



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO
NEURAIIS EM MODELO EXPERIMENTAL DE
EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL INDUZIDO
POR LÍTIO-PILOCARPINA EM RATOS**

LIAN FELIPE PAIVA PONTES DE CARVALHO

Salvador - Bahia

2013

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

**TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO
NEURAIS EM MODELO EXPERIMENTAL DE
EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL INDUZIDO
POR LÍTIO-PILOCARPINA EM RATOS**

LIAN FELIPE PAIVA PONTES DE CARVALHO

Orientador: Dra. Milena Botelho Pereira Soares

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para a obtenção de grau título de Mestre.

Salvador - Bahia

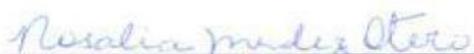
2013

“TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO NEURAIS EM MODELO EXPERIMENTAL DE EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL INDUZIDO POR LÍTIO-PILOCARPINA EM RATOS.”

LIAN FELIPE PAIVA PONTES DE CARVALHO

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Rosália Mendez-Otero
Professora titular
Universidade Federal do Rio de Janeiro



Dr.^a Maria Fernanda Rios Grassi
Pesquisadora Titular
CPqGM/FIOCRUZ



Dr. Mitermayer Galvão dos Reis
Pesquisador Titular
CPqGM/FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial meus pais, minhas irmãs e minha tia Regina pelo apoio incondicional nesses anos todos e por sempre estarem prontos para me ajudar. Vocês são a minha base, meu ponto de apoio. Um abraço especial também para os meus tios Lain e Neuza e meus primos Lain César e Gabriel, que me receberam de braços abertos aqui em Salvador.

À minha orientadora Dra. Milena Soares pela oportunidade e por ter me ajudado inúmeras vezes, seja dentro do laboratório ou fora dele. Perdão por ter te desapontado algumas vezes e muito, muito obrigado por partilhar o seu conhecimento e experiência, essencial para a minha formação acadêmica e que vou levar comigo nesse meu futuro na área de pesquisa.

Ao Dr. Ricardo Ribeiro, por me ter me aceitado em seu laboratório durante todo este período, fornecendo o suporte necessário ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, pelo apoio acadêmico e pela oportunidade de desenvolvimento deste projeto.

À Sra Ana Fiscina da biblioteca Eurydice Pires de Sant`Anna peja ajuda na elaboração da versão final da dissertação.

Ao Bruno Solano, que com seu otimismo contagiante e arsenal de soluções foi na prática um co-orientador e acima de tudo um grande amigo nesse período. Obrigado por também ter compartilhado um pouco do seu conhecimento e me ensinado muita coisa que eu hoje sei sobre laboratório.

À Dra Zaquer Costa, por ter me passado um pouco da sua experiência na realização do modelo experimental e durante a análise da perda neuronal.

À todos meus amigos do CBTC. Em especial Daniela Nascimento, Carine Azevedo e Adriano Alcântara que me ajudaram desde o momento que entrei no laboratório e em vários momentos do meu trabalho; À Helena da Hora pela ajuda nos experimentos da parte inicial do trabalho; À Rejane Hughes que sempre me apoiou e que me ajudou durante a escrita da dissertação; À Kátia Nunes com todo o seu poder em me acalmar em vários momentos; À Juliana Vasconcelos pela ajuda durante a realização do ELISA; À Roseane Barreto por realizar o processamento histológico e corte das lâminas; À Lílian Jesus por realizar a avaliação citogenética; À Cristina Aragão pelo apoio nos procedimentos no biotério; À Edlúcia dos Santos pela ajuda e conversas que deixaram meu dia-a-dia mais leve. À todas as pessoas do CBTC, obrigado pelo apoio e pela amizade.

*"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."*

Bertolt Brecht.

CARVALHO, Lian Felipe Paiva Pontes de. Transplante de células-tronco neurais em modelo experimental de epilepsia do lobo temporal induzido por lítio-pilocarpina em ratos. 76 f. i. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Epilepsia do lobo temporal (ELT) é uma desordem cerebral de alta prevalência e de caráter neuroinflamatório crônico e progressivo, geralmente levando à refratariedade medicamentosa. O transplante de células-tronco neurais (NSC, do inglês *neural stem cell*) é uma boa alternativa para o tratamento dessa doença, devido à capacidade dessas células de proliferação e diferenciação nos tipos celulares presentes no sistema nervoso central (SNC), além de possuírem efeitos imunomodulatórios e neurotróficos. **OBJETIVO:** Nosso estudo teve como objetivo caracterizar células-tronco neurais adultas e avaliar seu potencial terapêutico quando administradas na fase aguda do modelo de ELT induzida por lítio-pilocarpina em ratos *Wistar*. **MATERIAL E MÉTODOS:** Nosso estudo, inicialmente, se concentrou na caracterização, por imunofluorescência e citometria de fluxo, de NSC isoladas da zona subventricular de camundongos C57/BL6 adultos, a avaliação da segurança dessas células, através de análise cromossômica e de ensaio de formação de tumor, e a análise do potencial imunomodulatório das células *in vitro*, por ensaios de linfoproliferação. Em seguida, avaliou-se o efeito do transplante das NSC, via intravenosa, na fase aguda de modelo de ELT em ratos induzidos por lítio-pilocarpina. Os animais foram eutanasiados 24 horas e 12 dias depois do transplante para análises da migração celular, proteção da perda neuronal e quantificação dos níveis das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-10 no soro por ELISA e *in situ* por imunofluorescência. **CONCLUSÕES:** As análises de caracterização confirmaram que a linhagem celular estudada possui fenótipos característicos de NSC (positividade para nestina e *side population*), possui a capacidade em se diferenciar em células da linhagem neuronal e glial, possui potencial imunossupressor na proliferação de esplenócitos *in vitro* e não forma tumores em camundongos SCID, mostrando que a linhagem é segura para o uso em terapia celular. O resultado do transplante mostrou que apesar de ter sido observado presença das NSC transplantadas no baço, elas não foram encontradas nos cérebros, colocando em dúvida o seu potencial migratório para o local da lesão. As NSC não foram capazes de proteger os animais contra a perda neuronal nos dois pontos de eutanásia avaliados, mas diminuiu de forma significativa a quantidade de IL-1 β no cérebro 24 horas depois, sem afetar os níveis de IL-6. O presente estudo mostrou que apesar dos resultados promissores *in vitro*, novas abordagens relacionadas às condições de transplante dever ser consideradas para se obter melhor eficácia ao usar essas células *in vivo*.

Palavras-chave: Epilepsia, Pilocarpina, Inflamação, Célula-tronco adulta.

CARVALHO, Lian Felipe Paiva Pontes de. Neural stem cell transplantation in an rat experimental model of temporal lobe epilepsy induced by lithium-pilocarpine. 76 f. i. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Temporal lobe epilepsy (TLE) is a highly prevalent cerebral disorder presenting a chronic and progressive neuroinflammatory profile, usually leading to drug resistance. Neuronal stem cell (NSC) transplantation is a good choice for treatment of this disease, due to proliferative characteristics and the ability to differentiate into various cell types within the central nervous system (CNS). Furthermore, they have immunomodulatory and neurotrophic effects. **OBJECTIVE:** Our study aimed to characterize adult NSC and evaluate their therapeutic potential when administered in a rat model of lithium-pilocarpine-induced ELT. **MATERIAL AND METHODS:** Our first objectives were to characterize NSC isolated from C57BL/6 adult mice subventricular zone, to evaluate their safety and potential in *in vitro* immunomodulation. Then, we evaluated the effect of intravenous NSC transplantation, during the acute phase of lithium-pilocarpine-induced TLE in a Wistar rat model. The animals were euthanized 24 hours and 12 days following transplantation, and evaluation of cell migration, protection against neuronal loss and quantification of IL-1, IL-6 and IL-10 cytokines was performed in serum and *in situ*. **CONCLUSIONS:** Characterizations analyses confirmed that this cell lineage, 1) present NSC characteristic phenotypes (nestin and side population positivity), 2) have the ability to differentiate into neuronal and glial lineage cells, 3) have the capacity to suppress *in vitro* splenocyte proliferation and 4) do not form tumors in SCID mice, thus making it safe for use in cellular therapy. The transplantation results showed that despite NSC presence in the spleen post-transplantation, cells were not detected in the brain, suggesting that migratory capacity of NSC into the injured site may pose additional complications. The NSC did not protect animals against neuronal loss at both euthanasia time points observed, however a significant decrease in brain IL-1 β , accompanied by unaltered IL-6 levels was observed, 24 hours after transplantation This study showed that despite promising *in vitro* results, new approaches related to transplantation conditions should be considered in order to improve *in vivo* efficacy.

Keywords: Epilepsy, Pilocarpine, Inflammation, Adult stem cell.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Localização e estruturas internas do hipocampo de roedores.	15
Figura 2	Exemplos de crises epilépticas em ratos.	20
Figura 3	Células hematopoéticas e neuroglia.	23
Figura 4	Localização dos nichos de neurogênese do cérebro.	24
Figura 5	Efeitos das NSC após o transplante em desordens neurológicas experimentais.	30
Figura 6	Desenho experimental mostrando as etapas do trabalho.	32
Figura 7	Esquema de indução do SE e eutanásia dos animais.	34
Figura 8	Contagem neuronal: representação de um quadrante de 80 x 80 μm .	40
Figura 9	Cultura das NSC.	43
Figura 10	Caracterização das NSC e das células diferenciadas por imunofluorescência.	45
Figura 11	Análise de <i>side population</i> das NSC por teste de exclusão de Hoescht 33342 em citômetro de fluxo.	46
Figura 12	Análise citogenética das NSCs.	47
Figura 13	Teste de formação de tumor das NSC.	48
Figura 14	Gráfico representativo de ensaio de linfoproliferação das NSC.	49
Figura 15	Análise de migração celular por imunofluorescência.	50
Figura 16	Análise histológica do cérebro dos ratos.	51
Figura 17	Quantificação da perda neuronal no hipocampo dos ratos.	52
Figura 18	Quantificação dos níveis de citocinas no cérebro dos ratos.	53
Tabela 1	Resumo das induções do SE.	50

LISTA DE ABREVIATURAS

AVC	Acidente vascular cerebral
BHE	Barreira hemato-encefálica
CER	Crise espontânea recorrente
CT	Célula-tronco
DAE	Droga antiepilética
Dcx	Doublecortina
EGF	Fator de crescimento de epiderme
ELT	Epilepsia do lobo temporal
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GFP	Proteína fluorescente verde
i.p	intraperitoneal
iPSC	Célula-tronco pluripotente induzida
NSC	Célula-tronco neural, do inglês <i>neural stem cell</i>
SE	<i>Status epilepticus</i>
SNC	Sistema nervoso central
SGZ	zona sub-granular do giro dentado no hipocampo, do inglês <i>sub-granular zone</i>
SVZ	zona subventricular dos ventrículos laterais, do inglês <i>sub-ventricular zone</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1	EPILEPSIA	12
2.2	EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL (ELT)	14
2.3	MODELO EXPERIMENTAL DE EPILEPSIA	18
2.3.1	Modelo de epilepsia induzido por lítio-pilocarpina	19
2.4	NOVAS TERAPIAS PARA EPILEPSIA	21
2.5	CÉLULAS-TRONCO	21
2.5.1	Células-tronco neurais (NSC)	23
2.6	TERAPIA CELULAR EM EPILEPSIA	25
2.6.1	Transplante de NSC em epilepsia	27
2.6.2	Mecanismos de ação das NSC transplantadas	28
3	OBJETIVOS	31
3.1	OBJETIVO GERAL	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	DESENHO EXPERIMENTAL	32
4.2	ANIMAIS	33
4.3	INDUÇÃO DA EPILEPSIA PELO MODELO LÍTIO-PILOCARPINA	33
4.4	CULTIVO E TRANSPLANTE DAS NSC	34
4.5	ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO DAS NSC	35
4.6	CARACTERIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES CELULARES OBTIDAS	36
4.6.1	Ensaio de <i>side population</i>	36
4.6.2	Avaliação citogenética	36
4.6.3	Ensaio de formação de tumor	37
4.6.4	Imunofluorescência	37
4.7	ENSAIO DE LINFOPROLIFERAÇÃO	38
4.8	EUTANÁSIA E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	39
4.9	COLORAÇÃO DE NISSL E CONTAGEM NEURONAL	40
4.10	IMUNOFLUORESCÊNCIA EM TECIDO PARAFINADO	41
4.11	ELISA.....	42

4.12	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	42
5	RESULTADOS	42
5.1	CULTIVO E DIFERENCIAÇÃO DAS NSC	42
5.2	ANÁLISE DE <i>SIDE POPULATION</i> DAS NSC	46
5.3	ANÁLISE CITOGENÉTICA E DO POTENCIAL TUMOROGÊNICO DAS NSC	47
5.4	POTENCIAL IMUNOMODULATÓRIO <i>IN VITRO</i> DAS NSC	48
5.5	INDUÇÃO DA EPILEPSIA	49
5.6	AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR	50
5.7	QUANTIFICAÇÃO DA PERDA NEURONAL	51
5.8	QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ- E ANTI-INFLAMATÓRIAS <i>IN SITU</i> E NO SORO	53
6	DISCUSSÃO	54
7	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é uma desordem cerebral de alta prevalência caracterizada pela presença de predisposição a crises epiléticas, com consequências principalmente na qualidade de vida dos indivíduos acometidos. O tratamento atual é baseado no uso de drogas antiepiléticas (DAEs) que agem nos sintomas da doença, sem parar ou reverter os eventos que causam o aparecimento das crises. Além disso, grande parte dos pacientes se tornam refratários ao tratamento medicamentoso, sendo necessárias pesquisas que visem o desenvolvimento de novas e efetivas opções de tratamento.

Alterações como morte neuronal, aparecimento de um circuito excitatório recorrente e neuroinflamação, principalmente em determinadas áreas do hipocampo, são marcas registradas da ELT. Atualmente essa doença pode ser considerada neuroinflamatória crônica de caráter progressivo. Por essa razão, estratégias terapêuticas utilizando medicina regenerativa, como o caso da terapia celular, se tornam úteis e uma importante área de estudo. Como o sistema nervoso central (SNC) possui uma taxa de regeneração pós-lesão muito baixa, em comparação com outros órgãos, terapias que visam aumentar essa regeneração, seja por integração de células exógenas providas de transplante, seja por manipulação do microambiente alterado, são de grande interesse.

Têm sido realizados vários estudos envolvendo transplante de células tronco em modelos experimentais de epilepsia, principalmente células-tronco neurais (NSC). Esse tipo celular já foi descrito como capaz de migrar e se integrar no SNC após transplante e se diferenciar em três dos principais tipos celulares desse sistema: neurônios, astrócitos e oligodendrócitos. Além disso, as NSC já foram descritas como tendo atividade imunossupressora e neurotrófica.

Apesar do potencial de migração e integração da NSC e os efeitos benéficos sobre as crises epiléticas e memória após o transplante dessas células já estarem bem definidos em estudos anteriores, não há uma relação clara do papel das NSC na neuroinflamação existente em modelos animais de ELT. O trabalho atual visa esclarecer alguns pontos sobre essa relação.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 EPILEPSIA

A epilepsia é uma desordem cerebral de etiologia variada caracterizada pela presença de predisposição a crises epiléticas, com consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais (FISHER et al., 2005). A definição atual mais aceita é a da ocorrência de duas ou mais crises não provocadas e separadas por, no mínimo, 24 horas (ILAE, 1993). A crise epilética é definida como a ocorrência transitória de sinais e/ou sintomas devido à atividade neuronal excessiva no cérebro, resultante de um padrão anormal específico de excitabilidade e sincronia entre neurônios de determinadas áreas cerebrais (FISHER et al., 2005). Os mesmos sinais e sintomas podem estar presentes em crises não-epiléticas, como as derivadas de diversas patologias tais como as enxaquecas, doenças cardíacas e distúrbios de sono, assim como febres e problemas psicológicos (SHINNAR e GLAUSER, 2002; BINDER e SALINSKY, 2007; MEDICINE, 2012), mostrando que as crises podem estar presentes mesmo em indivíduos sem a epilepsia.

A epilepsia é o segundo transtorno neurológico crônico mais frequente, atrás somente da enxaqueca (BANERJEE et al., 2009), com prevalência estimada entre 1 e 2% na população mundial, e incidência de 50 a 120 novos casos por 100.000 habitantes por ano (YOUNG e DURING, 2004; BANERJEE et al., 2009). Esta doença é mais frequente nos países subdesenvolvidos, devido principalmente à deficiência no atendimento médico e à maior incidência de doenças infecciosas (DUA et al., 2006; NGUGI et al., 2010). No Brasil, a prevalência chega a 20,3 em 1000 indivíduos (FERNANDES, 1998).

A epilepsia compreende mais de 25 tipos de síndromes (BERG et al., 2010). Já está bem claro que, em determinados tipos de epilepsia, o fator genético é essencial (PANDOLFO, 2011), enquanto que em outros há apenas uma predisposição. Nestes últimos são necessários fatores desencadeantes para que a epilepsia se estabeleça, tais como traumas e infecções no sistema nervoso central (SNC), principalmente durante a gravidez, no período perinatal e na infância, além do mau funcionamento de canais iônicos, tumores cerebrais e doenças metabólicas e degenerativas (SANKAR et al., 2002; MLODZIKOWSKA-ALBRECHT et al., 2007). Porém, em cerca de 60% dos casos, a etiologia é desconhecida (DAS et al., 2012).

Apesar de se observar um aumento do risco de morte e diminuição da expectativa de vida em 10 anos (MEDICINE, 2012), a epilepsia raramente leva à morte, esta sendo

decorrente principalmente de eventos secundários às crises, tais como quedas, acidentes de carro, afogamentos e engasgamentos, além de suicídios e morte súbita inesperada (MEDICINE, 2012). Porém, essa é uma patologia onde há um considerável impacto na qualidade de vida dos acometidos. Crises pouco controladas podem levar à perda de autonomia do paciente, e o caráter progressivo da doença pode levar a comorbidades, tais como declínio cognitivo, principalmente perda de memória e de atenção, depressão, ansiedade, enxaquecas e desordens de sono (PITKANEN e SUTULA, 2002; MEDICINE, 2012).

No caso de pacientes com epilepsia, a maioria das crises dura de frações de segundo a menos de um minuto e terminam sem precisar de intervenção (MEDICINE, 2012). *Status epilepticus* (SE) é geralmente definido como uma crise ou série de crises prolongadas sem recuperação total da consciência entre elas, geralmente durando mais de 5 minutos (MEDICINE, 2012). As crises podem ser divididas em parciais e generalizadas. Crises parciais são aquelas em que apenas uma região cerebral é afetada, podendo a atividade elétrica excessiva se espalhar para outras partes do cérebro, já as crises generalizadas começam nos dois hemisférios cerebrais simultaneamente (DUNCAN et al., 2006). Sabe-se que, em alguns indivíduos, elas podem ser desencadeadas por stress e privação de sono (YANG et al., 2010).

Apesar do diagnóstico da epilepsia ser basicamente clínico, exames de eletroencefalograma e análise de imagens por ressonância magnética de crânio, cintilografia cerebral por emissão de fóton único (SPECT) e a tomografia por emissão de pósitrons (PET) são importantes para analisar a gravidade da lesão, ajudar na identificação do tipo de epilepsia, assim como identificar possíveis candidatos à terapia cirúrgica (WIESER e EPILEPSY, 2004).

O tratamento atual é baseado no uso de drogas antiepiléticas (DAEs) que em muitos casos possuem efeitos benéficos apenas temporariamente, sendo necessário ser continuado pela vida toda (MLODZIKOWSKA-ALBRECHT et al., 2007). Além disso, elas agem apenas diminuindo os sintomas da doença, promovendo a redução da frequência das crises, sem parar ou reverter os eventos que acabam levando ao aparecimento dessas (LINARD et al., 2010). Elas também estão associadas a efeitos colaterais e não possuem efeitos nos sintomas de depressão e de deficiência de memória e aprendizado (SHETTY, 2012). Aproximadamente 30% dos pacientes com diagnóstico de epilepsia possuem crises que não

são adequadamente controladas com DAE ou desenvolvem efeitos adversos limitantes e evoluem, assim, para a epilepsia fármaco-resistente (AL-OTAIBI et al., 2011).

Atualmente há mais de 40 drogas disponíveis no mercado para tratar epilepsia (DAS et al., 2012). Sabe-se que algumas delas evitam a amplificação anormal dos impulsos nervosos por serem antagonistas de canais de sódio e cálcio ou por serem agonistas de GABA (DAS et al., 2012). A cirurgia torna-se uma solução quando a medicação falha e apenas uma região do cérebro é afetada, permitindo a sua remoção. Esse tratamento cirúrgico, porém, é limitado devido ao risco de perda de funções cerebrais (SISODIYA, 2007; NG e VALIANTE, 2010). Devido às limitações existentes no tratamento atual das epilepsias, é necessário desenvolver novas alternativas terapêuticas.

2.2 EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL (ELT)

A ELT é caracterizada por crises parciais recorrentes (DE LANEROLLE e LEE, 2005), é o tipo de epilepsia mais comum, afetando 40% dos pacientes (CHU et al., 2004), e possui grande refratariedade após tratamento medicamentoso (por volta de 40%) (SHARMA et al., 2007). As crises nos pacientes com ELT costumam iniciar-se após incidentes iniciais precipitantes, tais como convulsões febris, tumores, traumas e infecções intracranianas (SHARMA et al., 2007; YANG et al., 2010; O'DELL et al., 2012). Entre esses incidentes e o começo das crises espontâneas recorrentes (CERs) existe um período latente no qual o paciente encontra-se clinicamente assintomático e que dura entre 5 a 10 anos (WIESER e EPILEPSY, 2004; O'DELL et al., 2012). Durante a evolução da doença observa-se um período silencioso entre a primeira crise e o início da intratabilidade das crises, indicando que as crises iniciais são fáceis de serem controladas, mas a evolução com refratariedade às DAEs sugere que a ELT é uma doença progressiva (O'DELL et al., 2012) (YANG et al., 2010).

O período latente associado com a epileptogênese está envolvido com mudanças estruturais e bioquímicas no cérebro que levam ao desencadeamento das CERs (O'DELL et al., 2012). Essas mudanças provavelmente se iniciam com o insulto primário e vão se acumulando ao longo do curso da doença e a cada novo insulto. Isso gera um ciclo que se autoperpetua e causa a progressão crônica da ELT (O'DELL et al., 2012; YANG et al., 2010; SHARMA et al., 2007).

