucleares EGFP⁺), via veia da cauda.

Grupo III – Salina: Estes animais receberam salina em substituição à PILO aos 30 dias de vida, e 200 µL de solução salina via veia da cauda aos 52 dias de vida.

Grupo IV – Salina + CMMO: Estes animais receberam salina em substituição à PILO aos 30 dias de vida, e CMMO (200 μ L contendo 10^7 células mononucleares EGFP+) aos 52 dias de vida.

Tabela 1: Constituição dos grupos a partir do tratamento com pilocarpina (PILO) e/ou células mononucleares da medula óssea (CMMO).

GRUPOS	INJEÇÃO PILO	INJEÇÃO CMMO
Grupo I	Sim	–
Grupo II	Sim	Sim
Grupo III	–	–
Grupo IV	–	Sim

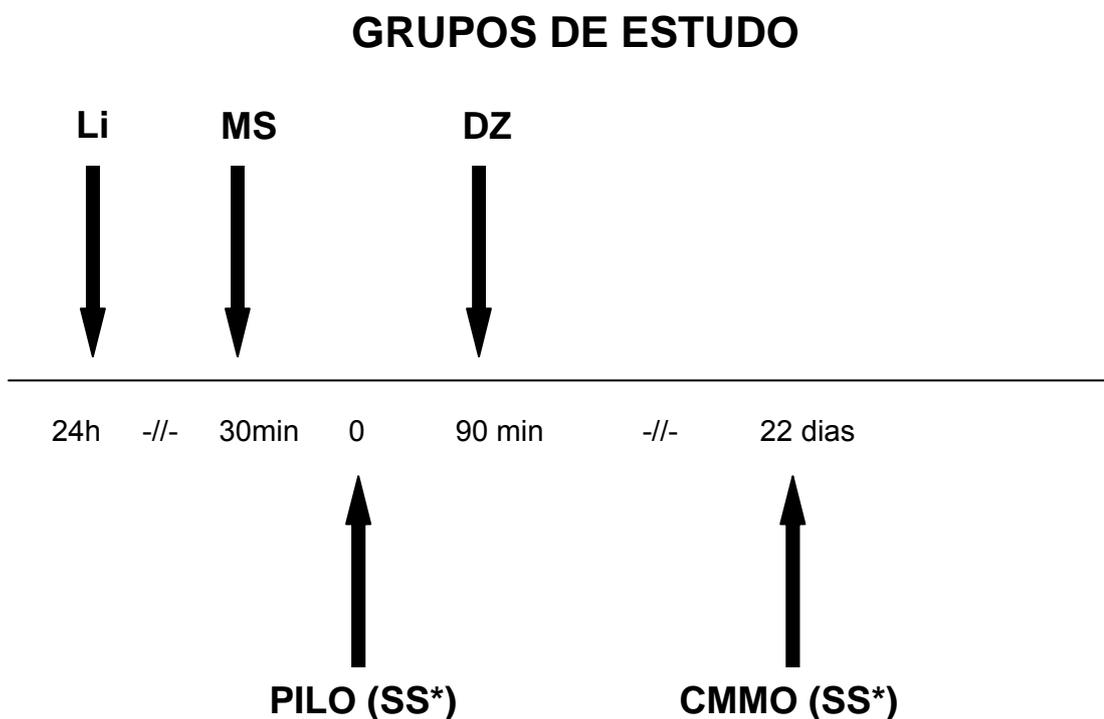


Figura 4: Delineamento do estudo. Legenda: Li: Cloridrato de Lítio; MS: Mestilescopolamina; PILO: Pilocarpina; DZ: Diazepam; CMMO: Células mononucleares da medula óssea; SS: Solução salina.

3.3 Indução da epilepsia com o uso do modelo lítio-pilocarpina

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

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

Figura 5: Escala de Racine contendo os graus de resposta dos animais à injeção de PILO.
Fonte: Racine 1972.

3.4 Preparação das células mononucleares de medula óssea

Em relação à obtenção das CMMO dos camundongos C57BL/6-EGFP, foram usados 10 camundongos da respectiva linhagem transgênica, a fim de realizar 20 transplantes. Inicialmente os camundongos foram anestesiados (xilazina e quetamina). Após, os animais foram dissecados, isolaram-se os ossos longos (úmero, fêmur e tíbia). As epífeses foram cortadas, possibilitando a lavagem das

cavidades ósseas. O aspirado de MO coletado foi então processado entre etapas de suspensão e centrifugação. A camada de células mononucleares foi separada por gradiente de ficoll-paque 1077 e as células foram contadas em câmara de Neubauer. Por fim, separaram-se alíquotas de 200 μL contendo 10^7 células mononucleares EGFP⁺ (Figura 6), sendo que estas foram transplantadas nos animais receptores pela veia da cauda.



Figura 6 – Obtenção de CMMO de camundongos C57BL/6-EGFP. Animais são anestesiados e dissecados, isolam-se os ossos longos, e procede-se a lavagem das cavidades ósseas. O material coletado é processado em centrifugações e ressuspensões. Por fim, a camada de células mononucleares é obtida por gradiente de ficoll, e as células são contadas em câmara de Neubauer e aliqüotadas.

3.5 Monitoramento das crises espontâneas recorrentes.

Passados 15 dias da indução do SE (correspondentes ao período latente, no qual há ausência de crises comportamentais), os animais foram previamente marcados em diferentes locais do corpo, com tinta preta à base de ervas naturais e alojados em gaiolas de frente transparente para que pudessem ter suas crises filmadas sem a necessidade de remoção do seu ambiente. Os animais foram filmados por um período de 12 horas (6 horas do ciclo claro e 6 horas do ciclo escuro), ao longo de sete dias. Ao final destes primeiros dias de filmagem, os animais receberam o transplante de CMMO. A partir daí, estes grupos continuaram sendo monitorados por vídeo durante mais 14 dias seguidos.

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

Através desta tecnologia nos tornamos aptos a monitorar a frequência e

tipo de crises epilépticas, as quais foram posteriormente quantificadas no período basal. Foram identificadas crises com manifestações comportamentais visíveis e graduadas conforme a escala de Racine, sendo que se determinou e contou-se como crise toda manifestação comportamental que tinha correspondência com os graus 4 e 5 da escala de Racine. A contagem do número de crises convulsivas foi feita por observadores cegos e independentes.

A diferença no número de crises convulsivas pré e pós-transplante foi usada como parâmetro para que se infira que as CMMO transplantadas foram capazes de provocar melhoras funcionais. Os animais tratados com lítio-pilocarpina que não apresentaram crises espontâneas nos primeiros sete dias de filmagem foram excluídos do estudo.

3.6 Avaliação cognitiva

O tratamento com lítio-pilocarpina leva à atrofia hipocampal, e é sabido que o hipocampo desempenha um papel fundamental na formação e evocação de distintos tipos de memória incluindo aquelas com alto conteúdo emocional e de localização espacial. Para avaliar se o déficit cognitivo causado pelas crises recorrentes neste modelo pode ser revertido pelo transplante de CMMO, utilizamos a tarefa do labirinto aquático de Morris, que requer integridade hipocampal. Como teste adicional, utilizamos a tarefa de reconhecimento de objetos.

3.6.1 Labirinto Aquático de Morris

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

Para a realização da tarefa do LAM, foi utilizado um tanque circular preto (180 cm de diâmetro e 55 cm de altura) com 25 cm de água a 21-24° Celsius, dividido em quatro quadrantes imaginários. A plataforma, de acrílico, pintada de preto, quadrada (20 cm de lado, superfície áspera), foi posicionada no centro de um dos quatro quadrantes virtuais do tanque, à mesma distância da parede e do centro do tanque, e ficou submersa a 2 cm abaixo do nível da água, invisível aos animais. Além disso, as paredes da sala continham dicas visuais, com diferentes formatos e cores, visíveis de qualquer ponto de dentro do tanque (Figura 7).



Figura 7 – Vista geral do labirinto aquático.

Assim, aos 97 dias de vida (45 após receberem transplante de CMMO ou solução salina), os animais foram treinados nesta tarefa como descrito em (Santos, 1999). Brevemente, colocou-se o animal na piscina e se lhe permitiu nadar livremente até que encontrasse a plataforma submersa. Caso não a encontrasse em 60 segundos, coube ao experimentador conduzi-lo até a plataforma. Os animais permaneceram na plataforma por 20 s. Na avaliação da memória de referência, a plataforma permaneceu no mesmo lugar durante os vários dias de treino, quando é analisada a latência.

Foram realizadas sessões com oito largadas diárias durante cinco dias, sendo que no sexto dia, a retenção de memória dos animais foi testada (24 horas após término do treino). Para isto a plataforma foi retirada, e o animal permaneceu na piscina por 60 segundos. Analisou-se a velocidade de natação, o número de

cruzamentos através de um aro imaginário localizado na região onde estava a plataforma, a latência e o tempo que o animal passou no quadrante onde estava a plataforma durante o treino, mediante monitoramento por vídeo e um software especializado. Os animais foram manipulados por dois dias consecutivos antes do início do período de treinos. Os animais foram posicionados no tanque manualmente, virados para a parede, no centro de um dos quadrantes determinados. No treino, em cada tentativa o animal foi largado de uma posição cardinal diferente, que foi randomizada entre as sessões e as tentativas. Durante o teste na ausência da plataforma, o animal foi largado da posição sul.

3.6.2 Paradigma de reconhecimento de objetos

Uma semana após o término da tarefa do LAM, deu-se início à habituação dos animais para a tarefa de reconhecimento de objetos. O paradigma de reconhecimento de objetos utiliza a tendência natural que os roedores têm de explorar objetos novos para medir sua memória (Ennaucer e Delacour, 1988). A tarefa consiste em um treino no qual são apresentados dois objetos, seguido de um teste em que um dos objetos introduzidos durante o treino é substituído por um objeto novidoso. Roedores tendem a explorar o objeto novo por mais tempo, demonstrando assim memória do objeto familiar.

Para estes experimentos, os animais foram expostos a um campo aberto (60x40x50 cm, comprimento x profundidade x altura), feito de madeira, com frente de vidro durante 20 minutos por 4 dias consecutivos para habituação, na ausência de objetos. No quinto dia, foram dispostos no campo aberto, de maneira equidistante,

dois objetos que diferiam entre si quanto a sua cor, altura, formato e textura, presos ao campo aberto pela base. Os objetos e o campo aberto foram limpos com etanol 70% após cada treino para remover dicas olfativas. Foram consideradas atividades exploratórias do animal: farejar o objeto ou tocá-lo com as patas dianteiras ou focinho, mas não virar o objeto ou sentar-se nele. Durante o treino, os animais foram colocados no campo aberto durante 5 minutos. O tempo percentual gasto explorando cada objeto foi calculado e expresso como percentual do tempo total de exploração em segundos. (Figura 8). Os observadores eram cegos ao tratamento.

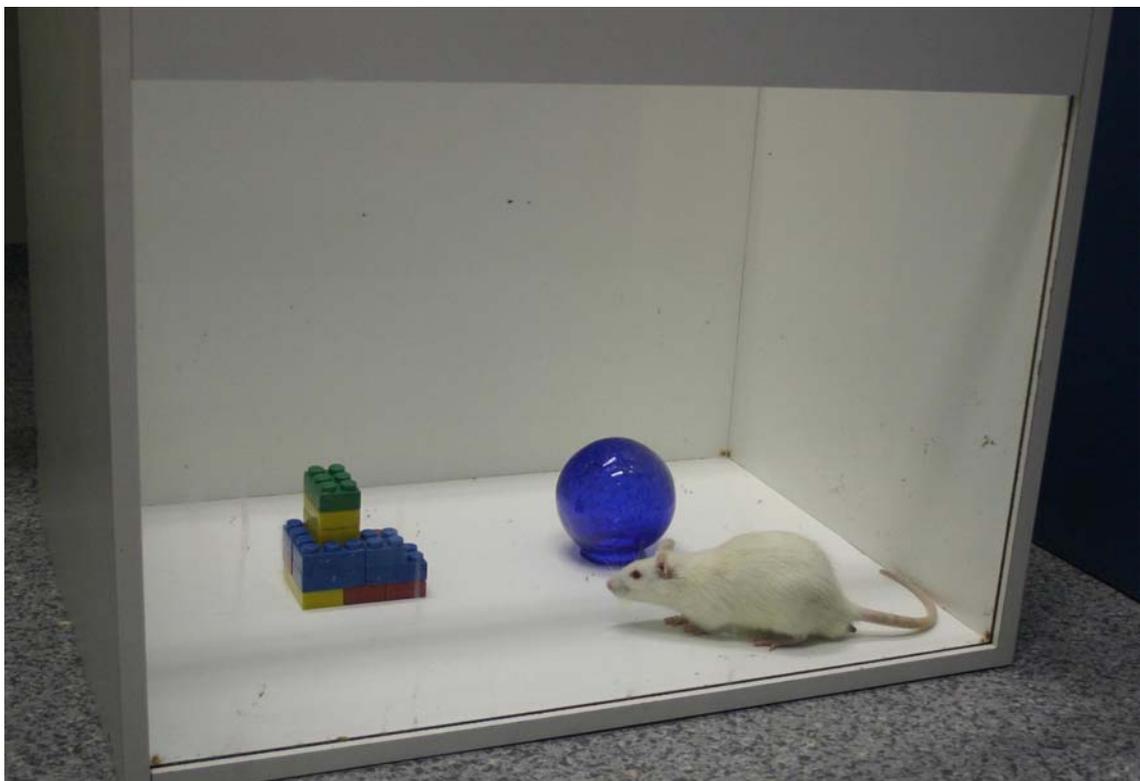


Figura 8 – Animal durante treino na tarefa de reconhecimento de objetos.

O teste de retenção foi feito 24 horas após a sessão de treino. Durante este teste, os animais foram novamente colocados no campo aberto onde um dos objetos foi previamente trocado por outro com características de cor, formato, textura e alturas diferentes, e o tempo percentual gasto explorando cada objeto foi novamente

calculado com intuito de avaliar a memória de longa duração. Durante o teste os animais permaneceram no campo aberto durante o mesmo tempo (5 minutos) do treino.

3.7 Avaliação do limiar convulsivo através do teste do eletrochoque máximo

Durante os últimos 30 anos, diversos modelos animais *in vivo* têm sido utilizados para identificar e avaliar drogas com eficácia anticonvulsivante e baixa toxicidade; entre eles o teste do eletrochoque máximo. Este teste foi desenvolvido no final da década de 1930, por Merritt e Putnam para rastrear a eficácia anticonvulsivante de agentes químicos e é útil na análise do limiar convulsivo (McNamara, 2003).

Assim, para avaliar a influência da administração de CMMO sobre o limiar de crise convulsiva de ratos controles e com epilepsia foram realizados testes de eletrochoque utilizando a metodologia da estimulação intra-auricular. Este teste consistiu na fixação intra-auricular de um par de eletrodos, e foi realizado assim que os animais completaram as tarefas cognitivas.

Durante o teste do limiar convulsivo, uma corrente alternada de 50Hz (entre 60 mA e 150 mA) foi aplicada através de eletrodos posicionados no canal auricular, com auxílio de um software gerador de onda e temporizador de estímulo. Os eletrodos foram previamente imersos em um creme condutor para eletroencefalograma (ANZAMED). Para todos os animais a indução da crise foi

iniciada com uma duração única e fixa de 200 ms e por pulso de corrente alternada, que progrediu com incrementos de 5 mA até a obtenção de convulsão generalizada com extensão tônica. A cada degrau de corrente no eletrochoque a corrente em que o animal atingia extensão tônica foi registrada. Em todos os casos os animais receberam estimulações repetidas, com intervalo de 24 horas entre elas para permitir sua recuperação neurológica. Todo o procedimento foi filmado através de uma mini-câmera de vigilância (*Kodo*) e um gravador de DVD-R (PHILIPS, modelo R615). Para melhorar a aquisição das imagens e a análise das crises, os animais foram colocados em caixas de acrílico transparentes e toda a crise foi analisada com um monitor de 17" (Provien). A figura 9 mostra o equipamento utilizado, e a figura 10 mostra um animal controle submetido ao eletrochoque.

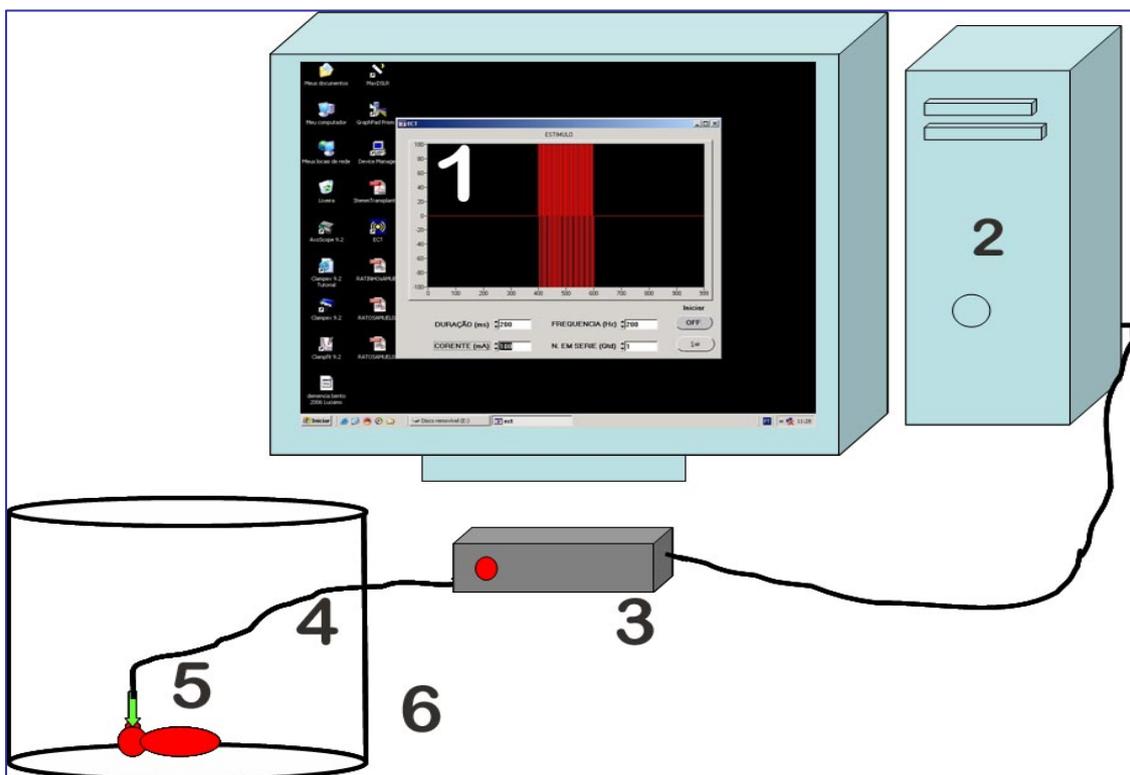


Figura 9 - Equipamento de estimulação intra-auricular. 1) *Software* gerador de onda e temporizador do estímulo; 2) Microcomputador; 3) Unidade de estímulo; 4) Cabo bipolar; 5) Eletrodos para o canal auricular.