Na ELT o hipocampo (Figura 1) é considerado o sítio de surgimento das crises, já que em pacientes e em modelos animais há a prevalência de uma esclerose hipocampal (BABB; BROWN, 1986). De fato, após excisão unilateral dessa região afetada, há diminuição do número de crises (SPENCER, 2002). Apesar disso é conhecido que outras regiões do sistema límbico são afetadas, particularmente o córtex entorrinal e a amígdala (CURIA et al., 2008).

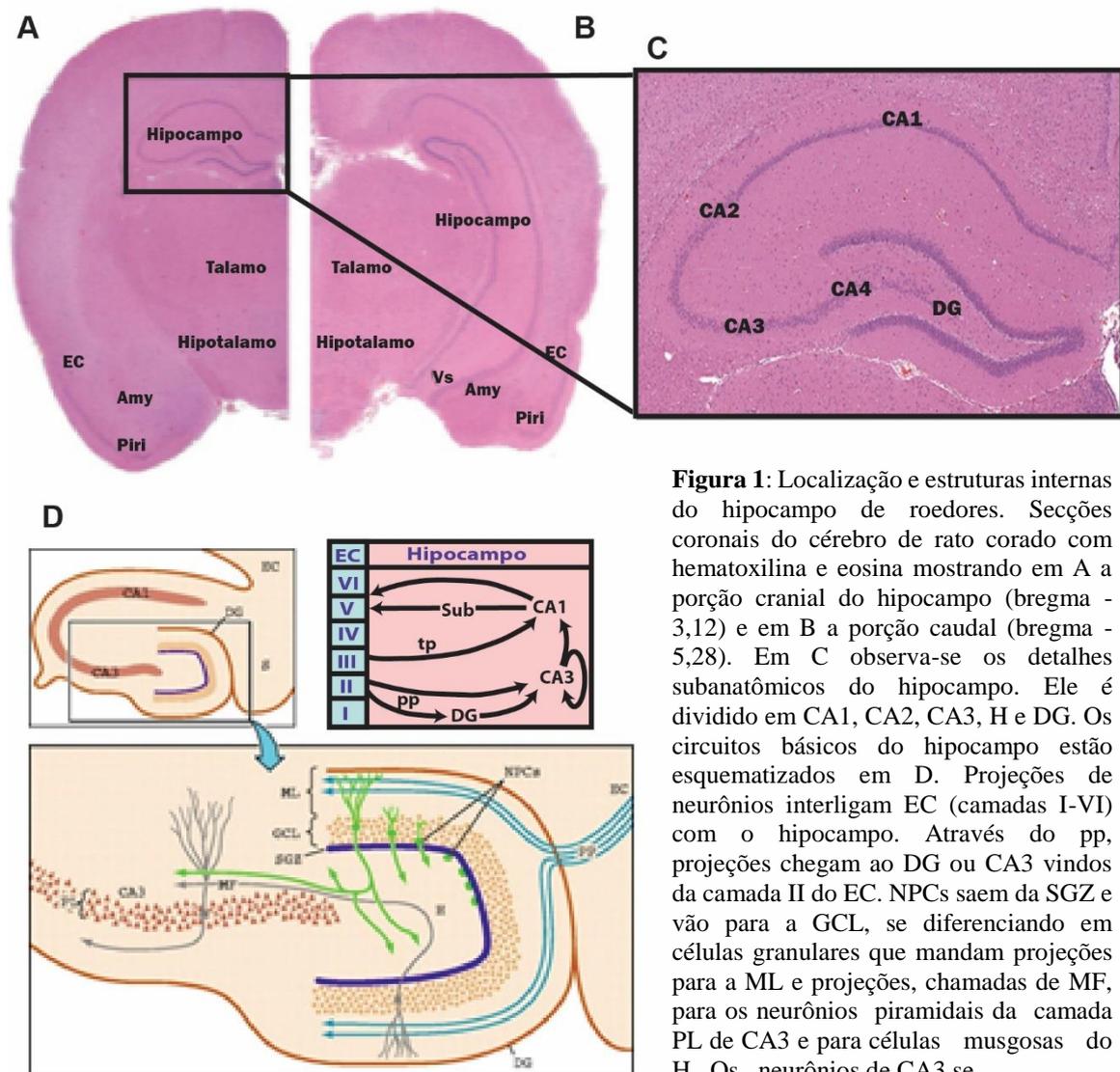


Figura 1: Localização e estruturas internas do hipocampo de roedores. Secções coronais do cérebro de rato corado com hematoxilina e eosina mostrando em A a porção cranial do hipocampo (bregma - 3,12) e em B a porção caudal (bregma - 5,28). Em C observa-se os detalhes subanômicos do hipocampo. Ele é dividido em CA1, CA2, CA3, H e DG. Os circuitos básicos do hipocampo estão esquematizados em D. Projeções de neurônios interligam EC (camadas I-VI) com o hipocampo. Através do pp, projeções chegam ao DG ou CA3 vindos da camada II do EC. NPCs saem da SGZ e vão para a GCL, se diferenciando em células granulares que mandam projeções para a ML e projeções, chamadas de MF, para os neurônios piramidais da camada PL de CA3 e para células musgosas do H. Os neurônios de CA3 se

comunicam com neurônios piramidais de CA1, que por sua vez se comunicam com o Sub e novamente com o EC. Abreviações: EC (córtex entorrinal); Amy (amígdala); Piri (córtex piriforme); S (subículo); DG (giro dentado); pp (via perforante); NPC (célula progenitora neural); GCL (camada celular granular); ML (camada molecular); SGZ (zona subgranular); H (hilo do giro dentado); MF (fibras musgosas); PL (camada piramidal). Adaptado de: (SHARMA et al., 2007) (SCHINDER; GAGE, 2004) (ZHANG, 2012).

A ELT possui três alterações principais. A primeira é uma morte de neurônios principalmente os produtores de ácido gama-aminobutírico (GABA), causando uma desorganização na circuitaria neuronal. Há uma alteração no balanço entre neurônios excitatórios e inibitórios com a formação de uma nova circuitaria hiperexcitatória. A segunda

é a presença de uma plasticidade sináptica aberrante devido a neurônios com crescimento axonal e espículas dendríticas envolvendo fibras musgosas, levando a um circuito excitatório recorrente. A terceira é a presença de uma neuroinflamação caracterizada por uma ativação microglial e astrocitária, aumento de citocinas pró-inflamatórias, quebra da barreira hemato-encefálica (BHE) e formação de gliose (YIN et al., 2011); (O'DELL et al., 2012).

A degeneração neuronal é uma das alterações marcantes da ELT (O'DELL et al., 2012). Neurônios são perdidos preferencialmente nas áreas CA1, CA3 e hilo do giro dentado (CA4) do hipocampo, enquanto nas regiões CA2 e da camada celular granular do giro dentado eles são poupados (MAJORES et al., 2007); (O'DELL et al., 2012). Foi observada, também, a perda neuronal no córtex entorrinal, no córtex piriforme e na amígdala (BEN-ARI e DUDEK, 2010).

O crescimento de fibras musgosas é uma alteração bem documentada na ELT. Ele é caracterizado por axônios glutamatérgicos de células granulares formando sinapses com células da camada granular e molecular interna invés da região CA3. Células granulares dentadas se tornam hiperexcitadas como resultado desse crescimento (SHARMA et al., 2007).

O estudo dos processos inflamatórios e suas relações com patologias do SNC têm apresentado uma grande importância nas pesquisas da última década. Sabe-se que o SNC é uma região imunoprivilegiada devido principalmente à presença da BHE e à baixa quantidade de vasos linfáticos (VEZZANI e GRANATA, 2005). Observações clínicas e evidências experimentais em modelos animais mostram a possibilidade da inflamação no cérebro ser um fator comum que contribui ou predispõe para a ocorrência de crises epiléticas (YANG et al., 2010); (VEZZANI e GRANATA, 2005). De fato, incidentes iniciais precipitantes da ELT como as crises convulsivas febris estão associadas à maior expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias, a exemplo da interleucina IL-1 β (HEIDA e PITTMAN, 2005). Essa citocina, durante a epilepsia, contribui para a geração das crises, principalmente por intensificar a neurotransmissão glutamatérgica, através da inibição da retirada e do aumento da liberação de glutamato por astrócitos e por diminuir GABA no hipocampo (VEZZANI et al., 2008).

Outros mediadores inflamatórios parecem ter também papel no desencadeamento do SE. Foi descrito que a inibição de COX-2 em ratos epiléticos diminui a frequência e gravidade das crises e preservam os neurônios (JUNG et al., 2006). O aumento da expressão das

prostaglandinas D2, E2 e F2 alfa foi observado em diferentes estágios de epileptogênese (VEZZANI e GRANATA, 2005), bem como de NF-kB no hipocampo de pacientes com ELT (CRESPER et al., 2002). Outras citocinas, tais como TNF- α , TGF- β e IL-6, quimiocinas e moléculas de adesão também estão envolvidos na epilepsia (VEZZANI e GRANATA, 2005; YANG et al., 2010). Além disso, a quebra da BHE parece ser um fator importante na fisiopatologia da doença, e ciclos de quebra podem estar relacionados à intermitência das crises (MARCHI et al., 2011). Moléculas capazes de passar para o parênquima cerebral pela BHE alterada, tais como imunoglobulinas, albumina e citocinas, são capazes de ativar as células da glia e aumentar o processo inflamatório local e, quando isso ocorre em um microambiente onde há uma circuitaria hiperexcitatória, pode causar o desencadeamento das crises (FRIEDMAN et al., 2009).

O processo inflamatório persistente leva por fim a alterações importantes, tais como morte neuronal, gliose reativa, quebra da BHE e recrutamento leucocitário periférico (MLODZIKOWSKA-ALBRECHT et al., 2007). A exacerbação das crises e a diminuição do limiar para indução de convulsões induzidas por moléculas inflamatórias (DEDEURWAERDERE et al., 2012) indica que a inflamação crônica e inadequadamente controlada pode ser um fator epileptogênico. Neste contexto, a ELT pode ser considerada uma doença neuroinflamatória crônica e de caráter progressivo.

2.3 MODELO EXPERIMENTAL DE EPILEPSIA

Com a finalidade de compreender melhor os mecanismos moleculares dos vários tipos de epilepsia e testar novas terapias, é necessária a utilização de modelos experimentais que possam de fato mimetizar a doença. Devido ao cérebro ser um órgão de difícil acesso, biópsias só são possíveis após o tratamento cirúrgico e, esses materiais, assim como necropsias, muitas vezes refletem apenas alterações presentes no estágio mais avançado das doenças neurológicas, sendo insuficientes para um total entendimento da fisiopatologia (PITKANEN e SUTULA, 2002). Modelos animais de epilepsia, apesar de não serem capazes de refletir totalmente o que ocorre nos pacientes, possuem uma lesão cerebral com grande capacidade epileptogênica, de modo semelhante ao encontrado nos humanos (RAOL e BROOKS-KAYAL, 2012).

Há diversos modelos distintos de epilepsia e a escolha deles vai depender do tipo de experimento a ser avaliado e o tipo de epilepsia estudada. Além disso, já que para se ter

epilepsia é necessário apresentar CER, muitos modelos são apenas de crises epiléticas (LOSCHER, 2011)

Há dois grandes grupos de modelos experimentais de epilepsia/crises epiléticas: os genéticos e os adquiridos (LOSCHER, 2011). No modelo genético, que compreende animais com predisposições a determinados tipos de epilepsia, as crises aparecem espontaneamente ou após um estímulo sensorial e o modelo é desenvolvido através de mutações pontuais ou silenciamento de genes, desencadeando as mudanças histopatológicas e fisiológicas necessárias para o desenvolvimento desses tipos de epilepsia (SUZUKI, 2004).

No modelo adquirido, animais sadios são submetidos a um agente indutor que pode ser elétrico ou químico (LOSCHER, 2011). Alguns modelos adquiridos geram crises generalizadas agudas, como é o caso da crise por eletrochoque máximo – MES e da aplicação de pentilenetetrazol, e são muito usadas para desenvolvimento de novas drogas anti-epiléticas. A desvantagem é que não geram CER (LOSCHER, 2002, 2011).

Modelos crônicos pós-SE com CER como eletro-choque e aplicação de ácido kaínico ou pilocarpina são feitos na maioria das vezes em ratos e geram epilepsia crônica, mas em compensação geram apenas crises parciais (LOSCHER, 2002, 2011). Eles são os modelos ideais para se estudar a ELT, pois induzem uma série de eventos que, de maneira cronológica, simulam os observados nesse tipo de epilepsia (SHARMA et al., 2007).

2.3.1 Modelo de epilepsia induzido por lítio-pilocarpina

O modelo experimental de epilepsia induzida por cloridrato de pilocarpina foi inicialmente descrito por Turski e colaboradores (TURSKI et al., 1983). A pilocarpina é um alcalóide extraído de plantas jaborandis do gênero *Pilocarpus*, abundantes na região norte e nordeste do Brasil, e é um agonista muscarínico, sendo usada na clínica para tratar glaucomas e xerostomias (ABREU et al., 2007); (SCORZA et al., 2009). Quando injetado sistemicamente em roedores há uma combinação de sinais e sintomas característicos de uma estimulação colinérgica não seletiva (CURIA et al., 2008).

A pilocarpina atravessa a BHE e ativa os receptores colinérgicos muscarínicos do subtipo M1 no cérebro, resultando em crises epiléticas (CURIA et al., 2008). Isso foi demonstrado pelo fato de camundongos deficientes para o receptor M1 não desenvolverem crises ao contato com pilocarpina (HAMILTON et al., 1997). A partir do momento que as crises começam, sua manutenção é realizada por outros mecanismos (CLIFFORD et al.,

1987). Já foi demonstrado que pilocarpina é capaz de aumentar o nível de glutamato no hipocampo (SMOLDERS et al., 1997), além de promover uma ativação do receptor NMDA (SMOLDERS et al., 1997) mostrando o papel da droga na ativação da transmissão excitatória glutamatérgica.

Animais que vivenciam SE por várias horas apresentam alterações histopatológicas no córtex olfatório, amígdala, tálamo, neocórtex e no hipocampo (TURSKI et al., 1983), onde há uma perda neuronal e o crescimento de fibras musgosas, levando a uma reorganização do circuito para um caráter excitatório (LEHMANN et al., 2001). Foram observados também a neurogênese, a proliferação astrocitária, alterações na distribuição de espículas dendríticas nas células granulares do giro dentado e dentritos distorcidos em interneurônios GABAérgicos (SCORZA et al., 2009).

Há variações do modelo de pilocarpina. Esse convulsivante já foi combinado com outras drogas, tais como o lítio (HONCHAR et al., 1983), a picrotoxina (HAMANI e MELLO, 1997), a cycloheximida (LONGO e MELLO, 1997), e o MK-801 (HUGHES et al., 1993). O modelo lítio-pilocarpina é o mais usado, já que o lítio, por potencializar o efeito da pilocarpina no cérebro, permite a diminuição da dose usada de pilocarpina em 10 vezes

(MARCHI et al., 2009), diminuindo assim os efeitos colinérgicos periféricos da droga. Esse modelo pode ser dividido em três fases. A primeira é chamada de fase aguda, acontecendo logo após a aplicação da pilocarpina, onde os animais apresentam sinais e crises que são classificados de I a V pela escala de Racine modificada (RACINE, 1972; HATTIANGADY e SHETTY, 2011). Esta é seguida de um período de SE caracterizado por crises Racine III e IV constantes por mais de 10 minutos (HATTIANGADY e SHETTY, 2011). Nos estágios I e II ocorre salivação, tremedeira e mastigação. No estágio III há crises clônicas unilaterais das patas dianteiras enquanto no estágio IV há crises clônica bilaterais (Figura 2). O estágio V é caracterizado pelo estágio IV acrescido de quedas (HATTIANGADY e SHETTY, 2011). Depois da parada das crises com um anticonvulsivante para melhorar a mortalidade, os animais se recuperam e entram na fase latente onde, apesar de não haver a presença de crises epiléticas, há um processo de epileptogênese acontecendo que leva a modificações estruturais e fisiopatológicas características na região hipocampal. A duração dessa fase varia bastante na literatura, indo de 15 dias a meses pós-SE. Após esse período há o aparecimento de CERS nas quais cada crise dura no máximo 1 minuto e vem acompanhada por alterações comportamentais (como deficiências cognitivas e de memória) e eletroencefalográficas típicas, repetindo-se ao longo de toda a vida do animal e caracterizando a fase crônica característica da ELT (SCORZA et al., 2009; CURIA et al., 2008; MULLER et al., 2009; CAVALHEIRO et al., 1991).

Usar modelos animais, como o de TLE induzida pela pilocarpina, é essencial não só no avanço do conhecimento sobre a fisiopatologia da doença, mas também na avaliação de abordagens terapêuticas cirúrgicas e medicamentosas, assim como de terapia celular.

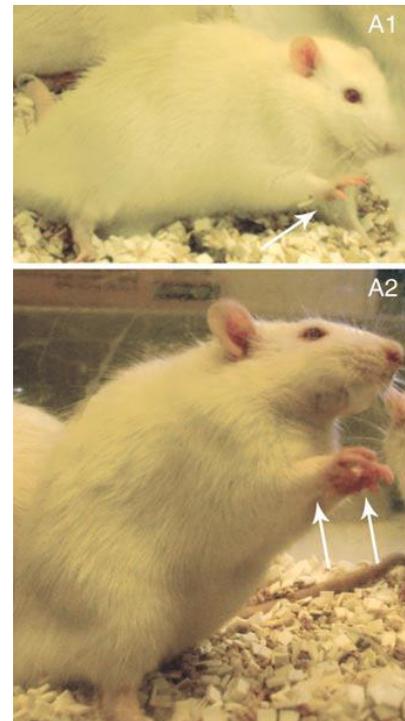


Figura 2: Exemplos de crises epiléticas em ratos. Crise de escala III de Racine (A1), mostrando crise clônica unilateral das patas dianterias, e crise de escala IV de Racine (A2) mostrando crise clônica bilateral (HATTIANGADY; SHETTY, 2011).

2.4 NOVAS TERAPIAS PARA EPILEPSIA

Vários estudos estão sendo realizados, abrindo novas perspectivas de tratamento para epilepsia. Foi visto que estimulação elétrica do hipocampo ou do nervo vago e estimulação magnética transcraniana são capazes de diminuir as crises epiléticas (AL-OTAIBI et al., 2011). Moléculas tais como neuropeptídeos, particularmente galanina (LU et al., 2010) e neuropeptídeo Y, (XAPELLI et al., 2006), GDNF (KANTER-SCHLIFKE et al., 2007), BDNF (BOVOLENTA et al., 2010), FGF-2 (BOVOLENTA et al., 2010) e muscimol (HEISS et al., 2005) possuem efeitos anticonvulsivantes. A dexametasona é protetora contra epilepsia, diminuindo as crises (ARAKI et al., 2006). Há estudos buscando novas DAEs como o caso do levetiracetam (MARGINEANU et al., 2008) e a rapamicina (CHONG et al., 2012). Estudos envolvendo terapia gênica, como por exemplo, o de Raol e colaboradores (2006), no qual a expressão do receptor para GABA no hipocampo foi induzida, resultando em diminuição do aparecimento de CERs (RAOL et al., 2006). Além desses, foram realizados estudos envolvendo terapia celular, os quais serão descritos mais adiante.

O SNC possui uma taxa de regeneração muito baixa, principalmente devido à baixa capacidade intrínseca dos neurônios de começarem um programa de regeneração pós-lesão, baixa de suporte de crescimento como fatores neurotróficos, presença no ambiente de moléculas inibitórias de crescimento axonal, principalmente as derivadas de mielina, e presença de uma cicatriz glial capaz de concentrar esses fatores inibitórios, além de constituir uma barreira física para a regeneração (BRAZDA e MULLER, 2009). Desse modo, estratégias usando a medicina regenerativa, tais como as envolvendo terapias com células-tronco (CT), tornam-se muito úteis em diversas patologias no SNC, incluindo a epilepsia.

2.5 CÉLULAS-TRONCO (CT)

As CT são células que possuem três características principais: são células não especializadas; possuem capacidade de auto-renovação, ou seja, dividem-se se mantendo indiferenciadas por longos períodos; e, diante de estímulos específicos, possuem a capacidade de se diferenciar em células maduras e funcionais de um tecido específico (WATT e HOGAN, 2000; ZAGO, 2006).

Elas são classificadas em três grupos: totipotentes, pluripotentes e multipotentes (WAGERS e WEISSMAN, 2004; ZAGO, 2005). As CT totipotentes são capazes de gerar todos os tecidos do organismo e os tecidos extra-embriônicos, ou seja, podem gerar um organismo por inteiro. É o caso do zigoto. As CT pluripotentes são capazes de gerar qualquer

tecido do organismo, ou seja, podem dar origem aos três folhetos embrionários (endoderma, ectoderma e mesoderma) (WAGERS e WEISSMAN, 2004; ZAGO, 2005). Um exemplo de CT pluripotentes são as CT embrionárias isoladas da massa celular interna de blastocistos (THOMSON et al., 1998). Mais recentemente descreveu-se que as CT pluripotentes podem ser criadas a partir de células somáticas, como é o caso das células pluripotentes induzidas (iPSCs), através da expressão de determinados fatores de transcrição (TAKAHASHI e YAMANAKA, 2006). As CT multipotentes são capazes de originar apenas uma linhagem ou um subconjunto de linhagens celulares. São células mais diferenciadas comparadas com as pluripotentes (WAGERS e WEISSMAN, 2004). Elas podem ser fetais, quando isoladas do feto propriamente dito; de tecidos extraembrionários de origem fetal, tais como a placenta, o líquido amniótico e o cordão umbilical (PAPPA e ANAGNOU, 2009); ou adultas, que são encontradas em todos os tecidos do organismo e durante toda a vida do mesmo (CAPLAN, 2007).

As CT adultas são responsáveis pela reposição das células especializadas mortas pelo processo de envelhecimento ou dano tecidual (CAPLAN, 2007). A gênese de novas células nos tecidos começa nas CT multipotentes adultas e segue uma hierarquia cuja célula final é a especializada e funcional. Exemplos de CT adultas são as CT hematopoiéticas que dão origem a todas as células do sangue, e as CT mesenquimais, existentes em todos os tecidos do mesenquima (como o conjuntivo) e que dão origem principalmente a fibroblastos, osteócitos, condrócitos e adipócitos (KRAUSE, 2002; JACKSON et al., 1999).

Com o avanço de técnicas de biologia molecular, transfecção, transdução e técnicas de cultivo celular, cresceram as pesquisas envolvendo as CT. Atualmente essas células são usadas em pesquisas básicas de embriogênese e diferenciação celular (PRICE et al., 2012), como modelo de doenças in vitro (para teste de drogas, por exemplo) (NGUYEN et al., 2011), em estudos de ação de drogas em tecidos-alvo (ZHAO et al., 2012), de bioengenharia (TAKEBE et al., 2013) e de terapia celular (ROPER e STEINDLER, 2013).

2.5.1 Células-tronco neurais (NSC)

As células-tronco neurais (NSC, do inglês *neural stem cell*) são um tipo específico de CT multipotentes encontradas no SNC (GAGE, 2000). Estas células possuem três características: capacidade de auto-replicação, de se diferenciar em três dos principais tipos celulares do SNC: neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (Figura 3) e, por fim, de regenerar o tecido neural (OLIVER-DE LA CRUZ, 2012). Além disso, as NSC possui a característica de produzir estruturas tri-dimensionais em cultura celular, chamada neuroesferas (REYNOLDS e WEISS, 1992). Quando estão comprometidas com uma linhagem específica e possuem proliferação limitada, são chamadas de progenitora (no caso dos neurais não são capazes de formar neuroesferas em cultura) (ROPER e STEINDLER, 2013; OLIVER-DE LA CRUZ, 2012).

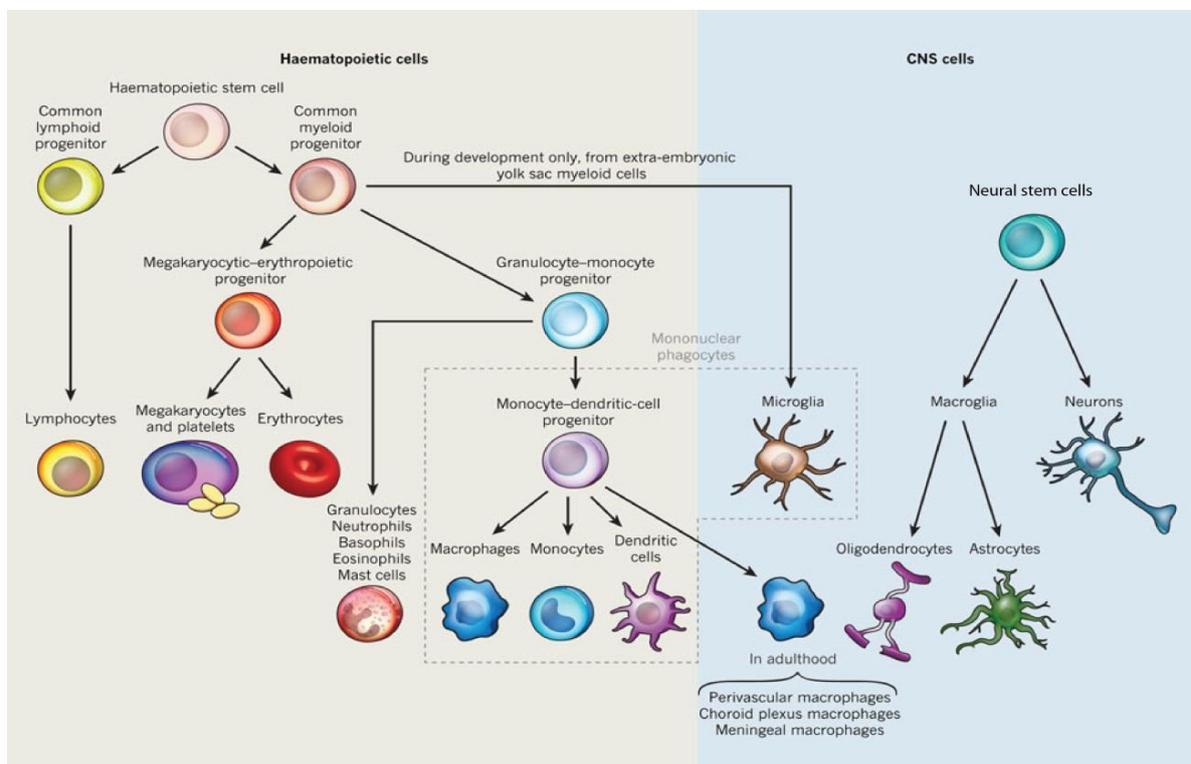


Figura 3: Células hematopoéticas e neuroglia. Das células residentes no SNC, apenas os macrófagos e micróglia, que são células fagocíticas derivadas de células-tronco hematopoéticas providas do mesoderma, não são derivadas de NSC que possuem origem do ectoderma. As NSC são capazes de dar origem a neurônios, oligodendrócitos, astrócitos (RANSOHOFF; CARDONA, 2010).

A ocorrência de neurogênese no cérebro de mamíferos adultos está bem estabelecida (GIL-PEROTIN et al., 2009). Ela se dá a partir das NSC e progenitores neurais, e isso geralmente acontece em duas áreas: na zona subventricular dos ventrículos laterais (SVZ, do inglês *sub-ventricular zone*), onde as NSC geram interneurônios GABAérgicos no bulbo olfatório, e na zona sub-granular do giro dentado no hipocampo (SGZ, do inglês *sub-granular zone*), onde elas geram neurônios excitatórios glutamatérgicos granulares (Figura 4) (ROPER e STEINDLER, 2013). Progenitores gliais, por sua vez, são encontrados por todo o cérebro em quiescência, podendo proliferar e gerar glia madura em condições como traumas cerebrais (OLIVER-DE LA CRUZ, 2012).

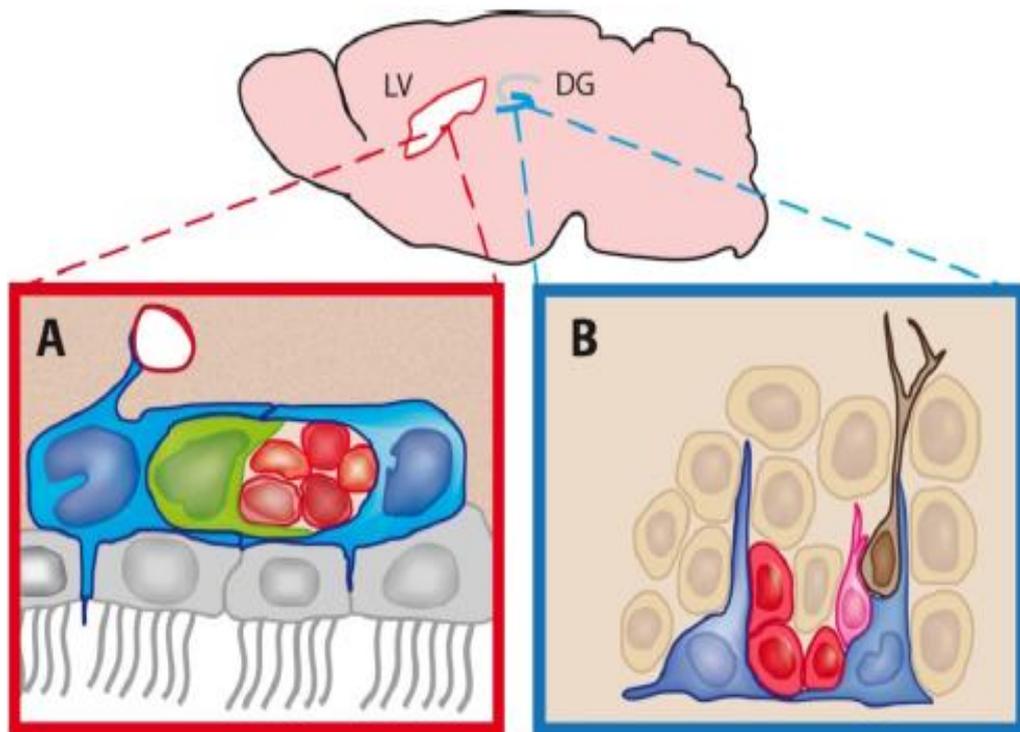


Figura 4: Localização dos nichos de neurogênese do cérebro. Esquema de corte sagital de cérebro de roedor adulto, mostrando que a zona sub-ventricular (A) dos ventrículos laterais (LV) contém células-tronco com aparência astrocitária chamadas de tipo B1 (azul) que ficam em contato com células endoteliais (cinza). As tipo B1 geram células que se dividem rapidamente, chamadas de tipo C (verde), que vão dar origem a neuroblastos imaturos ou células tipo A (vermelho) que migram para o bulbo olfatório e se diferenciam em neurônios granulares. Na zona subgranular (B) do giro dentado (DG), as células-tronco com aparência astrocitária (azul) se diferenciam em neuroblastos (vermelho), que se vão se diferenciando, ao mesmo tempo em que migram (rosa), até se tornarem neurônios especializados (marrom) (OLIVER-DE LA CRUZ, 2012).

As NSC podem ser obtidas de CT pluripotentes (CT embrionárias ou iPSC) ou de tecido fetal e adulto (ROPER e STEINDLER, 2013). Há protocolos de diferenciação de

progenitores de neurônios e até mesmo neurônios maduros a partir de CT pluripotentes (BRUSTLE et al., 1997) (SWISTOWSKI et al., 2010). As NSC e os progenitores neurais fetais podem ser obtidos de fetos humanos provindos de aborto, sendo essa uma fonte onde se consegue isolar maior quantidade de NSC comparado com o cérebro adulto (LO e PARHAM, 2009; TAGA; FUKUDA, 2005). Tais células já foram usadas em alguns estudos clínicos em traumas raquimedulares (WIRTH et al., 2001) e acidente vascular cerebral (AVC) (STEM CELL THERAPIES AS AN EMERGING PARADIGM IN STROKE, 2009).

Apesar das dificuldades em se isolar NSC de cérebros de pacientes, Walton e colaboradores (2006) conseguiram isolar progenitores neurais/astrocíticos de tecido cerebral de pacientes epiléticos refratários obtidos após lobotomia terapêutica. As células se expandiram in vitro, apesar de não formarem neuroesferas, e, ao serem transplantadas em modelos animais, diferenciaram-se em astrócitos e neurônios (WALTON et al., 2006). Harris e colaboradores (2012) publicaram um artigo onde descreveram sobre a derivação de progenitores neurais a partir de CT mesenquimais de pacientes com esclerose múltipla, sendo esta uma fonte mais acessível de CT para transplante celular. As células apresentaram expressão gênica compatível com a linhagem neural, além de uma potente ação imunomodulatória, indicando o seu valor terapêutico (HARRIS et al., 2012).

2.6 TERAPIA CELULAR EM EPILEPSIA

A terapia celular é uma ferramenta da medicina regenerativa que envolve o conjunto de métodos e abordagens tecnológicas com a utilização de células no tratamento de diversas doenças, incluindo as neurodegenerativas (ZAGO, 2005). De fato, as características de auto-renovação e diferenciação celular colocam as CT como boas candidatas para o tratamento de doenças onde há a presença de morte celular, tais como no caso de doenças onde há degeneração neuronal (SHETTY e HATTIANGADY, 2007). Além disso, já está bem descrito que a ação terapêutica das células transplantadas não se resume à migração, sobrevivência e diferenciação das células no local lesionado. Efeitos parácrinos imunomodulatórios e/ou neurotróficos foram descritos em CT mesenquimais e NSC após o transplante (BEN-HUR, 2008; UCCELLI et al., 2008).

Ao se trabalhar com terapia celular, deve-se que observar alguns parâmetros que influenciam diretamente o efeito terapêutico, tais como o tipo celular usado, o momento de

aplicação das células, o número de doses, a via de administração, a quantidade de células injetadas, o estágio da doença e a qualidade da célula (condições de cultura e momento da retirada das células da cultura). Outros parâmetros, tais como a observação de efeitos em longo prazo, a utilização de métodos para super ou supra-expressar moléculas nas células, a utilização de terapia combinada e de métodos que aumentem a sobrevivência das células transplantadas *in vivo* também devem ser analisados (BEN-DOR et al., 2006; BARMINKO et al., 2011; MILTIADOUS et al., 2013; LEE et al., 2013; KAWASAKI-OYAMA, 2004). Devido ao caráter degenerativo e inflamatório das epilepsias, a terapia celular está sendo estudada nessa doença, com estudos prévios mostrando efeito benéfico dessa terapia em modelos animais de epilepsia (SHETTY e HATTIANGADY, 2007; SHETTY, 2012; ROPER e STEINDLER, 2013; SORENSEN e KOKAIA, 2013).

Em um estudo anterior do nosso grupo, em 2010, células mononucleares de medula óssea foram transplantadas pela via venosa em um modelo agudo de epilepsia induzido por pilocarpina em ratos. Apesar de terem sido encontradas apenas poucas células transplantadas no hipocampo dos animais, 15 dias após o transplante o grupo transplantado não apresentou CER, diferentemente do grupo que recebeu salina. As células também foram capazes de proteger contra a perda neuronal e preservar a potenciação de longa duração (LTP) de sinapses em CA1 (COSTA-FERRO et al., 2010).

Em 2012, um novo estudo foi publicado por nosso grupo, dessa vez usando um modelo crônico de epilepsia. As células mononucleares de medula óssea foram transplantadas 10 meses após a indução da epilepsia, causando a diminuição da frequência e duração das CER e dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) e o aumento do nível de IL-10 *in situ* e no soro (COSTA-FERRO et al., 2012).

Outro relato dos efeitos do transplante de CT mesenquimais por via endovenosa em um modelo crônico de epilepsia em ratos demonstrou uma diminuição do número de crises e um aumento da densidade neuronal nos animais tratados (ABDANIPOUR et al., 2011). Outro estudo observou, em um modelo de epilepsia utilizando estimulação elétrica focal do cérebro, os efeitos do transplante intracerebral de CT mesenquimais um mês após a indução. As células foram encontradas no cérebro três meses após o transplante, e houve melhora no EEG e na expressão de receptores de adenosina (HUICONG et al., 2013).

Atualmente está sendo conduzido o primeiro estudo clínico envolvendo terapia celular e epilepsia. Este é um estudo de fase I no qual está sendo testado o efeito do

transplante de células mononucleares de medula óssea em pacientes com ELT refratária (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00916266>).

2.6.1 Transplante de NSC em epilepsia

O fato das NSC serem capazes de se diferenciar em neurônios *in vitro* e *in vivo*, de migrar e sobreviver no SNC e de produzir diversos fatores imunomodulatórios e neurotróficos (SHETTY, 2012), fazem delas boas candidatas à terapia celular para doenças do SNC. Estudos anteriores se basearam na ELT usando modelos de SE e mostraram que NSC adultas e fetais, são capazes de se integrar no hipocampo alterado e se diferenciar em neurônios e astrócitos (SHETTY, 2012; SORENSEN e KOKAIA, 2013).

Chu e colaboradores (2004) examinaram a eficácia da administração intravenosa de NSC fetais humanas no CER em modelo de pilocarpina em ratos. O transplante de NSC foi realizado um dia após a indução e por volta de um mês após o SE, 87% dos animais não transplantados desenvolveram CERs, enquanto apenas 13% dos animais transplantados apresentaram CERs. Além disso, a gravidade das crises foi diminuída no grupo transplantado. A análise histológica mostrou a presença de células transplantadas seis semanas após o transplante, e por volta de 30% das células transplantadas apresentaram marcadores de interneurônios (GABA e parvalbumina). Apesar disso apenas poucas foram capazes de se diferenciar em neurônios maduros (1-2,5%). Ratos não induzidos que receberam NSC não apresentaram células transplantadas no hipocampo, mostrando que o SE é capaz de promover o recrutamento e a migração dessas células para o hipocampo (CHU et al., 2004).

Waldau e colaboradores (2010) analisaram o efeito do transplante de NSC fetais de rato no hipocampo de ratos exibindo ELT crônica (mais de 12 meses após a indução). Três meses após o transplante, os animais que receberam NSC apresentaram diminuição da frequência e duração das CERs. Análise histológica mostrou que nesse período 28% das células transplantadas se integraram e que isso resultou em aumento do número de astrócitos produtores da proteína anticonvulsivante GDNF e de neurônios GABAérgicos. Apesar disso o transplante não melhorou a deficiência de memória e aprendizado espacial analisado dois meses após o transplante (WALDAU et al., 2010).

Dois artigos publicados recentemente (HUNT et al., 2013; MILTIADOUS et al., 2013) mostraram efeitos benéficos do transplante de NSC ou progenitores neurais na função

cognitiva. Hunt e colaboradores (2013) transplantaram progenitores GABAérgicos no hipocampo de camundongos com epilepsia crônica induzidos por pilocarpina. Foram observadas redução da ocorrência de CERs, restauração das alterações de comportamento em aprendizado espacial, hiperatividade e agressividade de resposta ao manuseio. Os progenitores transplantados foram capazes de migrar do local de injeção e apresentou expressão gênica e protéica de inter-neurônios. Essas células diferenciadas foram capazes de receber sinapses excitatórias, demonstrando a sua funcionalidade. Miltiadous e colaboradores (2013) transplantaram NSC adultas, derivada da SVZ, no hipocampo de camundongos quatro dias após a indução do SE. O transplante preveniu o declínio cognitivo, protegeu contra a neurodegeneração, reduziu astrogliose e manteve a proliferação de células granulares endógenas a níveis normais.

2.6.2 Mecanismos de ação das NSC transplantadas

Para que haja uma recuperação funcional em distúrbios cerebrais, a substituição celular e a reconstituição, ao menos parcial, da circuitaria neuronal, deve ser o objetivo a longo-termo (KOKAIA et al., 2012). Porém, a sobrevivência, a integração e a funcionalidade correta das células transplantadas ainda são um desafio. De fato, poucos estudos demonstraram que as células transplantadas são capazes de gerar conexões de longa e curta distância funcionais (YOHN et al., 2008) (HUNT et al., 2013). No SNC há vários subtipos de neurônios, tais como os motores, dopaminérgicos e os interneurônios, e cada um se encontra em regiões específicas e determinadas. Assim, além de se diferenciar em neurônio e sobreviver, as NSC transplantadas precisam migrar para sítios específicos, se diferenciar em subtipos determinados e serem funcionais, fazendo conexões sinápticas corretas (HARTMAN et al., 2010; NAEGELE, 2010). Estudos realçaram esse ponto mostrando que NSC endógenas frente à crises epiléticas são capazes de formar neurônios ectópicos que podem contribuir para a hiperexcitabilidade (revisado por (NAEGELE, 2010)). Além disso, é sabido que as NSC podem se diferenciar em astrócitos, que são células com papel no aumento da excitabilidade neuronal, além de contribuírem para a formação de uma cicatriz glial (O'DELL et al., 2012). Apesar disso, Waldau e colaboradores (2010) demonstraram que astrócitos derivados de NSC são, em sua maioria, produtores de GDNF, um peptídeo com ação anticonvulsivante (WALDAU et al., 2010).

Recentemente, estudos têm relacionado as NSC à uma ação neurotrófica e imunomodulatória, em adição ao efeito de integração tecidual (figura 5) (DE FEO et al., 2012; BEN-HUR, 2008). Em um modelo experimental de neuroinflamação, como a da esclerose múltipla, o transplante de NSC sistêmico promoveu a apoptose de linfócitos T reativos através da expressão de ligantes, tais como o FasL, ou pela produção de mediadores solúveis envolvidos com a apoptose mediada por mitocôndria, tais como óxido nítrico, IFN-gama, GDNF e LIF (PLUCHINO et al., 2005). Lee e colaboradores (2008) transplantaram NSC fetais humanas por via intravenosa ou intracerebral em um modelo de AVC em ratos, e observaram que somente as células injetadas por via intravenosa tiveram efeitos benéficos, tais como a diminuição da infiltração leucocitária, do edema cerebral e dos níveis de fatores inflamatórios TNF- α , IL-6 e NF- κ B (LEE et al., 2008). Cusimano e colaboradores (2012) observaram que o transplante focal de NSC em modelo de trauma raquimedular diminuiu o infiltrado inflamatório, principalmente por diminuir a proporção de macrófagos pró-inflamatórios (M1) ativados (CUSIMANO et al., 2012).

Além disso, já está descrito na literatura que a prevenção de morte neuronal e de formação de cicatriz glial promovidas pelas NSC transplantadas é devida à secreção por essas células de NGF, BDNF, CNTF e GDNF (DE FEO et al., 2012). Em um modelo de demielinização induzida por cuprizona em camundongos, essas células também foram capazes de aumentar a remielinização através da secreção de PDGF-AA e FGF-2 (EINSTEIN et al., 2009) e em modelo de AVC isquêmico, NSC foram capazes de promover plasticidade axonal e dendrítica através da secreção de VEGF, slit e trombospondina 1 e 2 (ANDRES et al., 2011).

De fato, De Feo e colaboradores (2012) indicam que, em distúrbios neurodegenerativos primários caracterizados por reação inflamação, como é o caso da epilepsia, o transplante de NSC se torna uma terapia ideal, mais pela ação imunomodulatória e neurotrófica dessas células do que pela integração e diferenciação das mesmas (DE FEO et al., 2012).

Apesar do potencial de migração e integração das NSC e seus efeitos benéficos sobre as crises epilépticas e memória após o transplante dessas células já estarem bem definidos em estudos anteriores em modelos de epilepsia, não há uma relação clara do papel das NSC na neuroinflamação existente em modelos animais de ELT. O trabalho atual visa esclarecer alguns pontos sobre essa relação.