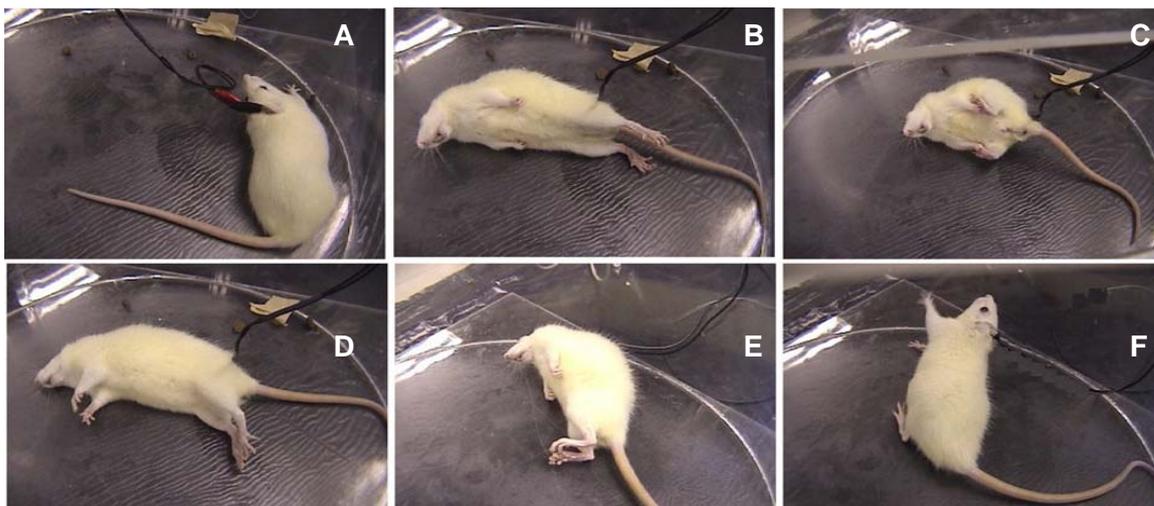


Figura 10 – Teste do eletrochoque máximo em um animal controle. A) animal na caixa de acrílico com os eletrodos posicionados; B-E) Contração e extensão do corpo, neste período há movimentos tônico-clônicos das patas anteriores e posteriores; F) Início da recuperação.

3.8 Detecção por PCR de EGFP das CMMO transplantadas

Para verificar a presença de CMMO transplantadas no hipocampo lesado, bem como em outras estruturas encefálicas e outros órgãos como coração, pulmão e fígado, utilizamos a técnica da *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Esta técnica foi idealizada por Kary Mullis e permite a amplificação de uma região específica do DNA, que pode ser visualizada através da análise por eletroforese em gel de agarose. (Gibbs 1990)

Como a presença da EGFP serve de indicativo de que o tecido regenerado foi proveniente das células da medula óssea do animal doador e não de células residentes do animal receptor, utilizamos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) complementares à seqüência de DNA correspondente a uma seqüência específica

do gene que codifica a proteína EGFP: 5'-ttgaattcgccaccatggtgagc-3' e 5'ttgaattcttactgttacagctcgtcc-3'. Foram avaliadas amostras de todos os grupos.

Assim, sete meses após o tratamento com CMMO ou salina, os ratos dos quatro grupos foram sacrificados de forma randômica e sistemática. Os animais foram previamente anestesiados com tiopental (40 mg/kg; i.p.) e então decapitados. Posteriormente, os encéfalos foram removidos da caixa craniana e em seguida foram isolados e coletados separadamente o hipocampo direito, o hipocampo esquerdo, o cerebelo e o bulbo olfatório. Também foram coletadas amostras do coração, pulmão e fígado. Todo o material foi congelado em nitrogênio líquido e mantido em refrigerador a -80° C até o início do preparo das amostras para a PCR.

Para a extração de DNA, os tecidos foram homogeneizados em 300 µL de tampão fosfato. A seguir, foram adicionados 600 µL de Brazol. Os tubos foram agitados com auxílio de um vórtex por dois minutos e então foram adicionados 120 µL de clorofórmio gelado. As amostras foram centrifugadas em 10.000 rpm por 15 minutos. Logo depois, o sobrenadante foi transferido para novos tubos contendo 300 µL de isopropanol gelado, e estes foram agitados por ~2 minutos. Os tubos contendo precipitado foram descartados. Procedeu-se com nova centrifugação em 10.000 rpm, por 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado por aspiração. Por fim, o DNA foi dissolvido em água ultra-pura. Os frascos contendo as amostras de DNA foram armazenados em freezer a -20°C. Previamente à reação de PCR, o DNA das amostras foi quantificado por espectofotometria.

Para a reação foram adicionados a uma alíquota de 5 μL de DNA de cada amostra: 0,5 μL de Taq DNA polimerase, 1 μL do primer 1, 1 μL do primer 2, 2 μL de dNTPs, 2 μL de MgCl_2 , 5 μL de solução tampão e água MilliQ para completar o volume de reação de 50 μL . A amplificação foi realizada em termociclador MJ Research PTC-200 nas seguintes condições: 95°C por 5 minutos para desnaturação; 30 ciclos subsequentes consistindo cada ciclo de uma etapa de desnaturação a 95°C por 45 segundos, uma etapa de anelamento a 62°C por 1 minuto e uma etapa a 72°C por 1,5 minuto para extensão; e então uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos.

Para controlar o funcionamento da reação, foram ensaiados, juntamente com cada bateria de DNA de amostras de animais transplantados, um controle positivo de reação que consistia de DNA extraído a partir de CMMO obtidas de camundongo C57BL/6-EGFP, e um controle negativo de reação, com omissão de qualquer DNA, além de amostras de animais que não receberam CMMO.

Os produtos amplificados foram detectados por eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE 1x, contendo brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta. As condições da corrida eletroforética foram de 100 V, com corrente de 400 mA por 30 minutos. O resultado foi considerado positivo para a presença de DNA de células EGFP+ quando visualizada a banda correspondente.

3.9 Análise estatística

Para análise dos dados obtidos nos testes cognitivos utilizou-se a análise de variância de uma via (ANOVA) e teste t de *Student* para amostras pareadas, para LAM e reconhecimento de objetos respectivamente. O teste t de *Student* também foi aplicado para análise da frequência de crises. Para o limiar convulsivo utilizou-se ANOVA de uma via seguido de teste de Tukey. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Toda a análise estatística foi realizada com auxílio do *software* estatístico *GraphPad Prism 4*.

4 RESULTADOS

4.1 Indução de epilepsia pelo modelo lítio-pilocarpina

Um total de 29 animais recebeu tratamento com lítio-pilocarpina. A taxa de mortalidade foi de 20,7 (6/29). Além disso, três ratos não apresentaram crises comportamentais correspondentes ao grau 5 da Escala de Racine logo após a injeção de pilocarpina, e outros quatro animais não apresentaram crises comportamentais durante os sete primeiros dias de monitoramento por vídeo, sendo portanto excluídos do estudo. Os animais restantes foram divididos randomicamente entre os grupos I e II. Posteriormente, para complementar a análise dos dados na tarefa de reconhecimento de objetos, outros 6 animais foram tratados com lítio-pilocarpina, sendo a mortalidade 33,3% (2/6). Novamente, foram randomicamente distribuídos entre os grupos I e II.

4.2 O tratamento com CMMO reduz CERs induzidas pelo lítio-pilocarpina.

Um número total de 20 animais foi monitorado por vídeo, nos meses de junho e julho de 2007, sendo 16 que apresentaram CERs incluídos no estudo. Estes animais correspondem àqueles dos grupos I e II (PILO e PILO + CMMO, n=8 por grupo), e foram monitorados durante 21 dias. Destes, sete dias foram anteriores à injeção de CMMO ou solução salina (período pré-transplante), e os outros catorze posteriores ao transplante (período pós-transplante). O período pós-transplante foi dividido em dois sub-períodos de sete dias: A e B. A filmagem se deu a partir do 15º dia após a injeção de pilocarpina, e já no primeiro dia foram observadas crises comportamentais. Foram observadas e computadas as crises correspondentes aos graus 4 e 5 da Escala de Racine. Os animais que não apresentaram crises comportamentais durante o período pré-transplante foram excluídos do estudo.

No período pré-transplante não houve diferença significativa entre os grupos PILO e PILO + CMMO com relação à frequência de crises (figura 11). Entretanto, no período pós-transplante, observou-se uma redução do número de crises nos animais do grupo PILO + CMMO quando comparados com os animais do grupo PILO, nos dois sub-períodos pós-transplante. Durante os primeiros sete dias pós-transplante (sub-período A) houve uma redução de 19% na frequência de crises do Grupo II (CMMO) com relação Grupo I (salina) no mesmo período. Esta diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa (teste t de Student, $p < 0,0001$; Figura 12).

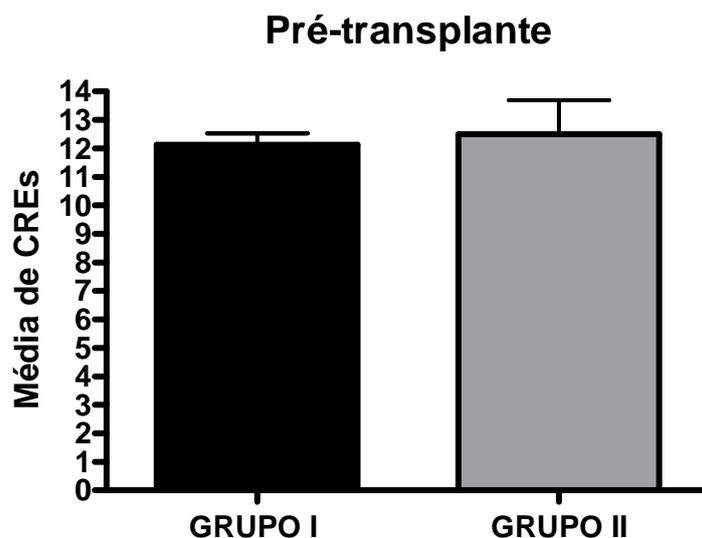


Figura 11 – Média de CREs durante o período pré-transplante. Não houve diferença entre os grupos I (Pilo + salina) e II (Pilo + CMMO) no período. Teste t de Student, $p=0,5288$.

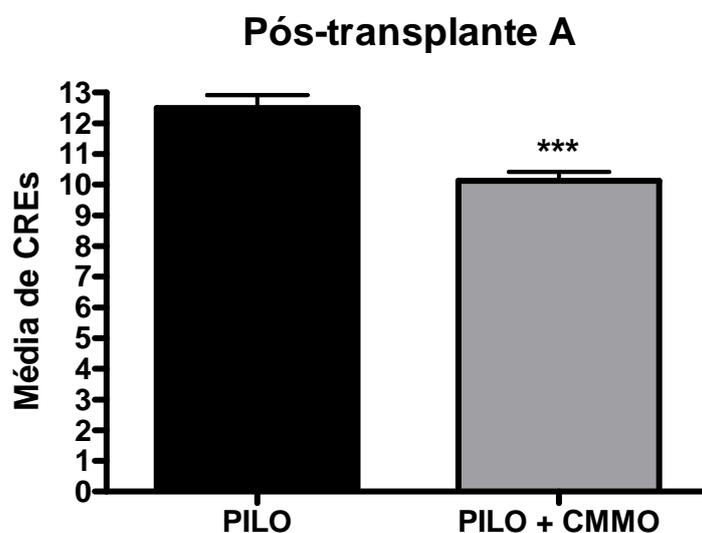


Figura 12 – Média de CREs durante o período pós-transplante A. Houve redução de 19% na frequência de crises do grupo tratado com CMMO (Pilo + CMMO) em relação ao grupo que recebeu salina (Pilo + salina) $p<0,0001$, teste t de Student.

O mesmo foi observado para o sub-período pós-transplante B, quando houve uma redução de 34,6% na frequência de crises entre os animais tratados com

CMMO em comparação com os tratados com salina para o mesmo período. Esta redução é estatisticamente significativa ($p < 0,0001$; Fig. 13).

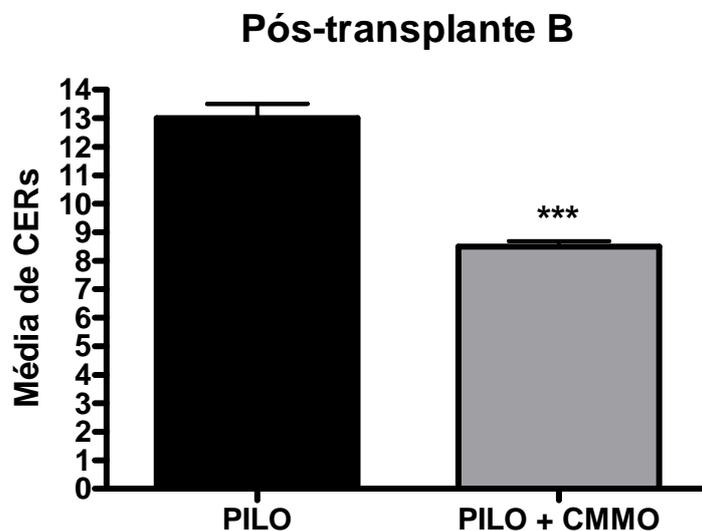


Figura 13 – Média de CERs durante o período pós-transplante B. Houve redução de ~35% na frequência de crises do grupo tratado com CMMO em relação ao grupo que recebeu salina ($p < 0,0001$, teste t de Student).

Quando comparamos a frequência de crises dos animais do grupo I (PILO) no período pré-transplante com ambos os períodos pós-transplante, observa-se que não há diferença entre eles (Fig. 14). Entretanto, quando fazemos o mesmo com o grupo II (tratado com CMMO), é possível verificar que existe diferença significativa entre os períodos pré-transplante e pós-transplante A e entre pré-transplante e pós-transplante B (Fig. 15). Além disso, existe da mesma forma uma diferença entre o pós-transplante A e o B, sendo que em B, a redução na frequência das CERs é significativamente maior do que em A (Fig. 15). Todos os dados estão resumidos nas tabelas 2 e 3.

Grupo I - Pré-transplante x Pós-transplante A e B

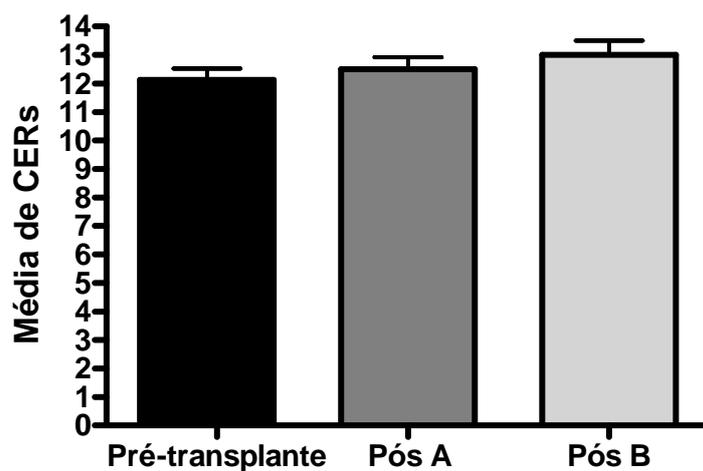


Figura 14 – Média de CERs dos animais do Grupo I durante os períodos pré-transplante e pós-transplante A e B – neste caso transplante refere-se à injeção de solução salina. Não houve diferença entre os períodos.

Grupo II - Pré-transplante x Pós-transplante A e B

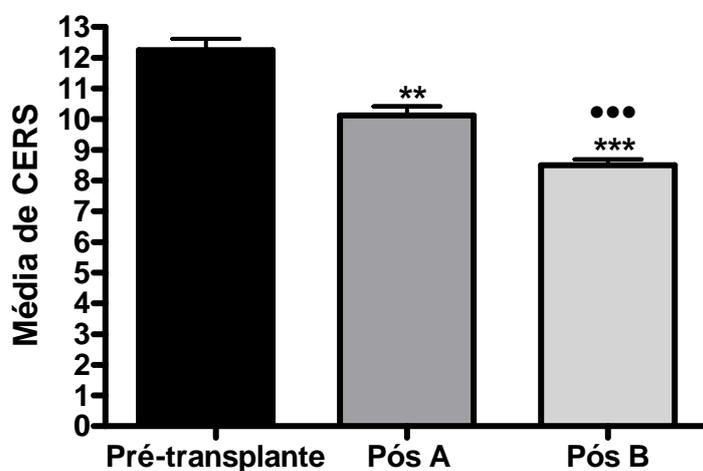


Figura 15 – Média de CERs dos animais do Grupo II durante os períodos pré-transplante e pós-transplante A e B. Houve diferença entre o período pré-transplante e os períodos pós-transplante A ($p = 0,0005$) e B ($p < 0,0001$). Também houve diferença entre os períodos pós-transplante A e B ($*p = 0,0004$). Teste t de Student.

Tabela 2 – Frequência de CERs no grupo I (PILO).

	Número de crises espontâneas recorrentes (CERs) por animal		
	Pré-transplante	Pós-transplante A	Pós-transplante B
Rato 1	12	13	12
Rato 2	13	12	13
Rato 3	11	11	12
Rato 4	11	12	13
Rato 5	13	12	15
Rato 6	14	15	15
Rato 7	11	12	11
Rato 8	12	13	13
MÉDIA	12,125	12,5	13
DESVIO PADRÃO	1,13	1,19	1,41

A tabela traz os valores absolutos das crises observadas para cada animal do Grupo I nos períodos analisados, média do período e desvio padrão.

Tabela 3 – Frequência de CERs no grupo II (PILO + CMMO).

	Número de crises espontâneas recorrentes (CERs) por animal		
	Pré-transplante	Pós-transplante A	Pós-transplante B
Rato 1	14	11	9
Rato 2	12	10	8
Rato 3	13	9	9
Rato 4	11	10	8
Rato 5	12	9	8
Rato 6	12	11	9
Rato 7	13	10	8
Rato 8	11	11	9
MÉDIA	12,25	10,125	8,5
DESVIO PADRÃO	1,03	0,83	0,53

A tabela traz os valores absolutos das crises observadas para cada animal do Grupo I nos períodos analisados, média do período e desvio padrão.

4.3 O tratamento com CMMO reverte o déficit cognitivo associado ao dano hipocampal produzido pelo lítio-pilocarpina no LAM.

Para analisar se a administração endovenosa de CMMO influencia a aquisição de memória espacial de ratos Wistar normais e com epilepsia, estes animais foram treinados no LAM como descrito em Materiais e Métodos. Como se pode observar na figura 16 o tratamento com PILO aumentou a latência de escape ($p < 0,05$ no dia 4, $p < 0,01$ no dia 2, e $p < 0,001$ nos dias 3 e 5 versus salina). No entanto, a administração de CMMO 45 dias antes do início dos treinos levou a uma diminuição na latência de escape mesmo em animais tratados com PILO ($p < 0,05$ nas sessões 1,3 e 5, e $p < 0,001$ na sessão 2). Finalmente, o transplante de CMMO não influenciou significativamente o desempenho dos animais controles (salina + CMMO, Figura 16).

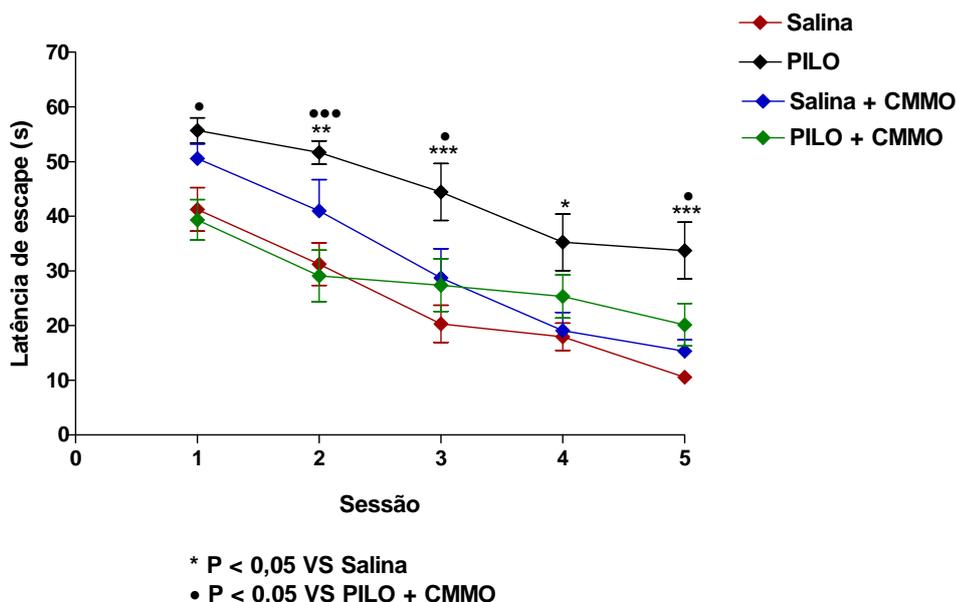


Figura 16 – Tratamento com CMMO melhora aquisição de memória espacial em ratos epiléticos. O gráfico expressa as latências médias para encontrar a plataforma durante cinco dias de treino no LAM de ratos controle e com epilepsia que receberam transplante de CMMO ou injeção de solução salina. Os dados estão expressos como a média \pm EP de cada sessão. Teste de Bonferroni após ANOVA de duas vias, $n=8$ por grupo.