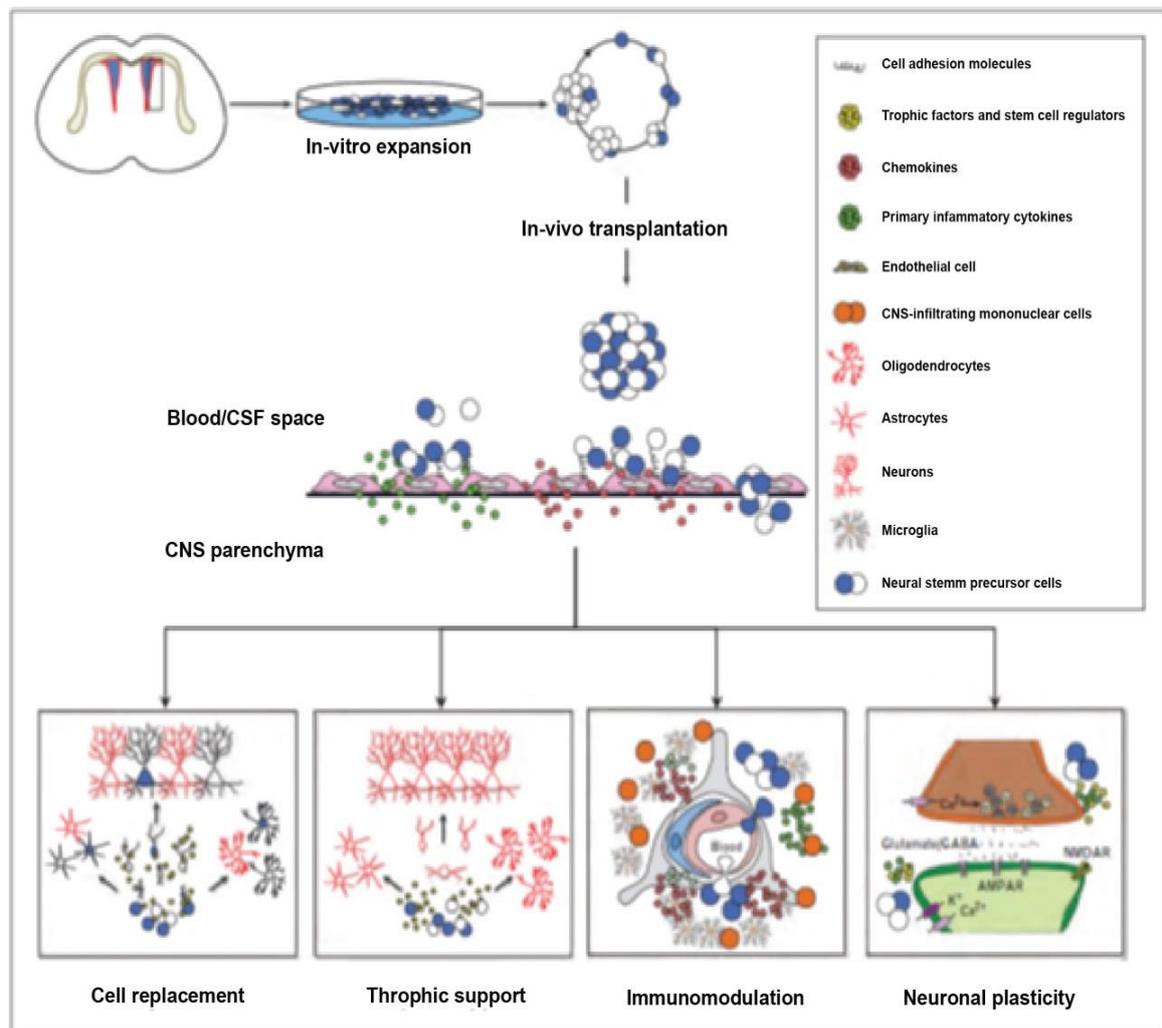


Figura 5: Efeitos das NSC após o transplante em desordens neurológicas experimentais. As NSC são expandidas in vitro e, após serem transplantadas, passam para o parênquima cerebral atraídas por uma região inflamatória. Essas células promovem neuroproteção, não só por se integrarem e se diferenciar em células especializadas no tecido, mas também pela liberação de fatores tróficos e imunomodulatórios que levam a uma plasticidade celular e molecular (De Feo et al., 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar células-tronco neurais adultas e avaliar seu potencial terapêutico quando administradas na fase aguda do modelo de ELT induzida por lítio-pilocarpina em ratos *Wistar*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar e caracterizar o fenótipo das NSC adultas;
- Avaliar a capacidade de diferenciação das NSC em tipos celulares encontrados no SNC;
- Avaliar a estabilidade genética e potencial tumorigênico das NSC;
- Avaliar o potencial imunomodulador das NSC *in vitro*;
- Avaliar a presença das NSC transplantadas em diversos tecidos;
- Quantificar a perda neuronal em animais com SE tratados ou não com NSC;
- Determinar as concentrações de citocinas pró- e anti-inflamatórias *in situ* e no soro de animais com SE tratados ou não com NSC;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Neste estudo avaliou-se o efeito das NSC quando transplantadas logo após a indução do SE em ratos Wistar feito através do modelo Lítio-pilocarpina. No total 32 animais induzidos entraram no estudo (grupo pilocarpina), e para meios de comparação foram utilizados 9 animais não submetidos ao SE (grupo normal). Os animais do grupo pilocarpina, logo após receberem diazepam para bloquear o SE, foram divididos em dois subgrupos: SE-NSC e SE-salina. Os animais do primeiro grupo foram transplantados com células-tronco neurais e eutanasiados 24 horas (n=9) e 12 dias (n=9) após o transplante; Já no segundo grupo, em vez do transplante celular, os animais receberam solução salina, e também foram eutanasiados 24 horas (n=8) e 12 dias (n=6) após a injeção de salina. Foi realizada a eutanásia dos animais para avaliar: migração celular por imunofluorescência, quantificação da perda neuronal por coloração de Nissl e avaliação da presença de fatores pró- e anti-inflamatórios no cérebro e no soro por ELISA.

As NSC foram fenotipicamente caracterizadas antes do transplante, e tiveram o cariótipo analisado. Experimentos de diferenciação, de *side population*, de linfoproliferação e de formação de tumor foram realizados. O desenho experimental está esquematizado na Figura 6.

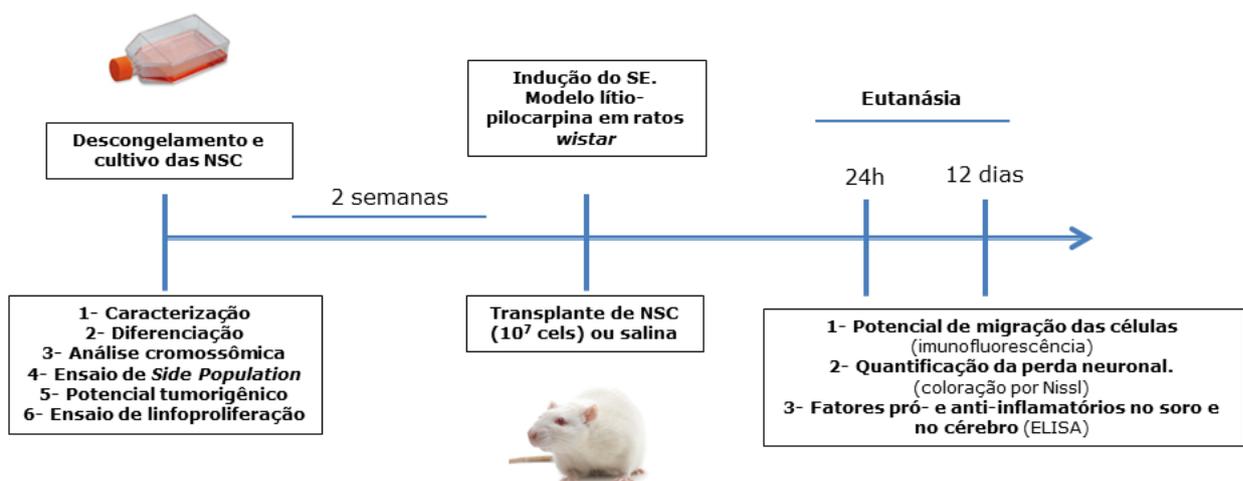


Figura 6: Desenho experimental mostrando as etapas do trabalho.

4.2 ANIMAIS

Para a realização dos estudos, utilizaram-se 67 ratos adultos, da linhagem Wistar com 45-70 dias de idade, pesando entre 230-300 gramas, provenientes do Biotério do Centro de Biotecnologia e Terapia Celular do Hospital São Rafael. Os animais foram mantidos em micro-isoladores com ventilação individual das gaiolas, recebendo água e ração à vontade, sob o fotoperíodo de 12 horas luz/ 12 horas escuro, à 21°C±1° e 55-65% de umidade relativa do ar.

O máximo de precaução foi deliberado com o intuito de minimizar o sofrimento dos animais e de reduzir o número de animais utilizados. Todos os experimentos estiveram de acordo com as normas dos “Principles of laboratory animal care” (NIH publication N° 85-23, revisado 1996). Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Hospital São Rafael.

4.3 INDUÇÃO DA EPILEPSIA PELO MODELO LÍTIO-PILOCARPINA

Os animais do grupo pilocarpina receberam cloreto de lítio (Merck Millipore, Billerica, MA, EUA), injetada intraperitonealmente (i.p), na dose de 127 mg/kg, 20-22 horas antes da administração da pilocarpina e receberam uma dose de 1mg/kg de butil-escopolamina (Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Rhineland-Palatinate, Alemanha) injetada i.p, 30 minutos antes da administração da pilocarpina. Esta última é um antagonista não seletivo do receptor muscarínico e é capaz de passar pela BHE e induzir o processo epileptogênico. O pré-tratamento com butil-escopolamina foi aplicado com o objetivo de atenuar as manifestações periféricas da pilocarpina. O grupo epiléptico recebeu 60mg/kg de cloridrato de pilocarpina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) via i.p, adaptado de protocolo publicado (CLIFFORD et al., 1987) e o início do SE foi considerado quando os animais atingiram grau IV ou V da escala de Racine modificada (RACINE, 1972; HATTIANGADY e SHETTY, 2011), seguida de crises clônicas sustentadas por mais de dez minutos. Aproximadamente 120 minutos após a instalação do SE, foi injetado 10mg/kg de diazepam (Cristália, Itapira, SP, Brasil) i.p. para interromper as crises. Os animais depois, receberam injeções de 5ml de salina subcutâneo para controlar a desidratação provocada pela indução do SE. O protocolo de indução está esquematizado na Figura 7.

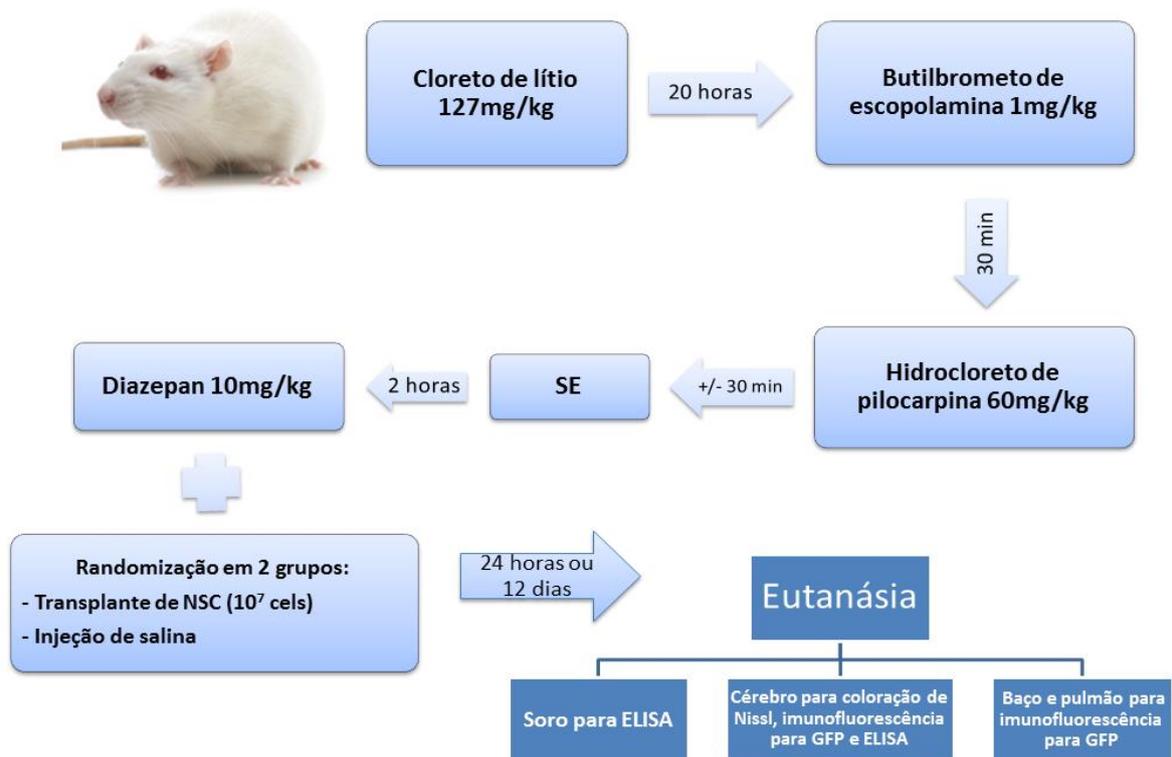


Figura 7: Esquema de indução do SE e eutanásia dos animais.

4.4 CULTIVO E TRANSPLANTE DAS NSC

Foram utilizadas NSC obtidas da SVZ do cérebro de camundongos C57BL/6 adultos e transfectadas para expressar a proteína verde fluorescente (GFP). Os procedimentos de isolamento e transfecção, cuja metodologia está descrita em artigo previamente publicado (CUSIMANO et al., 2012), foram realizados previamente na Unidade de Neuroimunologia do Instituto de Pesquisas *San Raffaele* em Milão, Itália. As células foram gentilmente cedidas pelo Dr. Gianvito Martino.

Uma amostra de NSC que estava acondicionada em criotubos a -196° C em nitrogênio líquido foi descongelada, as células foram processadas e mantidas em garrafas de cultivo celular estéreis de 75 cm^2 contendo meio basal para NSC de camundongo NeuroCult™ (Stem Cell Technologies, Vancouver, British Columbia, Canadá) suplementado com suplemento de proliferação de NSC NeuroCult™ (Stem Cell Technologies) e adição de FGF (10 ng/ml) e EGF (20 ng/ml) recombinantes (GIBCO, BRL, New York, EUA), heparina (2 $\mu\text{g/ml}$) (Stem Cell Technologies) e antibióticos penicilina e estreptomicina (GIBCO), e incubadas em estufas com 5% CO_2 a 37°C . As neuroesferas em

cultivo após atingirem um tamanho específico e apresentarem coloração amarelada foram retiradas da garrafa e lavadas em salina 0,9% seguida de centrifugação a 100 g por 5 minutos. O pellet celular foi ressuspendido em 1 ml de acutase (GIBCO) e incubado por 10 minutos a 37°C com pipetagem periódica para que as ligações entre as células fossem desfeitas. Após a dissociação, as células em suspensão foram centrifugadas a 150 g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspense em 1 ml de neurocult completo. A contagem do número de células foi realizada em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi observada adicionando-se Azul de Tripán. As células foram utilizadas para a expansão de novas subculturas (passagens), criopreservação de alíquotas reservas, em ensaios de diferenciação, de imunofenotipagem, de cariotipagem, de linfoproliferação e de *side population*, para observar o potencial tumorigênico e para transplante no modelo experimental.

O processo de isolamento, evolução da cultura, e a caracterização morfológica das células foram monitorados utilizando um microscópio invertido CKX41 (Olympus, Shinjuku, Tokyo, Japão) e o *software* ImagePro Plus 7.0 (Media Cybernetics, San Diego, CA, EUA).

As NSC foram transplantadas, por via intravenosa, através da veia da cauda, em uma suspensão contendo 10^7 células em 500 μ L de solução salina/ animal.

4.5 ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO DAS NSC

Para diferenciação das NSC em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos, essas células foram cultivadas em placa de 24 poços com lamínula de vidro redonda, depois de pré-tratamento dos poços com gelatina 0,1% (Stem Cell Technologies) por 30 minutos em estufa a 37°C. As NSC foram retiradas da garrafa e dissociadas com acutase (GIBCO), de acordo com a metodologia descrita acima e ressuspendidas em meio de diferenciação Neurocult composto por meio basal para NSC de camundongo NeuroCult™ (Stem Cell Technologies) suplementado com suplemento de diferenciação de NSC NeuroCult™ (Stem Cell Technologies) e adição de antibióticos penicilina e estreptomicina (GIBCO), e por fim contadas em câmara de Neubauer usando azul de tripan para obtenção da viabilidade celular. 1×10^5 cels foram colocadas em cada poço contendo 1 ml do meio de diferenciação. As células foram cultivadas por 7 dias, sempre trocando metade do meio quando este ficava acidófilo, ou seja, com coloração amarelada. Para a caracterização das NSC indiferenciadas,

parte das células sofreu o mesmo protocolo, porém elas foram cultivadas em meio de proliferação.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES CELULARES OBTIDAS

4.6.1 Ensaio de *side population*

As NSC foram retiradas da cultura e dissociadas como descrito anteriormente. 2×10^6 cels foram adicionadas a 2 ml de meio neurocult completo sem EGF e FGF. Hoechst 33342 (Sigma) foi adicionado numa concentração de 5µg/ml e as células foram incubadas a 37°C sob constante agitação por 90 minutos. Após centrifugação (150 g, 5 minutos) as células foram ressuspensas em 200 µl de salina 0,9% e marcadas com anticorpo primário CD44 conjugado com APC (1/50 BD, Franklin Lakes, NJ, EUA, cat: 559250) por 30 minutos. Após nova centrifugação (150 g, 5 minutos) as células foram ressuspensas em 400 µl de salina 0,9% e tratadas com 40 µl de iodeto de propídeo 50 ng/ml (BD cat:51-66211E) por 3 minutos para poder excluir células mortas, já que somente essas células incorporam esse corante. Em seguida, as células foram passadas no citômetro de fluxo LRSFortessa (BD). Durante a análise somente as células positivas para CD44 e negativas para iodeto de propídeo foram consideradas.

Como controle positivo foi usado células de medula óssea de camundongos C57BL/6 transgênicos para GFP. Elas foram isoladas do fêmur e tíbia dos animais, lavadas e as hemácias lisadas usando o tampão de lise (144 mM de cloreto de amônio, 10 mM de bicarbonato de sódio, 1 mM de EDTA, pH7,4). Em vez de neurocult, foi adicionado meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) com 2% de soro fetal bovino nas células, e no final, elas foram marcadas com CD45 conjugado com APC (1/20 BD cat: 559864).

4.6.2 Avaliação citogenética

Para a avaliação citogenética, as NSC cultivadas foram expostas a 1 µg/ml de colchicina (CULTILAB; Campinas, SP, Brasil) para interrupção do ciclo celular durante a metáfase por um período de 2 horas. Após esse tempo as células foram tratadas com acutase (GIBCO) para dissociação das colônias e remoção das mesmas da superfície plástica. Todo conteúdo foi acondicionado em um tubo cônico e centrifugado por 2000 rpm por 6 minutos.

O sobrenadante foi descartado e as células submetidas a tratamento hipotônico com solução de KCL 0,075 M e colocadas em banho-maria a 37°C por 20 minutos. A fixação para exposição das células foi realizada em solução 3:1 de Carnoy (metanol/ácido acético). As lâminas preparadas foram coradas com solução de giemsa/PBS.

As metáfases foram analisadas em microscópio BX61 (Olympus) e as imagens foram capturadas através de sistema de imagem *applied imaging* acoplado a este microscópio.

4.6.3 Ensaio de formação de tumor

As NSC foram retiradas da cultura e dissociadas como descrito anteriormente, e 10^5 células foram injetadas no testículo de camundongos SCID (n=2). Para isso, utilizando-se de material cirúrgico adequado, foi realizada uma pequena incisão na parede abdominopélvica de aproximadamente 1,5 cm. Os testículos foram então retirados da cavidade, e as células injetadas no espaço intertubular, próximas à cabeça do epidídimo. Os animais foram eutanasiados 1 mês depois e os testículos foram retirados e fixados em formol 10% seguido por processamento usando parafina, conforme descrito na sessão abaixo. Cortes de 3 µm foram realizados e corados com H&E e, em seguida, digitalizados usando o Aperio ScanScope system (Aperio Technologies, Vista, CA, USA). Como controle negativo, foram usados 2 animais injetados com salina e como controle positivo foram usados 2 animais injetados com iPSC de camundongo, já que esse é um tipo celular já testado no nosso laboratório como formador de tumor (teratoma). Estas células foram gentilmente cedidas pelo Dr. Gianvito Martino da Unidade de Neuroimunologia do Instituto de Pesquisas *San Raffaele* em Milão, Itália.

4.6.4 Imunofluorescência

As NSC foram cultivadas em placa de 24 poços com lamínula por 7 dias. Após esse tempo, os meios de cultura Neurocult de diferenciação ou proliferação foram retirados do poço e foram realizadas três lavagens com PBS durante 3 minutos. Após a remoção do PBS, as células foram fixadas com PFA 4% durante 30 minutos. Em seguida foi feita uma lavagem dos poços por três vezes com PBS durante 3 minutos. Em seguida, foi realizado o bloqueio com *Background blocking Solution* (Diagnostic Biosystems, Pleasanton, CA, EUA) durante 30 minutos e incubadas overnight com os anticorpos primários. Foram utilizados os

seguintes anticorpos, nas respectivas diluições: anti- β III-tubulina (1:400, Promega, Madison, WI, EUA, cat:G712A), anti-GFAP (1:200, Zymed Carlsbad, CA, USA cat:18-0063), anti-GAD67 (1:250, Merck Millipore cat:MAB5406), anti-doublecortina (1:800, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA, cat:sc-8066), anti-nestina (1:50, chemicon, Temecula, CA, EUA cat:MAB 353), anti-CD44 (1:50, BD cat:550538) e anti-vimentina (1:200, Santa-Cruz cat:sc-7557).

No dia seguinte, foram realizadas duas lavagens com PBS/Tween 0,05% durante 3 minutos, seguida de duas lavagens de PBS por mais 3 minutos. Subseqüentemente foi realizada a incubação com os anticorpos secundários específicos diluídos a 1:200 em solução de PBS/BSA 1%: anti-IgG de camundongo conjugado a Texas Red (MOLECULAR PROBES, Eugene, OR, EUA, cat:T862), anti-IgG de coelho conjugado a Alexa Fluor 568 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA cat:A10042), Anti-cabra conjugado a Alexa Fluor 594 (Invitrogen cat:A21458) ou anti-IgG de rato conjugado a Alexa Fluor 594 (Invitrogen cat:A21209). Os poços foram incubados com a solução contendo anticorpos secundários durante 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, foram realizadas duas lavagens com PBS/Tween 0,05% durante 3 minutos e mais duas lavagens de PBS também por 3 minutos. As lâminas foram montadas com meio de montagem VectaShield (DAKO, Glostrup, Dinamarca) contendo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) para marcação nuclear e analisadas utilizando o microscópio confocal Fluoview 1000 (Olympus).