Além disso, quando realizamos um teste na ausência da plataforma de escape 24 horas após a última sessão de treino observamos que os animais controles (tanto grupo III quanto grupo IV) passaram mais tempo nadando no quadrante alvo (QA) do que aqueles que receberam PILO (grupo I), os quais não mostraram preferência por nenhum quadrante (Figura 17). Conseqüentemente, o tratamento com PILO prejudica a consolidação da memória espacial associada à aprendizagem no LAM (Teste de Newman-Keuls após ANOVA de uma via, $p<0,001$ vs salina). Entretanto, observou-se também que os animais tratados com PILO, mas que foram posteriormente transplantados com CMMO, tiveram preferência pelo QA, à exemplo dos animais controles. Portanto, a injeção de CMMO permitiu que esses animais adquirissem e retivessem esse tipo de memória ($p<0,05$ vs PILO).

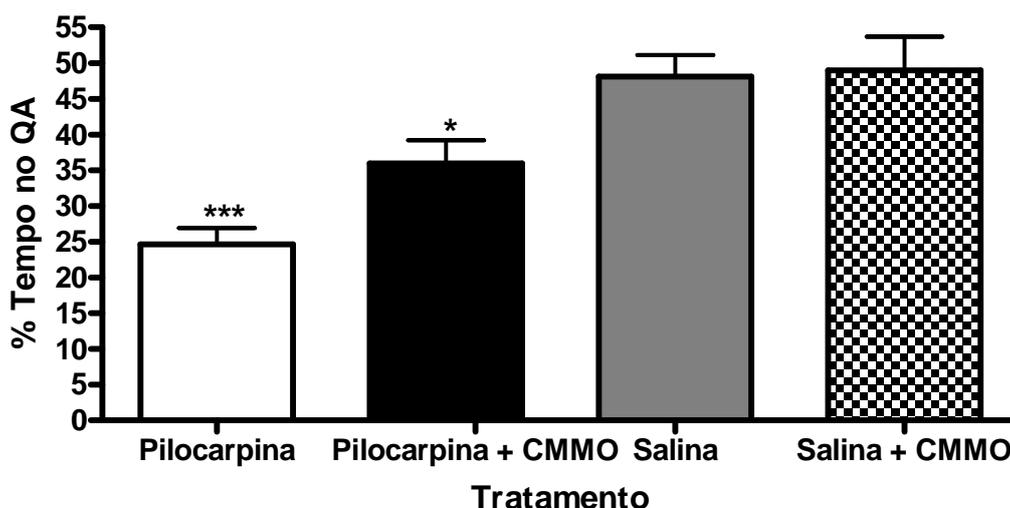


Figura 17 – Animais tratados com CMMO têm preferência pelo quadrante alvo. Média do tempo gasto no QA durante um teste de 60s na ausência da plataforma de escape realizado 24 horas após o último dia de treino para ratos epiléticos e controles tratados com CMMO ou solução salina. Os dados estão representados como a média \pm EP; n=8 por grupo. Newman-Keuls após ANOVA de uma via $p < 0,001$ PILO vs Salina e $p < 0,05$ PILO vs PILO+CMMO.

Durante o teste também se analisou o número de vezes que os animais cruzaram um aro virtual situado na região onde antes havia a plataforma de escape. Os animais dos grupos controle cruzaram o aro em maior número de vezes em comparação com os animais que receberam PILO (Figura 18, $p < 0,001$ vs salina, ANOVA de uma via seguido de Newman-Keuls). A exemplo dos dados obtidos para o tempo de natação no QA, os animais tratados com PILO que porém receberam também tratamento com CMMO cruzaram o aro virtual em número de vezes maior do que os animais do grupo I ($p < 0,01$ vs PILO).

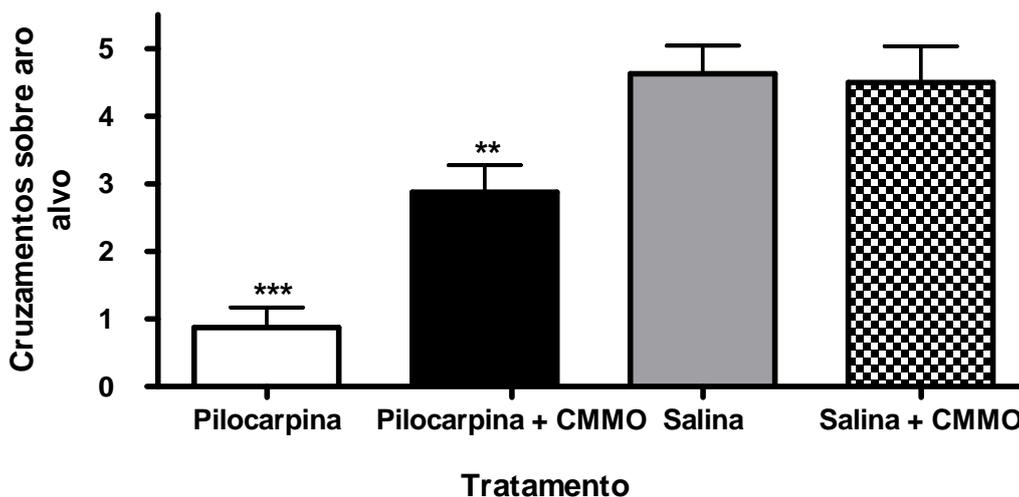


Figura 18 – Animais epilépticos tratados com CMMO cruzam mais vezes aro alvo em comparação com não-tratados. Número de cruzamentos sobre aro alvo durante teste de 60s na ausência da plataforma de escape realizado 24 horas após o último dia de treino para ratos epilépticos e controles tratados com CMMO ou solução salina. Os dados estão representados como a média \pm EP; $n=8$ por grupo. Newman-Keuls após ANOVA de uma via $p<0,001$ PILO vs Salina e $p<0,01$ PILO vs PILO+CMMO.

No teste, ainda avaliamos a latência de escape. De maneira semelhante ao observado para os parâmetros anteriores, os animais dos grupos III e IV alcançaram a posição da plataforma mais rapidamente do que os animais epilépticos do grupo I (teste de Newman-Keuls após ANOVA de uma via $p<0,01$ vs salina) e ainda os animais epilépticos tratados com CMMO tiveram desempenho superior ao grupo I e comparável aos controles ($p<0,01$ vs PILO e $p>0,05$ vs salina, Figura 19).

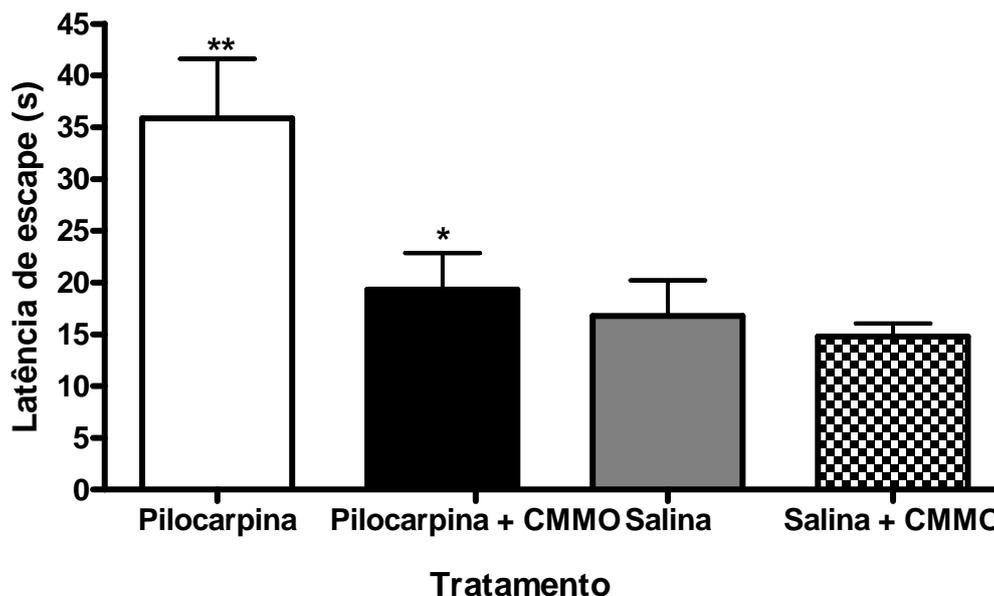


Figura 19 – Animais epiléticos tratados com CMMO alcançam a plataforma virtual mais rapidamente do que não-tratados. O gráfico expressa as latências médias de ratos controle e com epilepsia que receberam transplante de CMMO ou injeção de solução salina para encontrar a plataforma durante teste 24h após a última sessão de treino no LAM. Os dados estão representados como a média \pm EP; n=8 por grupo. Newman-Keuls após ANOVA de uma via $p < 0,01$ PILO vs Salina e $p < 0,05$ PILO vs PILO+CMMO.

Por fim, como o desempenho no LAM depende da capacidade motora dos animais, avaliamos a velocidade de natação durante o teste, constando-se que não houve diferença entre os grupos (Figura 20). Assim, as diferenças encontradas não se devem ao comprometimento motor de determinado grupo de animais.

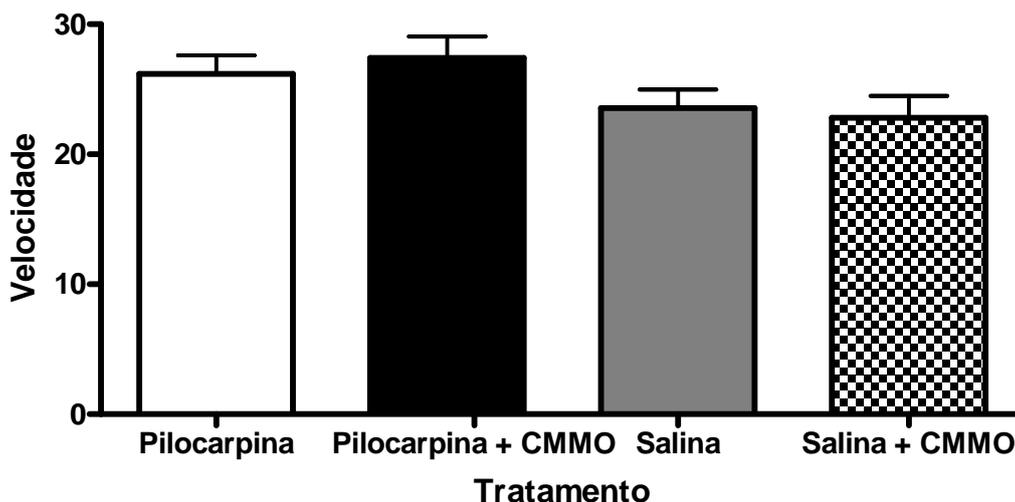


Figura 20 – Velocidade de natação durante o teste é comparável entre os grupos. Os dados estão representados como a média \pm EP; n=8 por grupo.

4.4 O tratamento com lítio-pilocarpina bloqueia a memória de longa duração no paradigma de reconhecimento de objetos e CMMO não revertem o déficit cognitivo associado a esta tarefa.

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

Os animais controles dos grupos III e IV exploraram mais o objeto novo do que o objeto familiar ($p < 0,05$ no teste t de Student para amostra única, valor de referência=50). Entretanto, como mostra a figura 21 os animais tratados com lítio-

pilocarpina passaram praticamente a mesma quantidade de tempo explorando o objeto novo e o familiar durante a sessão de teste.

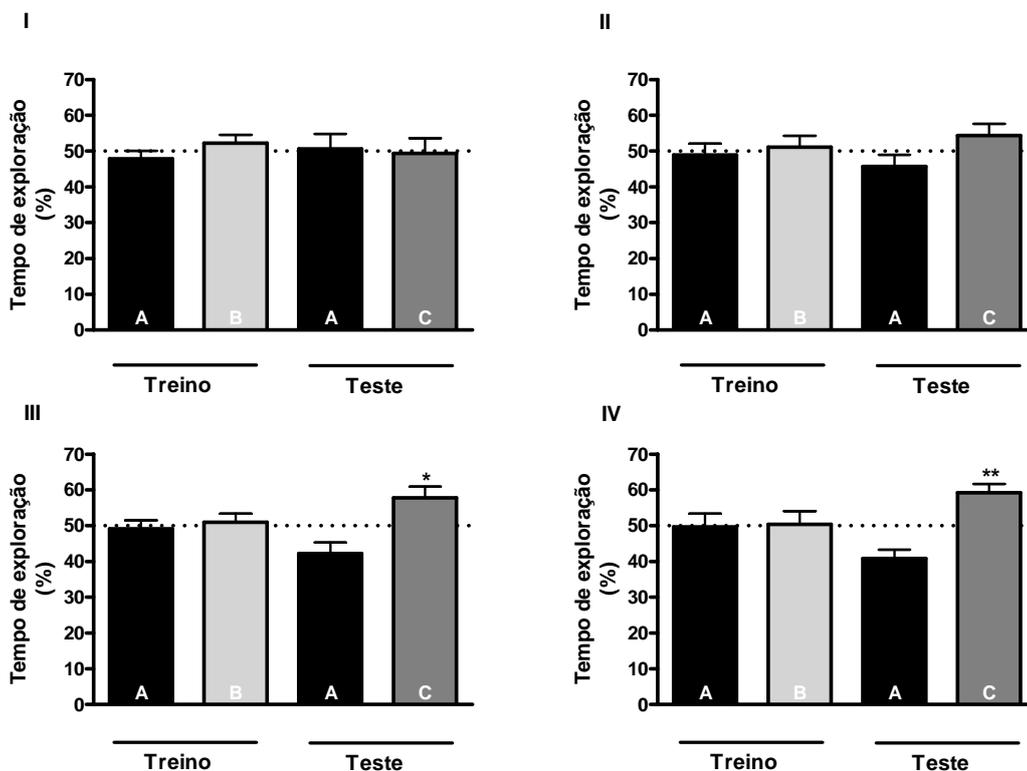


Figura 21 – O tratamento com lítio-pilocarpina impede a consolidação de memória de reconhecimento de longa duração, e as CMMO não revertem esse processo. Os animais foram expostos por 5 min a dois objetos diferentes (A e B) e 24h depois a um objeto familiar (A) e um novo (C). Em I: grupo I – PILO; II: grupo II – PILO + CMMO; III: grupo III – salina; IV: grupo IV – salina + CMMO. Os dados estão expressos como a média + EP da porcentagem de tempo de exploração do objeto em relação ao tempo total. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, $n = 10$ por grupo.

4.5 O tratamento com lítio-pilocarpina diminui o limiar convulsivo no teste do eletrochoque máximo.

Visando verificar se PILO diminui o limiar convulsivo dos animais, e sendo esse o caso, se as CMMO administradas a animais epiléticos elevam esse limiar novamente ao nível dos animais controles, utilizamos o teste do eletrochoque

máximo. Ao mesmo tempo, buscamos verificar se as CMMO por si só têm efeito sobre o limiar convulsivo.

Assim, os animais receberam o estímulo elétrico progressivo (degraus de 5 mA, com intervalo de 24 horas) até apresentarem convulsão generalizada com extensão clônica. Observou-se que os animais do grupo I (PILO) convulsionaram ao receberem aplicações de corrente menor do que os animais controle, e que, portanto, seu limiar convulsivo é mais baixo, como mostra a figura 22 ($p < 0,05$).

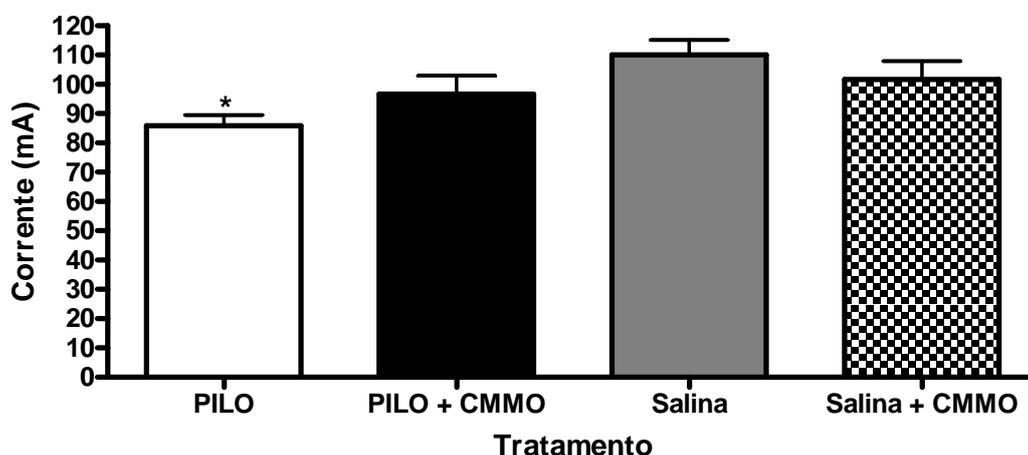


Figura 22 – O tratamento com PILO reduz o limiar convulsivo no teste do eletrochoque máximo, e a injeção de CMMO não leva o limiar elevado em animais epiléticos. Os dados expressam a corrente média necessária para convulsão generalizada com extensão tônico-clônica. Média \pm DP; ANOVA de uma via seguido de Teste de Tukey. * $p < 0,05$ n=6 por grupo.

4.6 Não há EGFP detectável nas amostras retiradas dos animais que receberam CMMO sete meses após o transplante.

Com o objetivo de verificar se as CMMO seriam identificadas nas estruturas cerebrais nós ensaiamos amostras dos hipocampus, cerebelo e bulbo olfatório dos animais transplantados dos grupos II e IV. Também analisamos amostras obtidas de órgãos periféricos: coração, pulmão e fígado, tendo em mente que as células também poderiam alojar-se nesses órgãos, já que a administração foi periférica.

A análise de todas as amostras retiradas dos animais transplantados não revelou a banda correspondente ao fragmento esperado. Este fragmento foi visualizado em todas as amostras ensaiadas que sabidamente continham células EGFP+ (obtidas da cauda de camundongos transgênicos ou de CMMO em cultura).

Paralelamente, realizou-se um teste da sensibilidade analítica da técnica em que diluições seriadas de DNA EGFP+ foram submetidas ao protocolo de PCR. As concentrações variaram de 200 ng/ μ L a 0,5 ng/ μ L. Foi possível visualizar a banda correspondente ao fragmento esperado somente nas concentrações superiores a 0,5 ng/ μ L.

DISCUSSÃO

O objetivo central desse estudo foi verificar se CMMO de camundongos, transplantadas sistemicamente, eram capazes de diminuir crises recorrentes em ratos, bem como promover melhora cognitiva e reduzir o limiar das crises convulsivas. As células injetadas não só reduziram as CERs como também levaram a uma melhora cognitiva, observada no LAM. Porém, a performance destes animais na tarefa de reconhecimento de objetos permaneceu inalterada após o transplante com CMMO em relação a seus controles com epilepsia. Além disso, embora os animais epiléticos tratados com CMMO apresentem um limiar convulsivo intermediário – entre o observado para animais controle e pilocarpina - essas células não foram capazes de elevá-lo significativamente em relação aos animais que não receberam transplante. Finalmente, não foi visualizada a presença de EGFP através de PCR em quaisquer amostras retiradas dos animais transplantados.

É comum entre pacientes com epilepsia do lobo temporal a presença de algum tipo de déficit cognitivo, e em modelos experimentais de epilepsia – como o da pilocarpina – também há comprometimento das funções cognitivas (Holmes 1997; Liu *et al.* 1994). Animais tratados com pilocarpina sabidamente apresentam déficit

de memória espacial no LAM, associado com a grande morte de células hipocampais induzida pelo modelo (Wu *et al.*, 2001; Hort *et al.*, 1999). Assim, treinamos os animais na tarefa do LAM para verificar se as CMMO poderiam reverter esse déficit, o que de fato aconteceu. A observação de que os animais epiléticos tratados com CMMO aprendem a tarefa melhor do que os não-tratados, e que retêm essa memória por mais tempo, indica que estas células têm efeito paliativo sobre o deterioro mnemônico associado ao modelo lítio-pilocarpina. Contudo, quando treinamos os animais na tarefa de reconhecimento de objetos o resultado obtido não foi o mesmo: os animais tratados com lítio-pilocarpina e transplantados com CMMO não demonstraram memória do objeto familiar, à exemplo dos animais epiléticos não transplantados e diferentemente dos animais controles. Vale mencionar aqui, que outros pesquisadores não encontraram alterações na performance desta tarefa em ratos submetidos ao tratamento com lítio-pilocarpina (Detour *et al.*, 2005). Entretanto, nesse estudo, Detour e colegas utilizaram protocolo de treino e teste diferente do nosso, e empregaram uma dose de pilocarpina equivalente à metade da que utilizamos, o que talvez explique as discrepâncias encontradas. Além disso, o papel do hipocampo na memória de reconhecimento ainda é controverso; enquanto há estudos, à exemplo do de Detour *et al.*, onde lesões hipocampais supostamente não alteram esse tipo de memória (Mumby *et al.*, 2002), outros mostram que o hipocampo tem sim papel importante no reconhecimento de objetos (Clark *et al.*, 2000; Rossato *et al.*, 2007).