4.7 ENSAIO DE LINFOPROLIFERAÇÃO

As NSC cultivadas foram dissociadas como descrito anteriormente e inativadas com o inibidor de proliferação celular mitomicina C na concentração de 25 μ g/ml em um volume de 5ml/10⁷ células durante um período de 30 minutos à 37°C. Esplenócitos foram isolados do baço de camundongos C57/BL6 em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2mM de L-glutamina, 0,1% de de solução vitamínica RPMI 1640 (Sigma), 1mM de piruvato de sódio, 10mM de hepes, 50 μ M de 2-mercaptoetanol e 50 μ g/ml de gentamicina. Os esplenócitos foram cultivados em placas de 96 poços na concentração de 8x10⁵ células/poço em triplicata, em um volume final de 200ul, na presença do ativador policlonal concanavalina A (ConA) a 5ug/ml, sozinho ou na presença de 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000 ou 1:10000 de NSC. Como controle da técnica foram realizados poços com esplenócitos, NSC ou co-cultura 1:1 sem aplicação de conA.

Após 48 horas de co-cultura, as placas foram pulsadas com 1 μ Ci de timidina tritiada (3 H – metil trimidina) (Amersham, Little Chalfont, Inglaterra) por 18 h, e o resultado de proliferação foi obtido após medição de incorporação de timidina tritiada em contador de radiação β (Hidex, Turk, Finlândia). A porcentagem de inibição da proliferação pelas NSC foi determinada após comparação com os valores obtidos pelos esplenócitos estimulados por ConA sem a presença das células.

4.8 EUTANÁSIA E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Os animais foram anestesiados com 400 μ l de quetamina (Cristália) a 50 mg/mL e 50 μ l de xilazina (Vetbrands, Vinhedo, SP, Brasil) a 20 mg/mL. Ao atingir o máximo grau anestésico os animais tiveram o sangue coletado através de punção cardíaca. Após a eutanásia utilizando uma guilhotina, os encéfalos, os baços e os pulmões foram retirados. No caso dos animais transplantados, um fragmento de baço e um de pulmão foram embebidos em tissue teck (SAKURA, Alphen aan den Rijn, Holanda) e, em seguida, congelados gradualmente em nitrogênio líquido utilizando-se álcool isopropílico. Foram realizados cortes de 10 μ m em criostato LEICA CM 1850 UV (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) e as secções obtidas foram utilizadas para as marcações de imunofluorescência, com o intuito de avaliar a migração das células transplantadas. As amostras de sangue foram processadas para retirada do soro, através de centrifugação a 3.500 rpm por 10 minutos. Posteriormente, o soro coletado foi armazenado a -80°C até utilização.

Os hemisférios esquerdos dos cérebros foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até o momento da realização do ELISA. Para isso, eles foram macerados utilizando-se tissue lyser (Qiagen, Venlo, Limburg, Netherlands) em tampão com inibidor de protease (0,4M NaCl, 0,05% Tween 20, 0,05% BSA, 0,1mM de PMSF, 0,1mM cloreto de benzetônio, 10mM EDTA, 20KI aprotinina em PBS) a 500mg/ml. O macerado foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 min e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C . Os hemisférios direitos dos cérebros foram fixados em formol 10% por 24 horas, e armazenados por no máximo 48 horas em álcool 70%. Posteriormente, os órgãos foram submetidos à inclusão em blocos de parafina. Eles foram desidratadas em soluções com concentração crescente de álcool etílico (70%, 80%, 90%) durante 30 minutos cada etapa, passados 3 vezes em álcool absoluto e 3 vezes em xilol, seguido de duas incubações durante 1 hora a 60°C para impregnação e inclusão em parafina histológica.

Em seguida, os fragmentos de tecido na parafina foram cortados em micrótomo RM 2145 (Leica Microsystems) e postos em lâminas desengorduradas previamente filmadas com poly-lisina (Sigma). Em cada baço e cérebro foram obtidos 6 cortes equidistantes de 5 μm de espessura cada. No caso dos cérebros os cortes do hipocampo foram obtidos entre as coordenadas 1,46-3,64 mm de Bregma. As lâminas foram então incubadas a 60° C por 60 minutos para diminuir a camada de parafina, e depois armazenadas à temperatura ambiente até o momento do uso.

As secções obtidas dos cérebros foram utilizadas para as marcações de imunofluorescência, com o intuito de avaliar a migração das células transplantadas e para coloração de Nissl para avaliar a perda neuronal.

4.9 COLORAÇÃO DE NISSL E CONTAGEM NEURONAL

As lâminas com os cortes do cérebro foram desparafinizadas em dois banhos de xilol à temperatura ambiente (5 minutos cada), seguidos de duas lavagens em álcool absoluto e uma em álcool 80% (todas 5 minutos cada), uma lavagem rápida em água corrente e finalmente nova lavagem rápida em água destilada. As lâminas foram coradas com solução de cresil violeta 0,5% por 10 minutos seguido de duas lavagens rápidas em álcool absoluto, e uma em xilol para desidratação e clarificação. As lâminas foram montadas utilizando bálsamo do Canadá e lamínulas, evitando a formação de bolhas, com posterior secagem à temperatura ambiente.

A quantificação neuronal em secções coradas com Nissl foi efetuada a partir de 6 cortes equidistantes de cada animal, nos 5 animais de cada grupo experimental. As lâminas foram escaneadas no Aperio (Aperio Technologies) e a contagem dos neurônios foi realizada nas áreas CA1 e CA3 do hipocampo utilizando um quadrante de 80 x 80 μm . Foi considerado neurônios células grandes e com citoplasma abundante. Só foram contados os neurônios que apresentavam nucléolos evidentes (Figura 8).

A densidade neuronal (neurônios/ mm^3) foi estimada usando a seguinte fórmula: $N_v = (1/axh) \times (PQ/PP)$, onde N_v = densidade neuronal estimada; a = área do quadrante usado

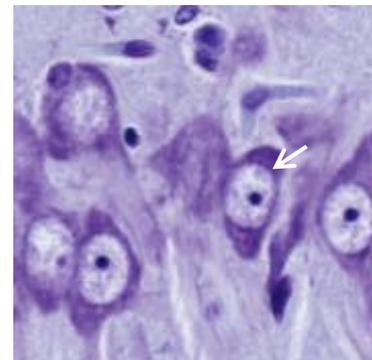


Figura 8: Contagem neuronal: representação de um quadrante de 80 x 80 μm . Neurônios com citoplasma abundante e nucléolo evidente (seta).

($6400 \mu\text{m}^2$); h = espessura do corte ($5 \mu\text{m}$); PQ = soma dos nucléolos contados; PP = soma dos quadrantes contados (6 quadrantes).

4.10 IMUNOFLUORESCÊNCIA EM TECIDO

Foi realizado imunofluorescência para GFP para análise de migração celular. No caso dos baços e pulmões as secções provindas de material congelado foram fixadas por 30min em PFA 4% e após lavagem de 2x com PBS (5 minutos cada) foi realizado a etapa de inibição das ligações inespecíficas com descrita abaixo. No caso dos cérebros, provindo de material parafinado, foi realizado desparafinização e recuperação antigênica. As lâminas com os cortes foram submetidas a dois banhos de xilol à temperatura ambiente, 5 minutos cada, seguida da etapa de hidratação em um banho em álcool absoluto, seguida de um banho em álcool a 90%, um em álcool 70%, um em álcool 30% e um banho de água corrente (5 minutos cada). A recuperação antigênica foi então induzida pelo calor com panela a vapor. As lâminas foram postas em cuba com tampão citrato pH 6,0 dentro da panela a vapor a 95-98°C. Após 20 minutos, as lâminas foram esfriadas durante 15 minutos a temperatura ambiente e lavadas 2x com PBS (5 minutos cada) para retirar o tampão citrato.

A etapa seguinte foi a inibição das ligações inespecíficas, importante para evitar resultado falso positivo, utilizando-se a solução de bloqueio *Background blocking Solution* (Diagnostic Biosystems). As lâminas foram retiradas do tampão PBS, postas em câmara úmida e os cortes delimitados com caneta hidrofóbica. Imediatamente após essa etapa, foi aplicada, em cada corte, a solução de bloqueio seguida de uma incubação por 10 minutos à temperatura ambiente na câmara úmida. O excesso da solução de bloqueio foi retirado e aplicado o anticorpo primário anti-GFP (Molecular Probes cat:A6455) diluído 1:400 em solução PBS + BSA 1% em quantidade suficiente (50 μ l) para cobrir os cortes que foram então incubados por 18 h em câmara úmida a 4°C. Após esta incubação, as lâminas foram lavadas três vezes em tampão PBS durante 5 minutos cada lavagem e em seguida foi aplicada o anticorpo secundário anti-IgG de coelho 488 (Molecular Probes cat:A11008) diluído 1:200 em solução PBS + BSA 1%.

Os cortes com anticorpos foram incubados por 1 hora em câmara úmida a temperatura ambiente, seguido de três lavagens (5 minutos cada) com tampão PBS. As lâminas foram montadas em VectaShield com DAPI (Dako). As células transplantadas foram detectas nos tecidos por análise de microscopia de fluorescência em microscópio

confocal Fluoview 1000 (Olympus) a partir da visualização de células emissoras de fluorescência de comprimento de onda 517 nm utilizando o laser 473 nm.

Durante o experimento foi feito um controle positivo (tecido provindo de animal GFP) e um controle negativo (sem o anticorpo primário) para validar os resultados.

4.11 ELISA

Para quantificação de citocinas no soro e no cérebro dos ratos foram utilizados os kits dual-set ELISA para IL-1 β , IL-6 e IL-10 de rato (R&D Systems, MN, EUA). Em resumo, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 50 μ l de anticorpo de captura, *overnight*, à temperatura ambiente seguida de uma lavagem com PBS tween, bloqueio das ligações inespecíficas com PBS + BSA 1% por 1 hora, uma lavagem com PBS tween, incubação com 50 μ l das amostras (soro ou sobrenadante dos cérebros) ou dos padrões por 2 horas, três lavagens com PBS tween, incubação com 50 μ l do anticorpo de detecção biotilado por 2 horas, quatro lavagens com PBS tween, incubação de 50 μ l de streptavidina ligada a enzima peroxidase por 20 minutos, três lavagens com PBS tween, aplicação de 50 μ l do tampão de revelação aguardando o aparecimento de cor na curva padrão e parada da revelação utilizando-se 50 μ l de uma solução stop. A leitura foi realizada a 450nm utilizando-se o ENVISION 2104 *Multilabel reader* (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA).

4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas dos dados foram realizadas com o uso do software GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) e os dados foram expressos como média (\pm erro padrão), onde valores de *P* menores de 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. As quantificações de perda neuronal e dos níveis de citocinas por ELISA tiveram suas análises utilizando ANOVA de uma via com pós-teste de Newman-Keuls e a análise das linfoproliferações foi realizada utilizando ANOVA de uma via com pós-teste de Turkey.

5 RESULTADOS

5.1 CULTIVO E DIFERENCIAÇÃO DAS NSC

NSC isoladas da SVZ de camundongos C57BL/6, transduzidas para expressar GFP, foram cultivadas, cresceram parte em suspensão e parte aderida a garrafa. Por volta de 5 dias após primeira passagem, as NSC apresentaram aspecto de neuroesferas (Figura 9).

Para caracterizar as NSC e analisar o seu potencial de diferenciação, essas células foram cultivadas por uma semana em meio de diferenciação ou proliferação. Após esse tempo, as células foram submetidas ao protocolo de imunofluorescência (Figura 10).



Figura 9: Cultura das NSC. As células cresceram em suspensão com morfologia específica de neuroesfera (200x).

Primeiramente, para caracterizar as NSC, as células indiferenciadas foram marcadas com nestina, uma proteína de filamento intermediário presente no citoesqueleto de células em divisão durante o estágio inicial do desenvolvimento do SNC e que é usada como marcador de NSC. De fato, as NSC utilizadas expressaram nestina (Figura 10A).

As NSC são reconhecidamente capazes de se diferenciar em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (OLIVER-DE LA CRUZ, 2012). Após a indução de diferenciação, parte das células apresentaram morfologia característica de neurônio e positividade para BIII tubulina (Figura 10B), proteína constituinte do microtubulos de neurônios e doublecortina (DCX) (Figura 10D), proteína associada a microtúbulos expressa em neurônios imaturos e seus precursores; Parte das células também apresentaram morfologia característica de astrócitos e positividade para GFAP (Figura 10F) uma proteína de filamento intermediário presente em astrócitos. Não foi observada a presença de células positivas para DCX (Figura 10C) ou GFAP (Figura 10E) na cultura das NSC quando cultivadas com o meio de proliferação.

As células cultivadas foram analisadas também para presença de GAD67, uma enzima presente em neurônios GABAérgicos e importante para a produção do neurotransmissor GABA. Foram observadas células com morfologia de neurônio positivas para GAD67 nas células cultivadas com meio de diferenciação (Figura 10H). Nas células indiferenciadas não foi observada nenhuma marcação para GAD67 (Figura 10G).

Devido ao fato das células serem usadas para terapia celular, foi avaliado a expressão de CD44, uma glicoproteína de superfície importante para adesão e migração celular. De fato, tanto as células indiferenciadas (Figura 10I) quanto as diferenciadas (Figura 10J), apresentaram a expressão desse marcador.

A proteína de superfície CD90 já foi descrita em células da glia e em neurônios, e apesar de ser um marcador característico de célula tronco mesenquimal, ela não é marcador de NSC. Após a diferenciação, foram observadas células com formato de astrócitos positivas para CD90 (Figura 10M) enquanto as células indiferenciadas não apresentaram marcação positiva (Figura 10L). Vimentina é um filamento intermediário, marcador característico de células do mesenquima. Elas também são encontradas nas NSCs e em progenitores neuronais e gliais. As NSCs quando cultivadas em meio de proliferação (Figura 10N) ou diferenciação (Figura 10O) apresentaram positividade para vimentina.

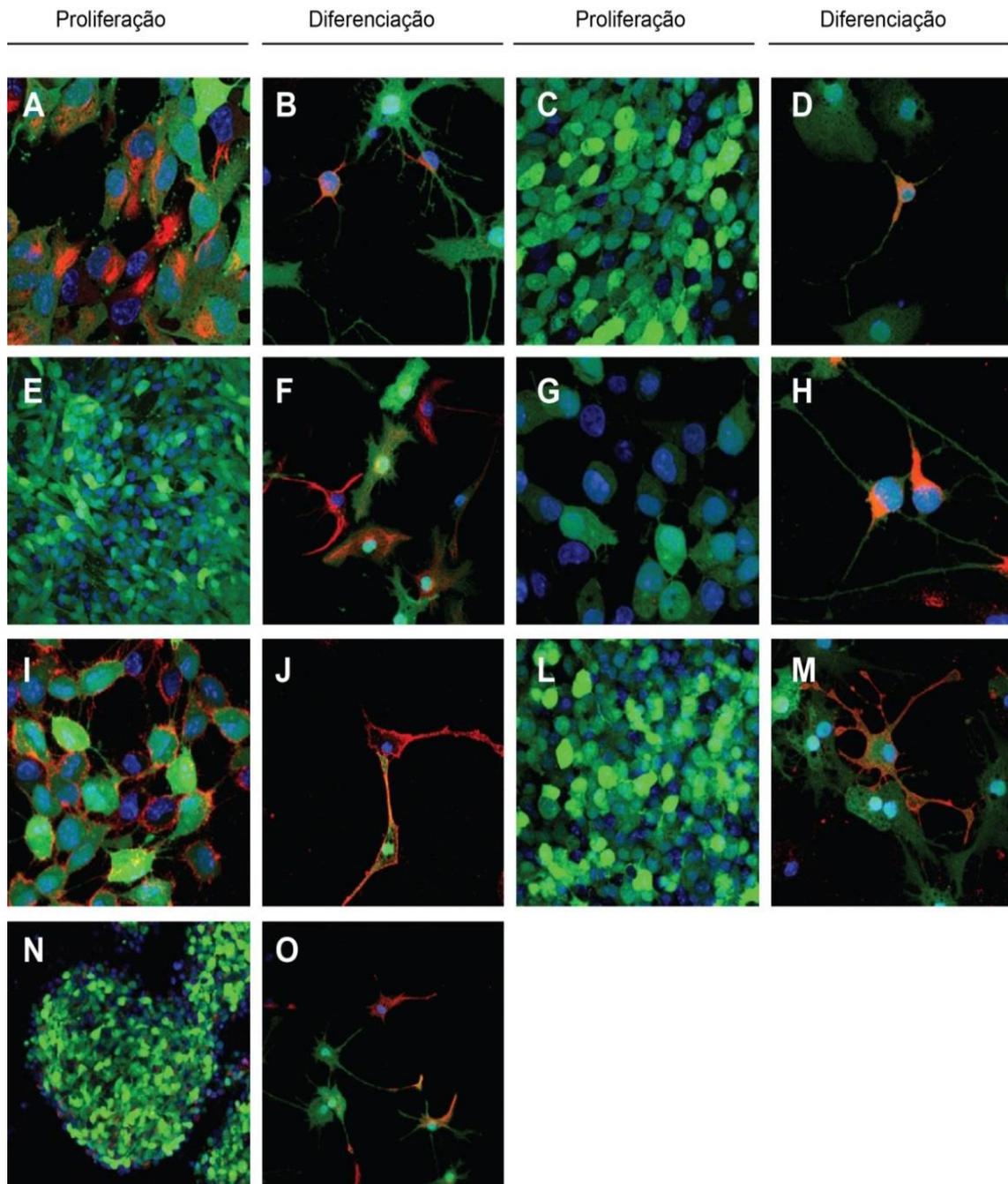


Figura 10: Caracterização das NSC e das células diferenciadas por imunofluorescência. Células GFP⁺ (verde), núcleos marcados com DAPI (azul) e, em vermelho, marcação contra as proteínas apresentadas a seguir. Em A, é mostrado marcação em nestina, em B Beta III tubulina, em C-D doublecortina, em E-F GFAP, em G-H GAD67, em I-J CD44, em L-M CD90 e em N-O vimentina. Aumentode 400x em B, E, F, L, M, N e O, com zoom de 1,5 em F e zoom de 2 em B, L e M e aumento de 600x em A, C, D, G, H, I e J, com zoom de 2 em A e I e zoom de 2,5 em H.

5.2 ANÁLISE DE *SIDE POPULATION* DAS NSCs

Já foi previamente descrito a presença de ABCG2, uma proteína transportadora associada à membrana celular, em NSC (KIM e MORSHEAD, 2003). Essa proteína está presente em um grupo de células chamado de *side population* que é uma sub-população de células obtidas em citometria de fluxo. Diversas células-tronco e/ou células tumorais expressam esse transportador (GOLEBIEWSKA et al., 2011).

Como controle do experimento de exclusão de Hoescht 33342, utilizamos células mononucleares de medula óssea de camundongo. A análise mostrou que 0,4% dessa população apresentaram-se negativas para o fluorocromo caracterizando *side population* (Figura 11A), condizendo com a literatura (KIM e MORSHEAD, 2003). A análise das NSC demonstrou que 68% dessas células são *side population* (Figura 11B).

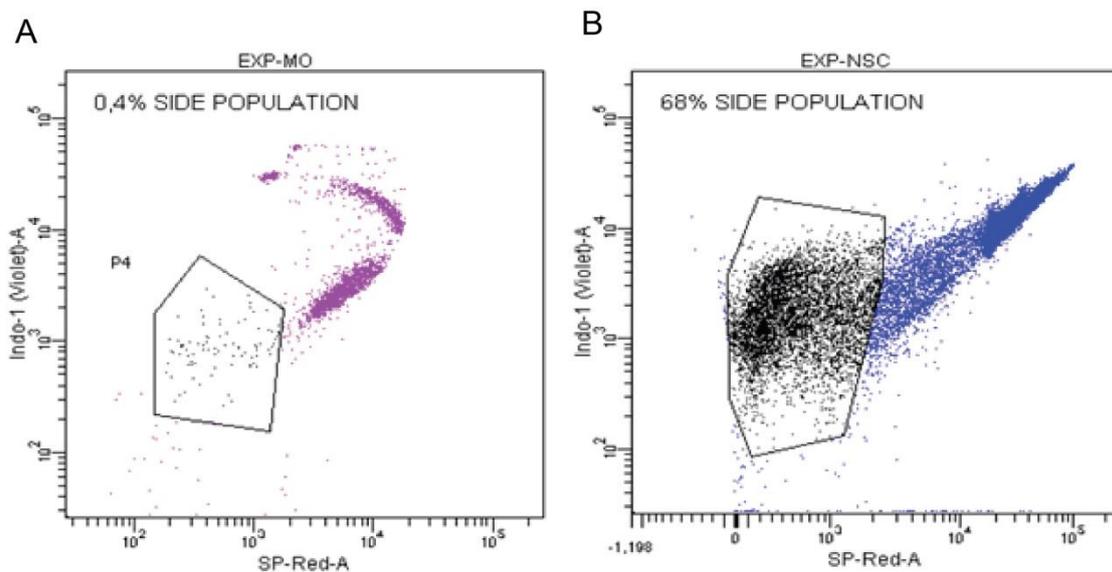


Figura 11: Análise de *side population* das NSC por teste de exclusão de Hoescht 33342 em citômetro de fluxo. Em A, foi analisado uma população de células mononucleares de medula óssea (controle), e em B as NSC. Os pontos pretos, delimitados pelos polígonos, correspondem a cada evento negativo para Hoescht, enquanto os pontos rosas ou azuis são eventos de células positivas para esse fluorocromo.

5.3 ANÁLISE CITOGENÉTICA E DO POTENCIAL TUMOROGÊNICO DAS NSC

Um dos pontos importantes a se observar ao se utilizar as células-tronco para terapia celular é a segurança dessas células. Para isso foram feitas análises citogenética e de formação de tumor dessas células em animais SCID.

Para avaliação citogenética foram analisadas no total, 30 metáfases, no que diz respeito a rearranjos cromossômicos e nível de ploidia. Foram consideradas normais células com 40 cromossomos acrocêntricos. A análise mostrou cariótipo aneuploide com número de cromossomo $2n=41$ em três células (Figura 12A) e a presença de cromossomos metacêntricos também em três células (Figura 12B).