Em primeira análise, nossos dados parecem contraditórios, porque se por um lado apontam que as CMMO injetadas em ratos tratados com PILO levam à melhora da memória espacial associada à aprendizagem do LAM, por outro as mesmas células aparentemente não têm efeito sobre a memória de reconhecimento de

objetos. Porém, se levarmos em consideração as estruturas encefálicas envolvidas com o aprendizado de cada uma destas tarefas é possível explicar essa discrepância. A memória espacial associada à aprendizagem do LAM parece ser dependente de uma ação coordenada de diferentes regiões do encéfalo e de diferentes sistemas de neurotransmissores que constituem uma rede funcional integrada. Lesões em regiões como estriado, prosencéfalo basal, cerebelo e córtex também comprometem a performance nessa tarefa, mas o LAM é particularmente sensível a lesões hipocâmpais (revisado por D'Hooge e Deyn, 2001). Já no paradigma de reconhecimento de objetos, as estruturas chave que modulam esse tipo de memória são além do hipocampo, cujo papel e participação ainda são amplamente discutidos, o córtex perirrinal, córtex pré-frontal mesial, prosencéfalo basal e *nucleus accumbens* (revisado por Dere *et al.*, 2007).

No modelo da PILO, a morte celular não se restringe ao hipocampo, mas sim atinge outras estruturas tais como córtex piriforme e entorrinal, tálamo, amígdala e neocórtex (Turski 1983). Assim, em primeiro lugar as diferenças entre nossos resultados e aqueles de Detour e colaboradores podem se dever à extensão da lesão provocada pela PILO: como usamos o dobro da dose de PILO, pode-se supor que a morte celular tenha atingido de forma mais intensa uma região muito mais ampla, comprometendo a função de outras estruturas que não o hipocampo que também estão relacionadas à memória de reconhecimento de objetos. O córtex entorrinal, por exemplo, conecta o hipocampo ao córtex perirrinal (Witter *et al.*, 1986), logo se pode supor que uma lesão nessa estrutura, poderia dificultar a ação coordenada das estruturas do lobo temporal, fundamental para a aquisição e retenção desse tipo de memória.

Da mesma maneira, a recuperação funcional do hipocampo poderia ter maior impacto na memória espacial relacionada ao LAM e ao mesmo tempo não ser capaz de reverter o déficit cognitivo observado no paradigma de reconhecimento de objetos. Um dos mecanismos de atuação propostos para as células-tronco é o estímulo da proliferação e diferenciação de nichos de células-tronco já presentes no tecido através de secreção/elevação de fatores tróficos. Assim, as CMMO poderiam atuar estimulando a neurogênese no hipocampo (Gross 2000). Como no giro denteado os novos neurônios gerados migram curtas distâncias até a camada granular interna e tornam-se neurônios granulares (Ming e Song, 2005), podemos hipotetizar que no caso de neurogênese induzida pelas CMMO, essa neurogênese seria capaz de repor populações hipocâmpais, mas não populações neurais de outras estruturas, favorecendo assim a aprendizagem de tarefas como o LAM, mas não do reconhecimento de objetos.

Uma vez que as crises convulsivas estão intimamente associadas com a epilepsia, mais do que avaliar o desempenho cognitivo dos animais transplantados, nós buscamos avaliar o efeito das CMMO sobre dois aspectos principais: o limiar convulsivo e a frequência de CERs. Através do teste do eletrochoque máximo pudemos observar que se por um lado o limiar convulsivo dos animais epiléticos tratados com CMMO não é significativamente diferente do não-tratados, por outro lado ele também não é significativamente diferente daquele dos animais controles, enquanto que controles e epiléticos são diferentes entre si. A posição intermediária dos animais epiléticos transplantados pode ser um indicativo de que há uma tendência ao aumento do limiar convulsivo entre os animais injetados com CMMO. Como esse teste contou com amostra de apenas seis animais por grupo, é possível que o aumento da amostra confirme essa tendência. Também é possível que o

resultado do teste fosse diferente se a avaliação tivesse sido feita após um tempo mais longo de transplante. À exemplo do que observamos para a frequência de crises – menor quanto maior o tempo de transplante – podemos especular que o limiar se eleve com o passar do tempo. Na avaliação da frequência de crises, nossos resultados foram claramente positivos, demonstrando que as CMMO reduzem a frequência de CERs em cerca de 20% nos primeiros sete dias pós-transplante e em cerca de 35% em relação aos animais que não receberam as células. Ainda, quando o grupo de animais transplantados é comparado com ele mesmo, a frequência de crises é menor após o transplante.

Outros pesquisadores já demonstraram que células-tronco têm a capacidade de controlar as CERs, bem como expressar marcadores de interneurônios. Chu e colaboradores (Chu *et al.* 2004) examinaram os efeitos de células-tronco neurais obtidas da zona ventricular de embriões humanos nas CERs de ratos que passaram por SE. O transplante foi realizado somente um dia após a indução de SE, e a exemplo de nosso estudo, foi feito via veia da cauda. Entre 28 a 35 dias após o SE, apenas 13% dos animais que receberam as células apresentavam CERs. Além disso, as células doadoras, expressando β -galactosidase, co-expressavam marcadores de interneurônios como GABA e parvalbumina, sugerindo que as células derivadas das CT se diferenciam em células sintetizantes de GABA.

Em seu estudo, Chu obteve uma redução muito mais drástica na frequência de crises ($0,05 \pm 0,02$ /dia nos animais transplantados vs $1,37 \pm 0,22$ nos não-transplantados), o que pode se dever às principais diferenças entre o desenho experimental de nosso trabalho e do de Chu que são:

- 1) tipo de célula empregada: CMMO de camundongos contra células neurais humanas, ambas aplicadas via veia da cauda, ambos xenotransplante.
- 2) período em que as células foram injetadas: 22 *dias* após o SE em nosso estudo e 24 *horas* após o SE no estudo de Chu. Assim, enquanto Chu avaliou o efeito do transplante no período latente da doença – talvez efeito na epileptogênese/neuroproteção, nós optamos por avaliar o efeito das células sobre o período crônico, quando os animais já apresentavam CERs, por ser a utilização terapêutica das células no período mais próxima da aplicação clínica.
- 3) período de monitoramento das CERs: durante 7 dias, com início 28 dias após o transplante para Chu, enquanto no nosso estudo monitoramos por 21 dias (durante 7 dias anteriores e 14 posteriores ao transplante); Talvez seja esse o principal motivo pelo qual há discrepância entre os resultados, uma vez que Chu deu início ao monitoramento no momento temporal em que nós demos término. Uma vez que verificamos que entre os primeiros sete dias de monitoramento pós-transplante e os últimos sete houve redução significativa na frequência de crises, é possível especular que as crises tornam-se menos freqüentes com o passar do tempo.

Outra diferença marcante entre os trabalhos é que Chu e colaboradores demonstram a presença de células transplantadas no hipocampo e em outras regiões encefálicas, que expressam marcadores de interneurônios. Nós, entretanto, não verificamos a banda correspondente à EGFP, utilizando técnica diferente.

Uma vez que as células transplantadas levaram à melhora comportamental, seja reduzindo a frequência de CERs, seja no melhor desempenho apresentado no LAM pelos animais tratados, é evidente que atuaram de alguma maneira no sistema nervoso central dos animais que as receberam. Existem quatro hipóteses que

podem explicar porque não foram encontradas evidências da presença de células transplantadas por PCR. Duas dessas são o longo tempo decorrido do transplante (7 meses) e a sensibilidade da técnica, que não apontou como positivas amostras contendo DNA em concentrações abaixo de 0,5 ng/ μ L. Considerando que apesar da injeção venosa periférica de células, não foi detectada presença em quaisquer órgãos estudados, é possível admitir que decorrido tanto tempo essas células possam ter passado por um processo de morte natural. Também é possível que a quantidade de células, e conseqüentemente a quantidade de DNA contendo EGFP, seja muito pequena, e mesmo amplificada não possa ser visualizada no gel. Talvez uma *nested-PCR*, ou uma PCR em tempo real, com aumento da sensibilidade da técnica, poderia ser útil na detecção dessas células. Em terceiro lugar, como realizamos um xenotransplante, poderia se supor a não detecção de EGFP como conseqüência da resposta imunológica. Contra esta hipótese, pesam dois argumentos: a) mesmo na ausência de imunossupressão células xenotransplantadas podem migrar e sobreviver no encéfalo (Irons *et al.*, 2004); e principalmente, b) obtivemos resposta comportamental positiva. A última hipótese é de que o mecanismo de ação dessas células pode não ser o de diferenciação dessas células em células nervosas, e conseqüente reposição direta da população neural perdida durante a indução e progressão da epilepsia, já que este não é o único mecanismo sugerido para a ação de células-tronco. De fato, atualmente, são propostos seis mecanismos pelos quais células-tronco adultas poderiam contribuir para o reparo tecidual: transdiferenciação, de-diferenciação, transdeterminação, fusão celular, comportamento de células-tronco pluripotentes verdadeiras e produção de fatores tróficos (Rice e Scolding, 2004).