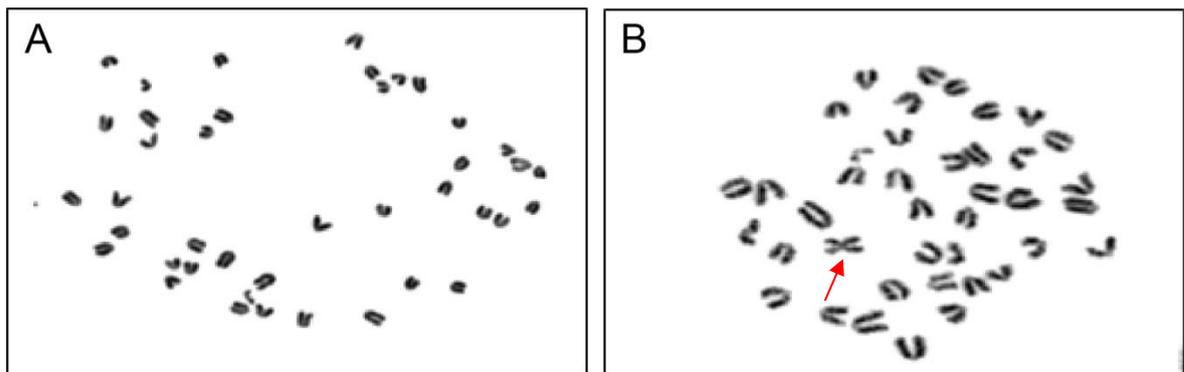


Figure 12: Análise citogenética das NSCs. A: Metáfase representativa $2n=41$; B: Metáfase representativa $2n=40$ com 1 cromossomo metacêntrico (seta).

Para se observar a potencialidade das células em formar tumor, elas foram injetadas no testículo de camundongos SCID. O tecido normal está apresentado na Figura 13A, correspondente à análise histológica por HE do testículo de camundongos controles, ou seja, injetados com salina. Após 1 mês da injeção de NSC, a análise mostrou tecido semelhante ao grupo controle, não demonstrando presença de tumor (Figura 13B). Como controle positivo, foram usados camundongos injetados com iPSC, células que conhecidamente possuem alta capacidade de formação de tumores (Figura 13C).

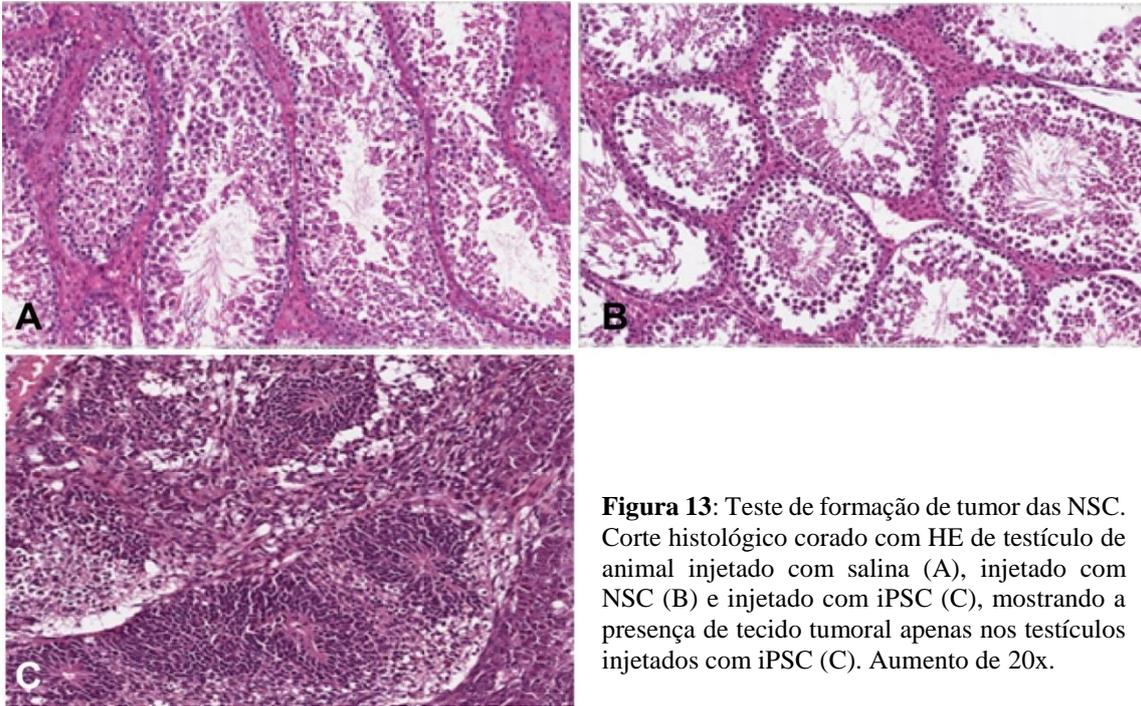


Figura 13: Teste de formação de tumor das NSC. Corte histológico corado com HE de testículo de animal injetado com salina (A), injetado com NSC (B) e injetado com iPSC (C), mostrando a presença de tecido tumoral apenas nos testículos injetados com iPSC (C). Aumento de 20x.

5.4 POTENCIAL IMUNOMODULATÓRIO *IN VITRO* DAS NSC

Para analisar o potencial imunomodulatório das NSC foi realizado ensaios de linfoproliferação. No total 3 experimentos distintos foram realizados com resultados semelhantes entre eles. Um gráfico representativo está sendo mostrado na figura 14. Nos poços sem adição de ConA (esplenócitos, NSC e co-cultura) não foi observado proliferação celular, mostrando que o ensaio é funcional. Ao aplicar ConA nos esplenócitos foi observado um aumento da proliferação celular (66.144 ± 7.735), inibida de maneira significativa quando co-cultivada com NSC 1:1 (27.439 ± 1.699) ou NSC 1:10 (31.171 ± 3.286). Apesar da tendência de inibição após co-cultura com NSC 1:100 (51.975 ± 6.645), esta não foi significativa. Nas co-culturas com NSC 1:1.000 (61.917 ± 3.299) e 1:10.000 (67.453 ± 3.623) não houve diferença em relação à cultura de esplenócitos.

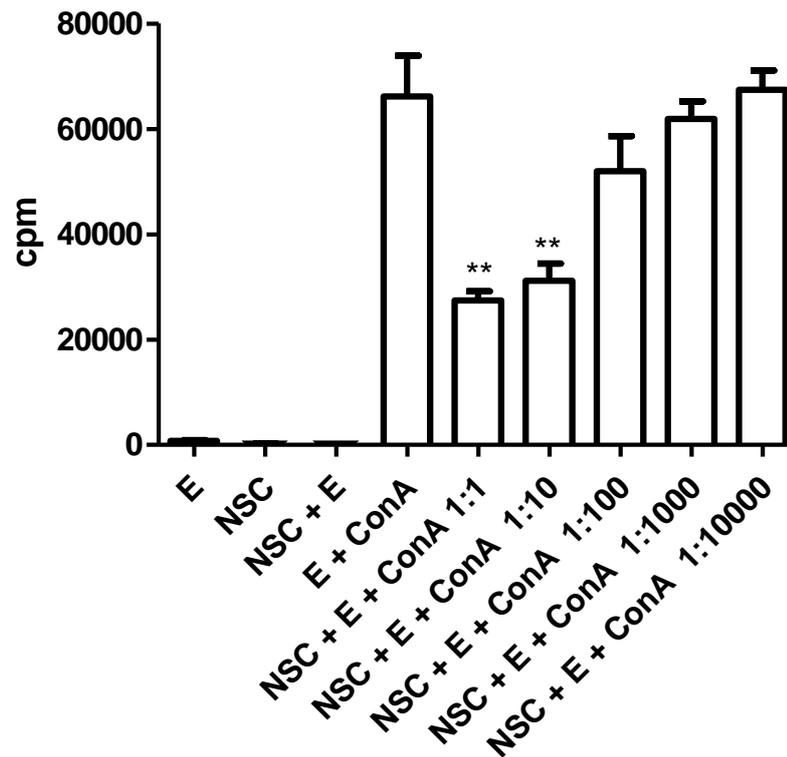


Figura 14: Gráfico representativo de ensaio de linfoproliferação das NSC. Os esplenócitos após cultivados com NSC na proporção 1:1 e 1:10 tiveram redução da proliferação de maneira significativa. Resultado expresso em média de triplicata. Análises por ANOVA seguido de pós-teste de Turkey * $p < 0.05$. E = esplenócitos; NSC = célula tronco-neural; ConA = Concanavalina A.

5.5 INDUÇÃO DA EPILEPSIA

Foram utilizados no total, 67 ratos *Wistar* (58 induzidos e 9 normais não induzidos). Devido ao fato de ocorrer variações entre as induções, mas ao mesmo tempo não ser possível realizar todos os grupos em um mesmo dia, foram feitos controles salinas para cada um de quatro dias de indução. A tabela abaixo mostra o resultado das induções.

Dos 58 animais induzidos, 36 (62%) entraram em racine V e SE e entraram no estudo. Desses, 4 vieram a óbito antes do ponto de eutanásia (11%). No total obtivemos 9 animais transplantados e 8 controles no ponto de eutanásia de 24 h e 9 animais transplantados e 6 controles no ponto de eutanásia de 12 dias.

Tabela 1: Resumo das induções do SE.

Indução	Induzidos	Racine V + SE	Morte durante ou após da indução	Transplantados com NSC	Injetados com salina	Tempo de eutanásia
1°	15	9	0	5	4	24 h
2°	15	8	0	4	4	24 h
3°	14	9	1	5	3	12 d
4°	14	10	3	4	3	12 d

Apenas os animais que apresentaram racine V e SE foram incluídos no estudo. Colunas 2 a 6 representam número de animais.

5.6 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR

Uma das principais análises a serem feitas após o transplante celular é a análise da capacidade das células transplantadas de migrar para o tecido alvo.

Foi feita imunofluorescência para GFP nos cérebros dos animais transplantados com NSC do ponto de eutanásia de 24 h (n=9) e de 3 animais transplantados do ponto de 12 dias. Não foi achada nenhuma célula GFP nesses tecidos. Como as células foram transplantadas via venosa, foi investigada a presença dessas células no baço e pulmão dos animais transplantados. Foram analisados 6 cortes

do baço e pulmão congelados de 7 animais (4 do ponto de eutanásia de 24 h e 3 do ponto de eutanásia de 12 dias) mostrando a presença de poucas células fluorescentes para GFP (Figura 14) em todos os baços analisados e a presença de célula em apenas um pulmão.

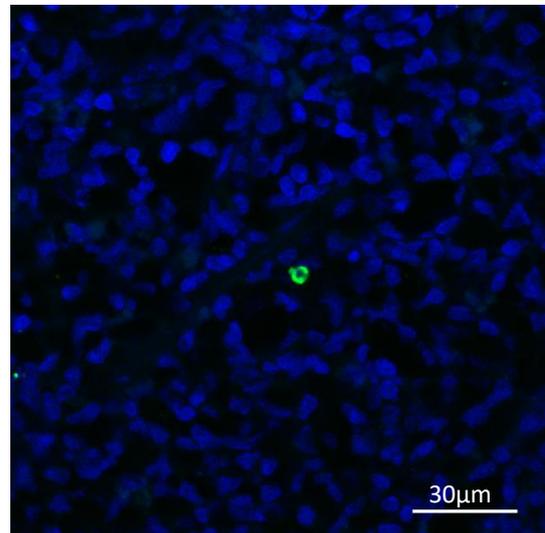


Figura 15: Análise de migração celular por imunofluorescência. Presença de célula GFP no baço de um animal transplantado com NSC.

5.7 QUANTIFICAÇÃO DA PERDA NEURONAL

Uma das principais alterações histopatológicas presentes no modelo experimental da epilepsia é a perda neuronal. Um dos experimentos essenciais para observar o potencial terapêutico das células transplantadas é a capacidade dessas células de interferir nessa perda de neurônios. Dessa forma, os hipocampus dos grupos de animais foram corados com Nissl e os neurônios presentes nas regiões CA1 e CA3 quantificados. Imagens representativas dos hipocampus dos ratos estão mostradas na figura 15. Em animais normais não foi encontrado perda neuronal (Figura 15A, a-b). Os animais epiléticos, tanto os do grupo salina (Figura 15 B, c-d) quanto os tratados (Figura 15 C, e-f), apresentaram certo grau de perda neuronal nas áreas CA1 (Figura 15 c, e) e CA3 (Figura 15 d, f). Resultado semelhante foi encontrado nos dois pontos de eutanásia (24 h e 12 d).

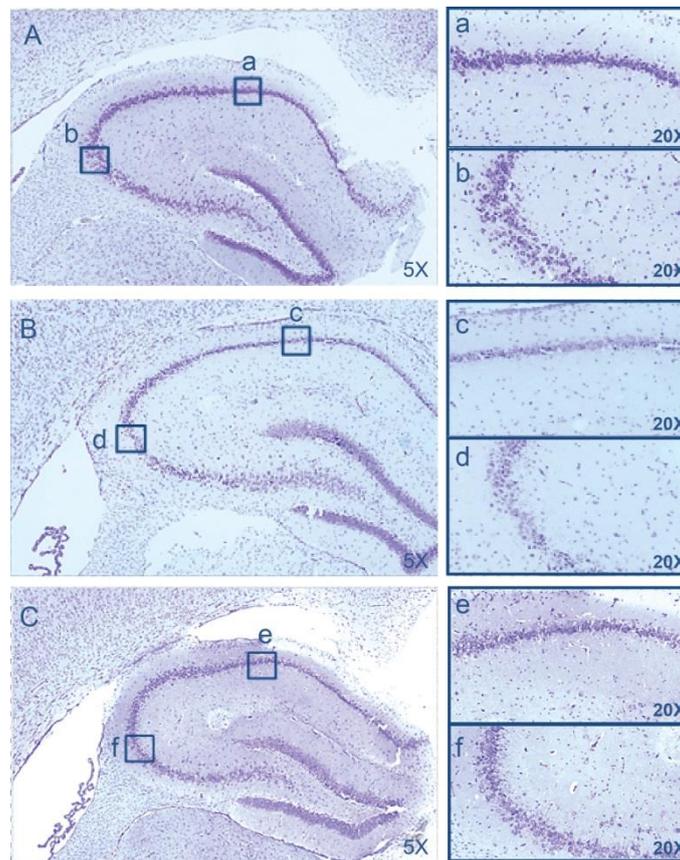


Figura 16: Análise histológica do cérebro dos ratos. (A–C) Secções representativas coradas com Nissl dos hipocampus de um rato normal não epilético (A, a=CA1, b=CA3), um rato epilético não tratado (B, c= CA1, d=CA3) e um rato epilético tratado com NSC (C, e=CA1, f=CA3), mostrando perda neuronal nos animais epiléticos tratados (e-f) e não tratados (c-d).

A densidade neuronal (neurônios/ mm³) de cada cérebro foi obtida e a perda neuronal pôde ser quantificada, como mostrado na Figura 16. Em relação aos animais eutanasiados 24 horas após a indução do SE, na sub-área CA1 do hipocampo o grupo normal possuiu uma densidade neuronal (332.118 +/- 18.820) significativamente maior que o grupo salina (222.871 +/- 21.314) e que o grupo transplantado com NSC (258.789 +/- 24.432), mas sem diferença estatística entre os últimos dois grupos (Figura 16A). Da mesma forma, na sub-área CA3, apesar de não haver diferença estatística entre o grupo salina (124.121 +/- 17.996) e o transplantado (148.611 +/- 21.310), o grupo normal (233.403 +/- 13.874) apresentou densidade neuronal significativamente maior (Figura 16B).

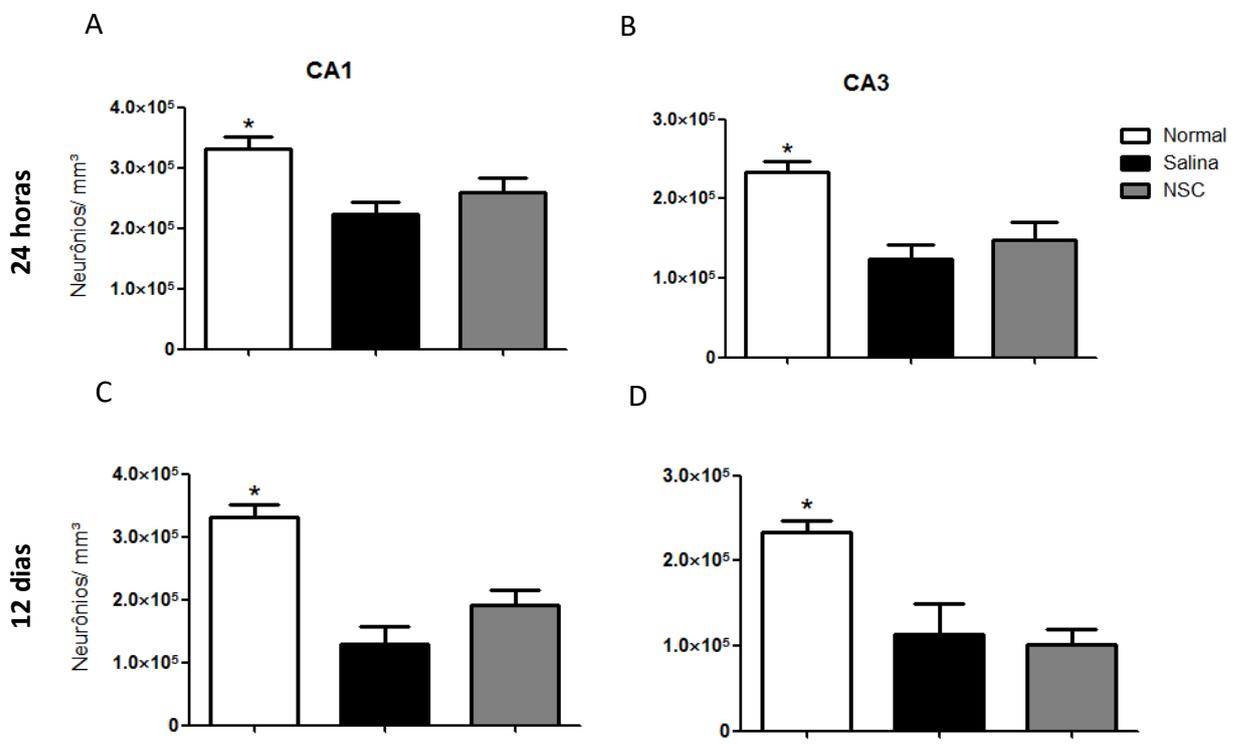


Figura 17: Quantificação da perda neuronal no hipocampo dos ratos. Contagem neuronal de seções do cérebro coradas com Nissl nas áreas selecionadas para quantificação em CA1 e CA3. Comparação da densidade neuronal por milímetro cúbico de volume de tecido entre as diferentes seções de hipocampo foi realizada 24 horas e 12 dias após a indução por lítio-pilocarpina nos animais epiléticos transplantados com NSC (cinza), animais epiléticos injetados com salina (preto) e animais normais não epiléticos (branco). Dados expressos como média±SEM, n=6 a 9 por grupo. Análises por ANOVA seguido de pós-teste de Newman-Keuls *p < 0.05 comparado com demais grupos.

Nos animais eutanasiados 12 dias depois da indução o resultado foi semelhante. Em ambas as sub-áreas CA1 (Figura 16C) e CA3 (Figura 16D) do hipocampo foi observado diferença estatística apenas quando comparado a densidade neuronal do grupo normal

(332.118 \pm 18.820 em CA1 e 233.403 \pm 13.874 em CA3) com o grupo salina (129.375 \pm 28.719 em CA1 e 114.188 \pm 35.514 em CA3) ou com o grupo transplantado (190.703 \pm 24.622 em CA1 e 101.563 \pm 17.987 em CA3).

5.8 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ- E ANTI-INFLAMATÓRIAS *IN SITU* E NO SORO

Para avaliarmos se no modelo de epilepsia, as NSC são capazes de interferir nos níveis de citocinas inflamatórias, foi realizado o ELISA do soro dos animais e do cérebro do grupo de eutanásia de 24 horas. Na figura 18 está sendo mostrado o resultado do ELISA dos cérebros. Em relação à citocina IL-1 β , o grupo salina (519,9 \pm 39,83) apresentou níveis da citocina significativamente maiores que o grupo normal (102,5 \pm 69,51), e que o grupo transplantado com NSC (389,2 \pm 38,76). Houve diferença estatística entre o grupo normal e o grupo NSC.

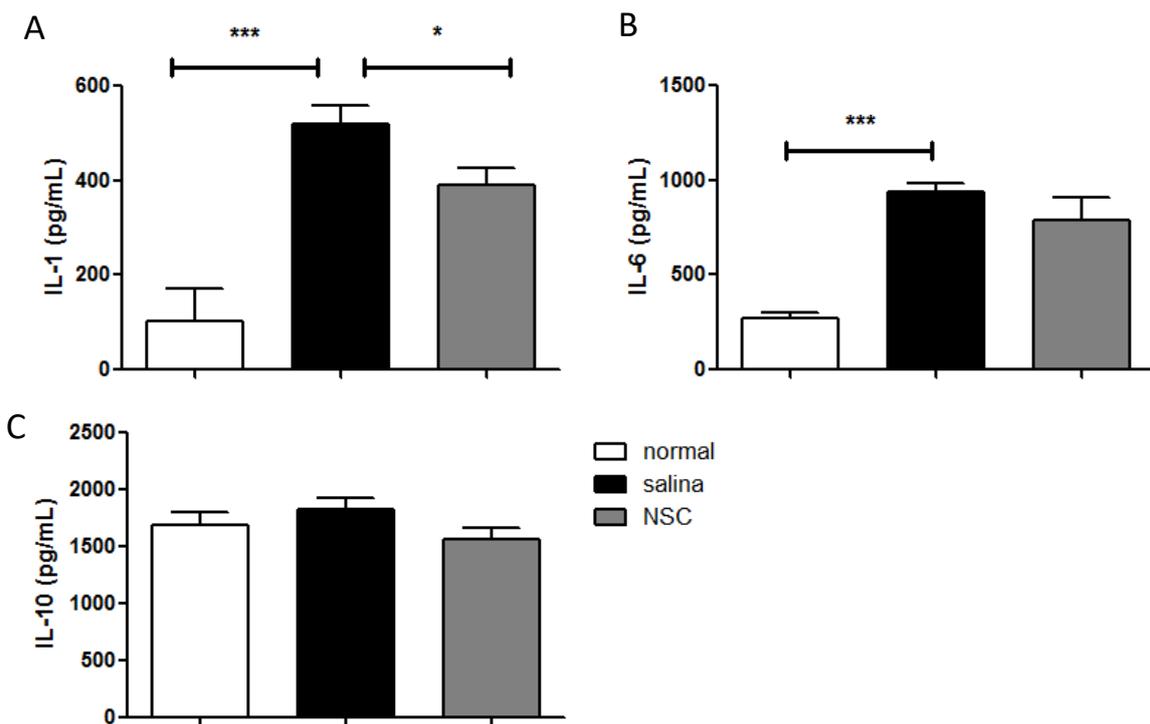


Figura 18: Quantificação dos níveis de citocinas no cérebro dos ratos. Análise por ELISA das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β (A) e IL-6 (B) e da citocina anti-inflamatória IL-10 (C) foi realizado 24 horas após a indução por lítio-pilocarpina nos animais epiléticos transplantados com NSC (cinza), animais epiléticos injetados com salina (preto) e animais normais não epiléticos (branco). Dados expressos como média de duplicata, n=5 a 9 animais por grupo. Análises por ANOVA seguido de pós-teste de Newman-Keuls *p < 0.05.