Sabe-se hoje que, a despeito do que se acreditou por anos, novos neurônios podem ser integrados a determinadas regiões do encéfalo adulto a partir de células progenitoras neurais ou células-tronco adultas neurais, em um processo chamado neurogênese (Gross, 2000). Na maioria dos mamíferos, a neurogênese ocorre ao longo de toda a vida na zona subventricular do ventrículo lateral e na zona subgranular do GD no hipocampo. Os fatores que regulam essa proliferação *in vivo* ainda não foram totalmente caracterizados, mas membros das famílias de fatores de crescimento FGF (fator de crescimento de fibroblasto) e EGF (fator de crescimento epidérmico) são usados para propagar progenitores neurais *in vitro* e podem ter funções semelhantes *in vivo* (revisado por Ming e Song, 2005). Assim, as células-tronco poderiam promover a recuperação funcional por outros meios que não a reposição celular direta, como por exemplo, pela secreção de fatores tróficos. Esses fatores tróficos poderiam por sua vez promover a sobrevivência, migração e diferenciação de células progenitoras neurais endógenas (Chopp e Li, 2002). Assim, na ausência de expressão molecular de CMMO detectáveis no encéfalo, nós podemos hipotetizar que as CMMO transplantadas poderiam exercer um efeito trófico direto no tecido ou levar a uma elevação da atividade trófica endógena.

A idéia de que o mecanismo de ação das CMMO pode estar ligado a fatores tróficos é reforçada por trabalhos que apontam que o tratamento de células doadoras com uma mistura de FGF-2 (fator de crescimento de fibroblasto) e BDNF (fator de crescimento neurotrófico cerebral-derivado), anterior ao enxerto dessas células fetais no hipocampo, é eficiente na supressão da epileptogênese (Rao, *et al.*, 2006), e que o FGF-2, por exemplo, contribui com a sobrevivência e diferenciação de neurônios hipocâmpais em desenvolvimento em condições adversas (Eves *et al.*, 2001). Ainda, Kanter-Schlifke e colaboradores demonstraram em estudo com terapia

gênica (Kanter-Schlifke *et al.*, 2007) que a expressão aumentada de GDNF no hipocampo de ratos suprime crises epilépticas em modelo de abrasamento e SE.

Além disso, em um modelo de isquemia, Borlongan e colegas verificaram que a presença de células nidadas no encéfalo não é pré-requisito para neuroproteção, e que o tratamento com células-tronco do cordão umbilical injetadas periféricamente eleva os níveis de fatores neurotróficos, correlacionando-se positivamente com redução da área de infarto e melhora de funções comportamentais (Borlongan *et al.*, 2004). Este mesmo trabalho vincula a necessidade de abertura da barreira hematoencefálica (BHE) ao efeito dessas moléculas tróficas, sendo a permeabilidade da BHE induzida por manitol crítica para que os fatores tróficos derivados do transplante exercessem neuroproteção. Nesse estudo, a abertura espontânea produzida pela oclusão da artéria cerebral média não foi suficiente para permitir a entrada dos fatores tróficos derivados das células transplantadas no SNC. No entanto, como nosso estudo é em epilepsia crônica, acreditamos que a BHE não seja um impedimento para a passagem dessas moléculas, visto que ela sabe durante as convulsões (Costa, 1972), que por sua vez são freqüentes no modelo que utilizamos.

Finalmente, se por um lado o SE induz um aumento inicial na neurogênese no giro denteado (Parent *et al.*, 1997), a epilepsia do lobo temporal *crônica* está associada com neurogênese consideravelmente diminuída (Hattiangady *et al.*, 2004). Hattiangady e colegas demonstraram também que o declínio na neurogênese é consideravelmente maior em ratos que apresentam um maior número de CERs, sugerindo que a maior freqüência de CERs durante a epilepsia crônica é prejudicial à neurogênese no GD (Hattiangady *et al.*, 2004). Soma-se a isso o fato de que

durante a epilepsia crônica há queda na concentração de diversos fatores tróficos que atuam na proliferação de células-tronco neurais (Shetty *et al.*, 2003, Hattiangady *et al.*, 2004) e que a neurogênese diminuída pode contribuir para a persistência de crises e déficits de memória e aprendizagem. Logo, estratégias que aumentem a produção de neurônios no hipocampo epilético, seja exercendo efeito trófico direto ou elevando a atividade trófica endógena, podem ser úteis para o tratamento da epilepsia do lobo temporal.

CONCLUSÕES

Neste trabalho investigamos os efeitos das células da porção mononuclear da medula óssea na frequência de crises, limiar convulsivo e desempenho cognitivo de animais tratados com lítio-pilocarpina. Nosso estudo possibilitou as seguintes conclusões:

1. O transplante de CMMO reduz a frequência de crises espontâneas recorrentes em aproximadamente 30% quando são avaliados os primeiros 14 dias subsequentes à injeção de células.

2. O tratamento com lítio-pilocarpina leva à déficit cognitivo detectável no labirinto aquático de Morris e esse déficit é revertido pelo transplante de CMMO.

3. O tratamento com lítio-pilocarpina compromete a memória de reconhecimento de objetos e o transplante de CMMO não reverte esse déficit.

4. Decorridos sete meses do transplante de CMMO, a presença de EGFP não é detectável por PCR no hipocampo, cerebelo, bulbo olfatório, coração, pulmão e fígado.

PERSPECTIVAS FUTURAS

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

1) Aumentar o tempo de monitoramento por vídeo, abrangendo um período mais longo após o transplante das células.

2) Aumentar a amostra de animais submetidos ao teste do eletrochoque máximo, e realizar o teste quando decorrido maior tempo de transplante, para avaliar com mais clareza o efeito das CMMO sobre o limiar convulsivo. Também pretendemos utilizar outras técnicas para avaliar esse mesmo aspecto, como a injeção de pentilenotetrazol.

3) Realizar ensaios de *nested*-PCR e PCR em tempo real, mais sensíveis à detecção de EGFP, bem como avaliar a presença de células transplantadas no encéfalo através de outras ferramentas, como imuno-histoquímica.

4) Avaliar a hipótese de que o efeito das células transplantadas possa ser mediado por fatores tróficos, utilizando para isso técnicas bioquímicas.

REFERÊNCIAS

AZIZI A.S., STROKES, D., AUGELLI B.J., DIGIROLAMO, C. *et al.* Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats-similarities to astrocyte grafts. **Proc. Natl. Acad Sci USA** 95: 3098-3913, 1998.

BJORNSON, C.R., RIETZE, R.L., REYNOLDS, B.A., MAGLI, M.C., AND VESCOVI, A.L. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. **Science** 283: 534-537, 1999.

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

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

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

BORLONGAN, C.V., HADMAN, M., SANBERG, C.D., SANBERG, P.R. Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke. **Stroke** 35:2385-89, 2004.

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

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

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

CHOPP, M., LI, Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. **Lancet** 1:92-100, 2002.

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

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

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

COSTA, J. C. Influência de eletroconvulsões sobre a permeabilidade da barreira sangue-cérebro ao azul tripan. **Arquivos de Neuro-psiquiatria** 30:2-7, 1972.

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

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

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

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

DEZAWA, M., TAKAHASHI, I., ESAKI, M., TAKANO, M., SAWADA H. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. **Eur J Neurosci** 14(11):1771-6, 2001.

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

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

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

EGLITIS, M.A, E MEZEY, E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. **Proc Natl Acad Sci USA**. 944(8):4080-5, 1997.

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

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

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

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

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

EVES, E.M., SKOCZYLAS, C., YOSHIDA, K., ALNEMRI, E.S., ROSNER, M.R. FGF induces a switch in death receptor pathways in neuronal cells. **J. Neurosci.** 21, 4996–5006, 2001.

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

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

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

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

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

GROSS, C.G. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. **Nat. Rev. Neuroscience** 1:67-73, 2000.

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

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

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

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

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

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

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

IRONS H, LIND JG, WAKADE CG, *et al.* Intracerebral xenotransplantation of GFP mouse bone marrow stromal cells in intact and stroke rat brain: graft survival and immunologic response. **Cell Transplant** 13:283-294, 2004.

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

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

KANTER-SCHLIFKE, I., GEORGIEVSKA, B., KIRIK, D., KOKAIA M. Seizure Suppression by GDNF Gene Therapy in Animal Models of Epilepsy. **Molecular Therapy** 15 6, 1106–1113, 2007.

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

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

KODA M, OKADA S, NAKAYAMA T, KOSHIZUKA S, KAMADA T, NISHIO Y, *et al.* Hematopoietic stem cell and marrow stromal cell for spinal cord injury in mice. **Neuroreport** 16:1763-1767, 2005.

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

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

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

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

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

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

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

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

MCNAMARA, J.O. Fármacos eficazes no tratamento das epilepsias. In: Gimán, A.G.; Goodman, L.S.; Hardman, J.G.; Limbird, L.E. (Ed.) **Goodman e Gilman As bases farmacológicas da terapêutica**. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, p.391-410, 2003.

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

MIMURA, T., DEZAWA, M., KANNO, H., SAWADA, H., YAMAMOTO I. Peripheral nerve regeneration by transplantation of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in adult rats. **J Neurosurg** 101(5):806-12, 2004.

MING, G., SONG, H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. **Annual Rev. Neuroscience** 28:223-50, 2005.

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

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

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

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

PARENT, J.M., YU, T.W., LEIBOWITZ, R.T. *et al.* Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. **Journal Neuroscience** 17:3727:38, 1997.

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

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

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

PRIEL, M. R., N. F. DOS SANTOS, *et al.* Developmental aspects of the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy Research** 26(1): 115-21, 1996.

RACINE, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. **Electroencephalogr Clin Neurophysiol** 32(3): 281-94, 1972.

RAO, M.S., HATTIANGADY, B., SHETTY, A.K. Fetal hippocampal CA3 cell grafts enriched with FGF-2 and BDNF exhibit robust long-term survival and integrin and suppress aberrant mossy fiber sprouting in the injured middle-aged hippocampus. **Neurobiology of Disease** 21: 276 – 290, 2006.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Stem Cell Information. **The National Institutes of Health resource for stem cell research.** <http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics4.asp> em 01/03/2007.

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

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

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

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

WITTER, M.P., ROOM, P., GROENEWEGEN, H.J., LOHMAN, A.H. Connections of the parahippocampal cortex in the cat. V. Intrinsic connections; comments on input/output connections with the hippocampus. **Journal of Comparative Neurology** 252:78–94, 1986.

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

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

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