Em relação à citocina IL-6, apesar do grupo salina (936,0 +/- 47,42) ter apresentado níveis significativamente maiores que o grupo normal (273,0 +/- 28,93), não houve diferença estatística em relação ao grupo transplantado com NSC (786,6 +/- 118,9). Da mesma forma que o resultado em IL-1 β , houve diferença estatística entre o grupo normal e o grupo NSC. O resultado dos níveis da IL-10 não mostraram diferença estatística entre os grupos (normal= 1686 +/- 117,9; salina= 1828 +/- 101,1; NSC= 1567 +/- 91,34).

O resultado do ELISA nos soros mostrou que não houve diferença estatística entre os grupos em nenhuma das citocinas analisadas (IL-1 β , IL-6 e IL-10).

6 DISCUSSÃO

O cérebro adulto foi considerado, por muito tempo, um órgão com ausência de células-tronco e de formação de novos neurônios. Porém, descobertas utilizando modelos animais vertebrados e invertebrados mostraram a ocorrência de neurogênese nesse órgão. Nos mamíferos isso ocorre a partir de NSC presentes na SVZ e SGZ do cérebro (OLIVER-DE LA CRUZ, 2012). Estudos sobre a estimulação de NSC endógenas ou do transplante de NSC exógenas em regiões lesionadas do SNC foram realizados, apresentando bons resultados em diversos modelos animais, tais como o de isquemia cerebral, de trauma raquimedular, de esclerose múltipla e de epilepsia (Revisor por (DE FEO et al., 2012) (KOKAIA et al., 2012)). Apesar dos mecanismos de ação dessas células ainda não estarem claros, sabe-se que incluem integração celular e imunomodulação (DE FEO et al., 2012). O presente estudo foi realizado com o intuito de analisar o efeito das NSC células na ELT, uma desordem neuroinflamatória crônica, esperando que os resultados obtidos ajudem a elucidar pontos ainda obscuros sobre a eficácia e os mecanismos de ação dessas células.

As NSC usadas no nosso estudo foram isoladas da SVZ de camundongos C57BL/6 adultos e transduzidas para expressar GFP. Devido ao fato de ser uma linhagem celular nova no nosso laboratório, o presente estudo apresentou, como primeiro objetivo, a caracterização fenotípica dessa linhagem de células. Para isso, elas foram caracterizadas por imunofluorescência e analisadas por citometria de fluxo quanto à presença de *side population*. O resultado mostrou que elas apresentaram positividade para nestina, proteína característica das NSC (LEND AHL et al., 1990) e vimentina, uma proteína que, apesar de ser característica de células derivadas do mesênquima, já foi previamente descrita em células do NSC (TAKACS et al., 2010). Elas se apresentaram negativas para os marcadores

característicos de células diferenciadas (GFAP, bIIIItubulina, Doublecortina e GAD67) e para CD90, que é um marcador de CT mesenquimal. O resultado mostra que, de fato, a linhagem de célula usada no estudo possui um fenótipo característico de NSC. Além disso, elas apresentaram positividade para CD44, um marcador de adesão e migração celular. Um estudo anterior, utilizando essa mesma linhagem de células, demonstrou 99,23% de células positivas para esse marcador em análise por citometria de fluxo (CUSIMANO et al., 2012). O resultado da análise por citometria de fluxo de exclusão de Hoescht 33342 demonstrou que 68% das células CD44⁺ são *side population* o que é uma porcentagem alta quando comparada com a literatura. Kim e Morshead (2003) realizaram análise de *side population* em neuroesferas de NSC adultas e mostraram que 9,8% das células totais são *side population* e que, dentro dessa população, há 7,5 vezes mais NSC do que a população que incorporou o Hoescht. Eles discutiram que cada neuroesfera possui de 15.000 a 20.000 células, mas apenas 0,2-0,8% dessas são NSC capazes de formar novas neuroesferas, a maioria sendo progenitores com capacidade proliferativa limitada, e que a maior parte das NSC estaria na subpopulação de *side population* (KIM e MORSHEAD, 2003). Outro estudo demonstrou que em neuroesferas isoladas de embrião de camundongo (15 dias de desenvolvimento embrionário) e cultivadas durante 7 dias, 36% não incorporaram Hoescht, sendo consideradas *side population* (HULSPAS e QUESENBERRY, 2000). Outro estudo demonstrou que neuroesferas também isoladas de embrião de camundongo (14,5 dias de desenvolvimento embrionário) e cultivadas durante 7 dias apresentaram apenas 0,6% de *side population* quando comparado com o total de células (MOUTHON et al., 2006). Nesse último estudo as *side population* separadas por *sorter* formaram duas vezes mais neuroesferas quando comparado com a população que incorporou o Hoescht.

As NSC são reconhecidamente capazes de se diferenciar em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (OLIVER-DE LA CRUZ, 2012). De fato, as NSC do estudo foram capazes de se diferenciar em células da linhagem neuronal por apresentarem morfologia característica de neurônio e positividade para bIIIItubulina e doublecortina, marcadores presentes somente em progenitores neuronais e neurônios imaturos. Análises futuras visando identificar a presença de marcadores de neurônios maduros, como o caso do NeuN, poderão ser feitas. O fato de parte das células ter sido positiva para GAD67 mostra que elas são capazes de se diferenciar em neurônios GABAérgicos, o que mostra a sua possível utilidade em transplante em ELT, uma desordem onde uma das características é a morte de neurônios principalmente os GABAérgicos. Diversos estudos têm demonstrado o potencial de

progenitores neurais, principalmente os derivados da eminência ganglionar, em se diferenciar em progenitores GABAérgicos *in vitro* e *in vivo* (HUNT et al., 2013; NAEGELE, 2010; WALDAU et al., 2010). Stewart e colaboradores (2000) mostraram que progenitores neurais da SVZ em ratos são GABAérgicos e que expressam GAD67 (STEWART et al., 2002).

As células foram também fizeram diferenciação na linhagem astrocítica, uma vez que apresentaram uma morfologia característica de astrócitos e passaram a apresentar positividade para GFAP, um marcador presente tanto em progenitores quanto em astrócitos maduros e imaturos. Futuras análises devem ser feitas para determinar se as células estudadas são capazes de se diferenciar em oligodendrócitos. A vimentina é uma proteína presente nas NSC e em progenitores neuronais e gliais. De fato, tanto as células diferenciadas quanto as indiferenciadas apresentaram a marcação para essa proteína. Em neurônios maduros, a vimentina é substituída por neurofilamentos (YABE et al., 2003). Análises de co-expressão de vimentina com marcadores neuronais devem ser realizadas para avaliar o estágio de maturação dos neurônios obtidos.

Um dos aspectos importantes quando se trabalha com transplante celular é a segurança da utilização das células a serem transplantadas, principalmente em relação à formação de tumores. Já é bem descrito na literatura que células expandidas em cultura possuem alterações cromossômicas que podem levar a malignidade das células *in vitro* ou *in vivo*, e que o aparecimento dessas alterações está intimamente ligado ao número de passagens das células (MIURA et al., 2006; VUKICEVIC et al., 2010). Tais aberrações ocorrem, provavelmente, pela adaptação progressiva das células às condições de cultura e devido à seleção de clones com crescimento acelerado (VUKICEVIC et al., 2010). Para reduzir as chances de formação de tumores, antes de realizar o transplante celular é importante fazer um controle da estabilidade genética das culturas.

Foi realizada a análise cromossômica das NSC, e a avaliação de 30 metáfases mostrou alteração de número em três delas e alterações morfológicas também em três. Uma análise do cariótipo deve ser realizada para determinar se há um padrão em relação às aberrações encontradas. Vukicevic e colaboradores (2010), por exemplo, demonstraram por cariotipagem que, após 16 semanas de cultivo, as neuroesferas derivadas de feto de camundongo apresentaram aberrações cromossômicas estruturais randômicas e uma alteração de número regular no cromossomo 1 (VUKICEVIC et al., 2010). Em contrapartida, Foroni e colaboradores (2007) mostraram que as NSC possuem fenótipo estável, sem

transformação *in vitro* e sem formação de tumores *in vivo* por mais de 100 passagens, apresentando poucas alterações cromossômicas somente após a 60ª passagem (FORONI et al., 2007).

As CTs de camundongos parecem ser mais susceptíveis à instabilidade cromossômica quando comparadas às CT de humanos (MIURA et al., 2006). Apesar disso, casos de aparecimento de tumores em pacientes que receberam células-tronco estão descritos na literatura (AMARIGLIO et al., 2009; THIRABANJASAK et al., 2010). Além da questão da estabilidade genética, o microambiente que entrará em contato com as células transplantadas parece ter relação com o aparecimento de tumores. Melzi e colaboradores (2010) transplantaram NSC, em co-transplante com ilhotas pancreáticas, em cápsula renal de camundongos diabéticos. As NSC transplantadas formaram tumores *in vivo*, mostrando que ao serem transplantadas em tecidos heterotópicos (que não são o SNC) elas interagem com sinais do microambiente favorecendo a transformação tumoral (MELZI et al., 2010). Para analisar o potencial tumorigênico das NSC estudadas, elas foram transplantadas em testículos (tecido heterotópico) de camundongos SCID, que além de serem mais propensos à formação de tumores, não permitem a rejeição imunológica das células transplantadas. Não houve a formação de tumores após um mês do transplante, demonstrando a segurança das células para uso *in vivo*.

O emprego da terapia celular na epilepsia tem se revelado uma importante alternativa terapêutica. Recentemente, trabalhos publicados por nosso grupo mostraram que o transplante de células mononucleares de medula óssea em modelo de epilepsia em ratos teve efeitos benéficos, reduzindo a CER, perda neuronal e modulando a expressão de citocinas pró- e anti-inflamatórias (COSTA-FERRO et al., 2010; COSTA-FERRO et al., 2012). Apesar de essas serem células amplamente usadas na clínica e de fácil obtenção, as NSC podem ser melhores alternativas para o tratamento de lesões do SNC por terem maior capacidade de se diferenciar em células do parênquima do SNC, tendo assim uma possível ação em integração celular para recuperação funcional do tecido lesionado. De fato, as NSC são os tipos celulares mais estudados envolvendo terapia celular e epilepsia. Diversos estudos analisaram o efeito do transplante de NSC obtidas de diversas fontes em modelos experimentais de epilepsia (Revisado por (SHETTY e HATTIANGADY, 2007; SHETTY, 2011, 2012; ROPER e STEINDLER, 2013; NAEGELE, 2010)).

O uso de NSC em terapia celular abre diversas discussões, principalmente relacionadas à transferência da metodologia para o uso em humanos. O isolamento de NSC

do cérebro de pacientes só é possível após biópsias, o que raramente é realizado. Em epilepsia, apenas alguns casos possuem lesões focais, sendo candidatos à terapia cirúrgica. Mesmo assim, as células-tronco isoladas dessas biópsias possuem característica de progenitores neurais e não de NSC (WALTON et al., 2006). O uso de NSC fetais e derivadas de ESC abre questões éticas e de rejeição imunológica e, além disso, no caso das ESC há também o viés da segurança, já que esse tipo celular é capaz de formar teratomas após transplante em modelos animais (GROPP et al., 2012). A tecnologia de iPSC vem como uma alternativa viável, apesar do custo e tempo de reprogramação e diferenciação celular e a questão da segurança dessas células ainda ser um empecilho. Ainda não está clara qual fonte de NSC preenche melhor os requisitos para uso na clínica. Fatores como expansão em larga escala, eficácia terapêutica, segurança e tolerância imunológica devem ser analisados (DE FEO et al., 2012). As células usadas no nosso estudo foram isoladas de cérebros adultos. Essas células, apesar da dificuldade de obter culturas primárias em humanos e sofrerem críticas com relação ao limite de expansão celular e à possibilidade de ocorrer modificações genéticas e cromossômicas durante a expansão em cultura, possuem vantagens principalmente em relação às questões éticas e de segurança.

Para avaliar o efeito do transplante das NSC adultas em modelo de ELT, induzimos o SE em ratos utilizando pilocarpina acrescida de cloreto de lítio e transplantamos as células por via intravenosa logo após a indução (durante a fase aguda). O resultado obtido das induções foi que 62% dos ratos entraram em crise Racine VI ou V e que destes 11% morreram. O resultado está de acordo com a literatura apesar de termos observado uma mortalidade mais baixa (ANDRE et al., 2001; ARISI e GARCIA-CAIRASCO, 2007; OKAMOTO et al., 2010).

Aplicar um agente terapêutico na fase aguda da ELT é útil para analisar efeitos anti-epileptogênicos da terapia e para desenvolver uma estratégia de pré-tratamento que diminua ou previna o desenvolvimento da epilepsia crônica após injúria no hipocampo. Porém, para o estudo ser relevante para o paciente, que já possui uma epilepsia crônica bem estabelecida, inclusive com problemas cognitivos, é importante ver o efeito da terapia na fase crônica do modelo animal (SHETTY, 2012). Devido ao fato das modificações no microambiente que vão levar à epilepsia ocorrer na fase aguda, acreditamos que transplantar as células nessa fase possa nos dar informações mais concretas sobre os mecanismos de ação das mesmas. Além disso, trabalhar nessa fase do modelo é mais rápido e menos custoso já que não há a necessidade de realizar testes que comprovem a presença de CER nos animais.

A via de administração das células escolhida no estudo foi a intravenosa, pela veia da cauda. Segundo Martino (2006), a via de administração depende do tipo de lesão no SNC. Quando há uma lesão focal como no caso de trauma raquimedular ou doença de Parkinson, o transplante direto no local da lesão é uma boa alternativa. Em lesões multifocais, como esclerose múltipla e epilepsia, o transplante via venoso seria a melhor forma, também pelo fato das células terem capacidade de migrar para os sítios de lesão e passar pela BHE para o parênquima cerebral lesionado através de moléculas de adesão como o CD44, integrinas como as $\alpha 4$ e $\beta 1$ e receptores de quimiocinas como CCR1, CCR2, CCR5, CXCR3 e CXCR4 (MARTINO; PLUCHINO, 2006). Em contrapartida, é descrito na literatura que, no caso da epilepsia, apesar de haver uma quebra da BHE, poucos leucócitos circulantes passam para o parênquima cerebral, havendo um acúmulo desses no espaço perivascular, onde secretam fatores que vão ter papel importante no processo epileptogênico (MARCHI et al., 2011). Em concordância, De feo e colaboradores discutem o fato das NSC transplantadas formarem na região perivascular um nicho que recapitula o microambiente da SVZ chamado de nicho perivascular ectópico atípico. Nessa área do cérebro, as NSC permanecem indiferenciadas, interagem com, leucócitos circulantes, células endoteliais, astrócitos e micróglia e secretam moléculas como BMP4, noggin, Notch, Jagged e Sonic Hedgehog (PLUCHINO et al., 2010) (DE FEO et al., 2012). Apesar disso, após serem transplantadas via venosa, as NSC foram capazes de entrar no sítio de lesão em modelos de esclerose múltipla (PLUCHINO et al., 2003), trauma raquimedular (FUJIWARA et al., 2004), isquemia cerebral (CHU et al., 2003) e também de epilepsia (CHU et al., 2004).

De fato, quando se trabalha com terapia celular, um dos principais pontos de avaliação é a migração das células ao local da lesão. O fato das células terem sido transduzidas para expressar GFP nos permite rastrear elas após o transplante. Foi observada a presença de células nos baços dos animais transplantados, mostrando que as células injetadas de fato atingiram a circulação. Apesar disso, não foram encontradas células em nenhum dos cérebros analisados e apenas em um dos pulmões. Por se tratar de um transplante xenogênico, questões envolvendo rejeição celular são pertinentes. Porém, em um estudo do nosso grupo, usando a mesma via de transplante e modelo experimental em rato, observou-se o aparecimento de célula mononuclear de camundongo no hipocampo 1, 2, 3, 5, 10 e 120 dias após o transplante (COSTA-FERRO et al., 2010). Chu e colaboradores (2004) transplantaram NSC fetais humanas em ratos submetidos ao SE por via intravenosa e

também observaram a presença dessas células no hipocampo 6 semanas após o transplante (CHU et al., 2004).

Diversos estudos onde há o transplante de NSC por via intravenosa demonstram a presença das células transplantadas no cérebro (PLUCHINO et al., 2005; LEE et al., 2008; BACIGALUPPI et al., 2009). Em contrapartida, Einstein e colaboradores (2007) transplantaram NSC de camundongos recém-nascidos em um modelo de encefalomielite autoimune em camundongos e não observaram a presença de células transplantadas no cérebro em nenhum dos pontos avaliados (2, 8, 24 e 72 h, 7 e 40 dias). Foram observadas células no baço até o tempo de 24 h e no linfonodo até o tempo de 72 h. Apesar disso, o transplante diminuiu a lesão e inflamação no cérebro (EINSTEIN et al., 2007).

Ao se utilizar modelos animais de ELT, um dos primeiros experimentos a serem realizados é a quantificação da perda neuronal, já que esse é uma das principais alterações características da doença. Neurônios presentes em cortes equidistantes do hipocampo corados com Nissl foram quantificados e analisados, por volume de tecido. Nos dois pontos de eutanásia (24 h e 12 dias) e nas duas áreas do hipocampo (CA1 e CA3) estudados, não houve diferença estatística entre o grupo epilético tratado e não tratado, mostrando que as NSC não foram capazes de proteger contra a perda neuronal. Os resultados obtidos estão de acordo com o observado por Chu e colaboradores (2004), que também utilizaram a via venosa para administração das NSC na fase aguda induzida por pilocarpina em ratos. Eles observaram que, apesar das células terem sido encontradas no cérebro, não houve nenhuma proteção contra a perda neuronal em CA1, CA3 e no hilo do giro dentado 42 dias após o SE (CHU et al., 2004). Em contrapartida, Miltiadous e colaboradores (2013) observaram que, após o transplante de NSC diretamente no hipocampo por estereotaxia, em modelo agudo de ELT induzido por ácido kaínico, houve uma proteção significativa contra a perda neuronal, principalmente na área CA3 do hipocampo (MILTIADOUS et al., 2013). Os resultados sugerem que, ao menos em relação à proteção contra morte neuronal, uma presença maciça de NSC (provindas de um transplante *in situ*) é necessária.

Apesar do caráter imunossupressor das NSC e da ELT ser considerada uma doença imunológica crônica, não há estudos observando o efeito das NSC transplantadas sobre a inflamação em modelos animais de epilepsia. Dessa forma, analisamos os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 e anti-inflamatória IL-10 nos soros e nos cérebros dos animais transplantados e não transplantados 24 horas após o transplante. Realizamos as análises somente nesse ponto de eutanásia por já estar descrito que a expressão de citocinas

no cérebro atingem um pico entre 6 e 24 horas após a indução do modelo (DE SIMONI et al., 2000). O resultado do ELISA no cérebro demonstrou que a terapia diminuiu o nível de IL-1 β no cérebro, mas não tem efeito significativo sobre os níveis de IL-6. Não houve diferenças nos níveis de IL-10 no cérebro e das citocinas no soro entre os grupos normais e epiléticos. Esses resultados indicam que as NSC transplantadas, apesar de não migrarem e não protegerem contra perda neuronal, elas possuem um efeito imunomodulador.

A IL-1 β é uma das citocinas mais importantes na fisiopatologia da ELT (VEZZANI e BARAM, 2007;VEZZANI et al., 2011). Já foi descrito que ela contribui para ocorrência de danos neuronais e promove aumento da excitabilidade neuronal, quebra da BHE e aumento de infiltrado inflamatório no SNC (VEZZANI e BARAM, 2007). Em outro estudo realizado pelo nosso grupo, foi observado que a administração de células mononucleares de medula óssea diminui também a produção de IL-1 β , além de outras citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6) e aumenta a citocina anti-inflamatória IL-10 no cérebro (análise de expressão gênica) em um modelo crônico de ELT em rato. Foi observada também uma diminuição da concentração sérica de IL-1 β e TNF- α e aumento da concentração de IL-10 (COSTA-FERRO et al., 2012). Estudos que bloquearam a formação da IL-1 β através da inibição da enzima convertora de IL-1 (RAVIZZA et al., 2006) ou super-expressaram um antagonista dessa citocina (IL-1RA) (VEZZANI et al., 2000), mostraram efeitos anticonvulsivantes, realçando o valor terapêutico em diminuir os níveis de IL-1 β na ELT.

Para analisar o efeito imunomodulatório das NSC *in vitro*, foram realizados ensaios de linfoproliferação. As NSC inibiram a proliferação de esplenócitos de maneira concentração-dependente. Quando co-cultivadas em uma proporção de até 10 vezes mais esplenócitos, elas foram capazes de reduzir, de maneira significativa, a incorporação de ³H-timidina pelos esplenócitos. O resultado corrobora com os dados da literatura de que as NSC possuem efeitos imunossupressores (BEN-HUR, 2008; DE FEO et al., 2012; KOKAIA et al., 2012). De fato, Einstein e colaboradores (2007) co-cultivaram NSC com células do linfonodo estimuladas por concanavalina A e observaram que as NSC inibiram a proliferação das células do linfonodo também de maneira concentração-dependente, sendo o efeito observado até quando uma razão de NSC/células do linfonodo de 1:80 foi testada. O co-cultivo em razão 1:8 reduziu a proliferação em 95% em relação à cultura das células do linfonodo sem NSC (EINSTEIN et al., 2007). Por outro lado, Pluchino e colaboradores (2009) observaram que o efeito imunomodulador das NSC sobre células mononucleares de

sangue periférico ocorreu somente até a co-cultura com razão 1:4 (NSC/ mononucleares) (PLUCHINO et al., 2009)

Análises futuras incluem avaliar o transplante das células diretamente no hipocampo através de estereotaxia, comparando os resultados com os obtidos pela administração intravenosa, tanto em ratos quanto em camundongos epiléticos, para evitar a questão da rejeição celular existente em xenotransplantes. Além disso, uma análise mais profunda acerca do papel das NSC transplantadas na neuroinflamação persistente no modelo de ELT, observando por exemplo níveis de neurotrofinas e citocinas pró- e anti-inflamatórias, poderá contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos de ações dessas células no SNC. Apesar de estudos mostrarem efeitos positivos das NSC em desordens do SNC, o comportamento delas frente ao estímulo de lesão e a interação delas com células do sistema imune e residentes do SNC, como astrócitos e micróglia, ainda não estão claros. Visando ao possível uso dessas células na clínica, é essencial a realização de estudos que foquem nos mecanismos de ação, eficácia terapêutica e a segurança dessas células, observando, ao mesmo tempo, quais as melhores condições de transplante como o tipo celular usado, as vias de administração e o estágio da doença no momento da terapia.

7 CONCLUSÃO

- As NSC cultivadas no nosso laboratório possuem características fenotípicas condizentes com a literatura e possuem capacidade de se diferenciar em neurônios e astrócitos.
- Apesar da presença de alterações cromossômicas, não houve a formação de tumor *in vivo*, sugerindo que as células são seguras para serem usadas em transplante celular.
- As NSC inibiram a proliferação de esplenócitos *in vitro*, confirmando o seu potencial imunomodulador.
- Após transplantadas pela veia da cauda em modelo de epilepsia em rato, as NSC não foram capazes de migrar para o cérebro.
- A terapia não protegeu os animais contra a perda neuronal induzida pela aplicação do lítio-pilocarpina.
- A terapia diminuiu os níveis da citocina IL-1 β no cérebro, mas sem efeito significativo sobre os níveis de IL-6.

REFERÊNCIAS

ABDANIPOUR, A.; TIRAIHI, T.; MIRNAJAFI-ZADEH, J. Improvement of the pilocarpine epilepsy model in rat using bone marrow stromal cell therapy. **Neurol. Res.**, v. 33, n. 6, p. 625-632, 2011.

ABREU, I. N. et al. Cell suspension as a tool to study the biosynthesis of pilocarpine in *Jaborandi*. **Plant Biol.** (Stuttg), v. 9, n. 6, p. 793-799, 2007.

AL-OTAIBI, F. A.; HAMANI, C.; LOZANO, A. M. Neuromodulation in epilepsy. **Neurosurgery**, v. 69, n. 4, p. 957-979, 2011. discussion 979.

AMARIGLIO, N. et al. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. **PLoS Med**, v. 6, n. 2, p. e1000029, 2009.

ANDRE, V. et al. Vigabatrin protects against hippocampal damage but is not antiepileptogenic in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Res.**, v. 47, n. 1-2, p. 99-117, 2001.

ANDRES, R. H. et al. Human neural stem cells enhance structural plasticity and axonal transport in the ischaemic brain. **Brain**, v. 134, n. Pt 6, p. 1777-1789, 2011.

ARAKI, T. et al. Efficacy of dexamethasone on cerebral swelling and seizures during subdural grid eeg recording in children. **Epilepsia**, v. 47, n. 1, p. 176-180, 2006.

ARISI, G. M.; GARCIA-CAIRASCO, N. Doublecortin-positive newly born granule cells of hippocampus have abnormal apical dendritic morphology in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Brain Res.**, v. 1165, n., 24, p. 126-134, 2007.

BABB, T. L.; BROWN, W. J. Neuronal, dendritic, and vascular profiles of human temporal lobe epilepsy correlated with cellular physiology in vivo. **Adv. Neurol.**, v. 44, n., p. 949-966, 1986.

BACIGALUPPI, M. et al. Delayed post-ischaemic neuroprotection following systemic neural stem cell transplantation involves multiple mechanisms. **Brain**, v. 132, n. Pt 8, p. 2239-2251, 2009.

BANERJEE, P. N.; FILIPPI, D.; ALLEN HAUSER, W. The descriptive epidemiology of epilepsy-a review. **Epilepsy Res.**, v. 85, n. 1, p. 31-45, 2009.

BARMINKO, J. et al. Encapsulated mesenchymal stromal cells for in vivo transplantation. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 108, n. 11, p. 2747-2758, 2011.

BEN-ARI, Y.; DUDEK, F. E. Primary and secondary mechanisms of epileptogenesis in the temporal lobe: There is a before and an after. **Epilepsy Curr.**, v. 10, n. 5, p. 118-125, 2010.

BEN-DOR, I.; FUCHS, S.; KORNOWSKI, R. Potential hazards and technical considerations associated with myocardial cell transplantation protocols for ischemic myocardial syndrome. **J Am. Coll. Cardiol.**, v. 48, n. 8, p. 1519-1526, 2006.

BEN-HUR, T. Immunomodulation by neural stem cells. **J. Neurol. Sci.**, v. 265, n. 1-2, 15, p. 102-104, 2008.

BERG, A. T. et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ilae commission on classification and terminology, 2005-2009. **Epilepsia**, v. 51, n. 4, p. 676-685, 2010.

BINDER, L. M.; SALINSKY, M. C. Psychogenic nonepileptic seizures. **Neuropsychol. Rev.**, v. 17, n. 4, p. 405-412, 2007.

BOVOLENTA, R. et al. Hippocampal fgf-2 and bdnf overexpression attenuates epileptogenesis-associated neuroinflammation and reduces spontaneous recurrent seizures. **J. Neuroinflammation**, v. 7, p. 81, 2010.

BRAZDA, N.; MULLER, H. W. Pharmacological modification of the extracellular matrix to promote regeneration of the injured brain and spinal cord. **Prog. Brain Res.**, v. 175, n., p. 269-281, 2009.

BRUSTLE, O. et al. In vitro-generated neural precursors participate in mammalian brain development. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, n. 26, p. 14809-14814, 1997.

CAPLAN, A. I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. **J. Cell Physiol.**, v. 213, n. 2, p. 341-347, 2007.

CAVALHEIRO, E. A. et al. Long-term effects of pilocarpine in rats: Structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. **Epilepsia**, v. 32, n. 6, p. 778-782, 1991.

CHONG, Z. Z. et al. Shedding new light on neurodegenerative diseases through the mammalian target of rapamycin. **Prog. Neurobiol.**, v. 99, n. 2, p. 128-148, 2012.

CHU, K. et al. Human neural stem cells can migrate, differentiate, and integrate after intravenous transplantation in adult rats with transient forebrain ischemia. **Neurosci. Lett.**, v. 343, n. 2, p. 129-133, 2003.

CHU, K. et al. Human neural stem cell transplantation reduces spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus in adult rats. **Brain Res.**, v. 1023, n. 2, p. 213-221, 2004.

CLIFFORD, D. B. et al. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. **Neuroscience**, v. 23, n. 3, p. 953-968, 1987.

COSTA-FERRO, Z. S. et al. Transplantation of bone marrow mononuclear cells decreases seizure incidence, mitigates neuronal loss and modulates pro-inflammatory cytokine production in epileptic rats. **Neurobiol. Dis.**, v. 46, n. 2, p. 302-313, 2012.

COSTA-FERRO, Z. S. et al. Prevention of seizures and reorganization of hippocampal functions by transplantation of bone marrow cells in the acute phase of experimental epilepsy. **Seizure**, v. 19, n. 2, p. 84-92, 2010.

CRESPEL, A. et al. Inflammatory reactions in human medial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. **Brain Res**, v. 952, n. 2, p. 159-169, 2002.

CURIA, G. et al. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **J. Neurosci. Methods**, v. 172, n. 2, p. 143-157, 2008.

CUSIMANO, M. et al. Transplanted neural stem/precursor cells instruct phagocytes and reduce secondary tissue damage in the injured spinal cord. **Brain**, v. 135, n. Pt 2, p. 447-460, 2012.

DAS, N.; DHANAWAT, M.; SHRIVASTAVA, S. K. An overview on antiepileptic drugs. **Drug Discov. Ther.**, v. 6, n. 4, p. 178-193, 2012.

DE FEO, D. et al. Neural stem cell transplantation in central nervous system disorders: From cell replacement to neuroprotection. **Curr. Opin. Neurol.**, v. 25, n. 3, p. 322-333, 2012.

DE LANEROLLE, N. C.; LEE, T. S. New facets of the neuropathology and molecular profile of human temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Behav.**, v. 7, n. 2, p. 190-203, 2005.

DE SIMONI, M. G. et al. Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. **Eur. J. Neurosci.**, v. 12, n. 7, p. 2623-2633, 2000.

DEDEURWAERDERE, S. et al. Finding a better drug for epilepsy: Antiinflammatory targets. **Epilepsia**, v. 53, n. 7, p. 1113-1118, 2012.

DUA, T. et al. Epilepsy care in the world: Results of an ilae/ibe/who global campaign against epilepsy survey. **Epilepsia**, v. 47, n. 7, p. 1225-1231, 2006.

DUNCAN, J. S. et al. Adult epilepsy. **Lancet**, v. 367, n. 9516, p. 1087-1100, 2006.

EINSTEIN, O. et al. Neural precursors attenuate autoimmune encephalomyelitis by peripheral immunosuppression. **Ann. Neurol.**, v. 61, n. 3, p. 209-218, 2007.

EINSTEIN, O. et al. Transplanted neural precursors enhance host brain-derived myelin regeneration. **J. Neurosci.**, v. 29, n. 50, p. 15694-15702, 2009.

FERNANDES J, S. J. Epidemiologia e história natural das epilepsias. In: (Ed.). **Fundamentos neurobiológicos das epilepsias. Aspectos clínicos e cirúrgicos**: São Paulo: Lemos, 1998. p.3–20.

FISHER, R. S. et al. Epileptic seizures and epilepsy: Definitions proposed by the international league against epilepsy (ilae) and the international bureau for epilepsy (ibe). **Epilepsia**, v. 46, n. 4, p. 470-472, 2005.

FORONI, C. et al. Resilience to transformation and inherent genetic and functional stability of adult neural stem cells ex vivo. **Cancer Res.**, v. 67, n. 8, p. 3725-3733, 2007.

FRIEDMAN, A.; KAUFER, D.; HEINEMANN, U. Blood-brain barrier breakdown-inducing astrocytic transformation: Novel targets for the prevention of epilepsy. **Epilepsy Res.**, v. 85, n. 2-3, p. 142-149, 2009.

FUJIWARA, Y. et al. Intravenously injected neural progenitor cells of transgenic rats can migrate to the injured spinal cord and differentiate into neurons, astrocytes and oligodendrocytes. **Neurosci. Lett.**, v. 366, n. 3, p. 287-291, 2004.

GAGE, F. H. Mammalian neural stem cells. **Science**, v. 287, n. 5457, p. 1433-1438, 2000.

GIL-PEROTIN, S.; ALVAREZ-BUYLLA, A.; GARCIA-VERDUGO, J. M. Identification and characterization of neural progenitor cells in the adult mammalian brain. **Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.**, v. 203, n., p. 1-101, ix, 2009.

GOLEBIEWSKA, A. et al. Critical appraisal of the side population assay in stem cell and cancer stem cell research. **Cell Stem Cell**, v. 8, n. 2, p. 136-147, 2011.

GROPP, M. et al. Standardization of the teratoma assay for analysis of pluripotency of human es cells and biosafety of their differentiated progeny. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e45532, 2012.

HAMANI, C.; MELLO, L. E. Status epilepticus induced by pilocarpine and picrotoxin. **Epilepsy Res.**, v. 28, n. 1, p. 73-82, 1997.

HAMILTON, S. E. et al. Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent m current regulation and seizure activity in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, n. 24, p. 13311-13316, 1997.

HARRIS, V. K. et al. Clinical and pathological effects of intrathecal injection of mesenchymal stem cell-derived neural progenitors in an experimental model of multiple sclerosis. **J. Neurol. Sci.**, v. 313, n. 1-2, p. 167-177, 2012.

HARTMAN, N. W. et al. Cxcl12-mediated guidance of migrating embryonic stem cell-derived neural progenitors transplanted into the hippocampus. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e15856, 2010.

HATTIANGADY, B.; SHETTY, A. K. Neural stem cell grafting in an animal model of chronic temporal lobe epilepsy. In: **Curr Protoc Stem Cell Biol**, 2011. Chapter 2, Unit2D 7,

HEIDA, J. G.; PITTMAN, Q. J. Causal links between brain cytokines and experimental febrile convulsions in the rat. **Epilepsia**, v. 46, n. 12, p. 1906-1913, 2005.

HEISS, J. D. et al. Local distribution and toxicity of prolonged hippocampal infusion of muscimol. **J. Neurosurg.**, v. 103, n. 6, p. 1035-1045, 2005.

HONCHAR, M. P.; OLNEY, J. W.; SHERMAN, W. R. Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats. **Science**, v. 220, n. 4594, p. 323-325, 1983.

HUGHES, P.; YOUNG, D.; DRAGUNOW, M. Mk-801 sensitizes rats to pilocarpine induced limbic seizures and status epilepticus. **Neuroreport**, v. 4, n. 3, p. 314-316, 1993.

HUICONG, K. et al. The imbalanced expression of adenosine receptors in an epilepsy model corrected using targeted mesenchymal stem cell transplantation. **Mol. Neurobiol.**, Jun 20, 2013.

HULSPAS, R.; QUESENBERRY, P. J. Characterization of neurosphere cell phenotypes by flow cytometry. **Cytometry**, v. 40, n. 3, p. 245-250, 2000.

HUNT, R. F. et al. Gaba progenitors grafted into the adult epileptic brain control seizures and abnormal behavior. **Nat. Neurosci.**, v. 16, n. 6, p. 692-697, 2013.

ILAE. Guidelines for epidemiologic studies on epilepsy. Commission on epidemiology and prognosis, international league against epilepsy. **Epilepsia**, v. 34, n. 4, p. 592-596, 1993.

JACKSON, K. A.; MI, T.; GOODELL, M. A. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, n. 25, p. 14482-14486, 1999.

JUNG, K. H. et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, inhibits the altered hippocampal neurogenesis with attenuation of spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus. **Neurobiol. Dis.**, v. 23, n. 2, p. 237-246, 2006.

KANTER-SCHLIFKE, I. et al. Seizure suppression by gdnf gene therapy in animal models of epilepsy. **Mol. Ther.**, v. 15, n. 6, p. 1106-1113, 2007.

KAWASAKI-OYAMA, R. S. P.-B., E.C; FILHO; M. A; BRAILE, D.M; GOLONI-BERTOLLO, E.M. Cardiomioplastia celular. **Arq. Ciên. Saúde**, v. 4, p. 266-271, 2004.

KIM, M.; MORSHEAD, C. M. Distinct populations of forebrain neural stem and progenitor cells can be isolated using side-population analysis. **J. Neurosci.**, v. 23, n. 33, p. 10703-10709, 2003.

KOKAIA, Z. et al. Cross-talk between neural stem cells and immune cells: The key to better brain repair? **Nat. Neurosci.**, v. 15, n. 8, p. 1078-1087, 2012.

KRAUSE, D. S. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Gene Ther**, v. 9, n. 11, p. 754-758, 2002.

LEE, M. W. et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cell gene expression patterns vary with culture conditions. **Blood Res.**, v. 48, n. 2, p. 107-114, 2013.

LEE, S. T. et al. Anti-inflammatory mechanism of intravascular neural stem cell transplantation in haemorrhagic stroke. **Brain**, v. 131, n. Pt 3, p. 616-629, 2008.

LEHMANN, T. N. et al. Fluorescent tracer in pilocarpine-treated rats shows widespread aberrant hippocampal neuronal connectivity. **Eur. J. Neurosci.**, v. 14, n. 1, p. 83-95, 2001.

LEND AHL, U.; ZIMMERMAN, L. B.; MCKAY, R. D. Cns stem cells express a new class of intermediate filament protein. **Cell**, v. 60, n. 4, p. 585-595, 1990.

LINARD, B. et al. Ketogenic diet exhibits neuroprotective effects in hippocampus but fails to prevent epileptogenesis in the lithium-pilocarpine model of mesial temporal lobe epilepsy in adult rats. **Epilepsia**, v. 51, n. 9, p. 1829-1836, 2010.

LO, B.; PARHAM, L. Ethical issues in stem cell research. **Endocrinol. Rev.**, v. 30, n. 3, p. 204-213, 2009.

LONGO, B. M.; MELLO, L. E. Blockade of pilocarpine- or kainate-induced mossy fiber sprouting by cycloheximide does not prevent subsequent epileptogenesis in rats. **Neurosci. Lett.**, v. 226, n. 3, p. 163-166, 1997.

LOSCHER, 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 Res.**, v. 50, n. 1-2, p. 105-123, 2002.

_____. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Seizure**, v. 20, n. 5, p. 359-368, 2011.

LU, X. et al. Galr2-positive allosteric modulator exhibits anticonvulsant effects in animal models. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 107, n. 34, p. 15229-15234, 2010.

MAJORES, M. et al. Molecular neuropathology of temporal lobe epilepsy: Complementary approaches in animal models and human disease tissue. **Epilepsia**, v. 48 Suppl 2, n., p. 4-12, 2007.

MARCHI, N. et al. Antagonism of peripheral inflammation reduces the severity of status epilepticus. **Neurobiol. Dis.**, v. 33, n. 2, p. 171-181, 2009.

MARCHI, N. et al. The etiological role of blood-brain barrier dysfunction in seizure disorders. **Cardiovasc. Psych. Neurol.**, p. 482415, 2011.

MARGINEANU, D. G. et al. Effects of chronic treatment with levetiracetam on hippocampal field responses after pilocarpine-induced status epilepticus in rats. **Brain Res. Bull.**, v. 77, n. 5, p. 282-285, 2008.

MARTINO, G.; PLUCHINO, S. The therapeutic potential of neural stem cells. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 7, n. 5, p. 395-406, 2006.

MEDICINE, I. I. O. In: ENGLAND, M. J. et al. (Ed.). **Epilepsy across the spectrum: Promoting health and understanding**. (The national academies collection: Reports funded by national institutes of health). Washington, DC, 2012.

MELZI, R. et al. Co-graft of allogeneic immune regulatory neural stem cells (npc) and pancreatic islets mediates tolerance, while inducing npc-derived tumors in mice. **PLoS One**, v. 5, n. 4, p. e10357, 2010.

MILTIADOUS, P. et al. Subventricular zone-derived neural stem cell grafts protect against hippocampal degeneration and restore cognitive function in the mouse following intrahippocampal kainic acid administration. **Stem Cells Transl Med.**, v. 2, n. 3, p. 185-198, 2013.

MIURA, M. et al. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. **Stem Cells**, v. 24, n. 4, p. 1095-1103, 2006.

MLODZIKOWSKA-ALBRECHT, J.; STEINBORN, B.; ZAROWSKI, M. Cytokines, epilepsy and epileptic drugs--is there a mutual influence? **Pharmacol. Rep.**, v. 59, n. 2, p. 129-138, 2007.

MOUTHON, M. A. et al. Neural stem cells from mouse forebrain are contained in a population distinct from the 'side population'. **J. Neurochem.**, v. 99, n. 3, p. 807-817, 2006.

MULLER, C. J. et al. Pilocarpine vs. Lithium-pilocarpine for induction of status epilepticus in mice: Development of spontaneous seizures, behavioral alterations and neuronal damage. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 619, n. 1-3, p. 15-24, 2009.

NAEGELE, J. R. M., X. Gene and stem cell therapies for treating epilepsy. In: RHO JM, S. R., STAFSTROM CE (Ed.). **Epilepsy: Mechanisms, models, and translational perspectives**. Dekker M, Inc, CRC Press, 2010

NG, W. H.; VALIANTE, T. Lateral temporal lobectomy with hippocampal disconnection as an alternative surgical technique for temporal lobe epilepsy. **J. Clin. Neurosci.**, v. 17, n. 5, p. 634-635, 2010.

NGUGI, A. K. et al. Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: A meta-analytic approach. **Epilepsia**, v. 51, n. 5, p. 883-890, 2010.

NGUYEN, H. N. et al. Lrrk2 mutant ipsc-derived da neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. **Cell Stem Cell**, v. 8, n. 3, p. 267-280, 2011.

O'DELL, C. M. et al. Understanding the basic mechanisms underlying seizures in mesial temporal lobe epilepsy and possible therapeutic targets: A review. **J. Neurosci. Res.**, v. 90, n. 5, p. 913-924, 2012.

OKAMOTO, O. K. et al. Whole transcriptome analysis of the hippocampus: Toward a molecular portrait of epileptogenesis. **BMC Genomics**, v. 11, p. 230, 2010.

OLIVER-DE LA CRUZ, J. A. A.-S. A. Neural stem cells and therapy. In: SUN, T. (Ed.). **Neural stem cells and therapy**: InTech. 2012. p.3-30

PANDOLFO, M. Genetics of epilepsy. **Semin. Neurol.**, v. 31, n. 5, p. 506-518, 2011.

PAPPA, K. I.; ANAGNOU, N. P. Novel sources of fetal stem cells: Where do they fit on the developmental continuum? **Regen. Med.**, v. 4, n. 3, p. 423-433, 2009.

PITKANEN, A.; SUTULA, T. P. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. **Lancet Neurol.**, v. 1, n. 3, p. 173-181, 2002.

PLUCHINO, S. et al. Remodelling the injured CNS through the establishment of atypical ectopic perivascular neural stem cell niches. **Arch. Ital. Biol.**, v. 148, n. 2, p. 173-183, 2010.

PLUCHINO, S. et al. Human neural stem cells ameliorate autoimmune encephalomyelitis in non-human primates. **Ann. Neurol.**, v. 66, n. 3, p. 343-354, 2009.

PLUCHINO, S. et al. Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. **Nature**, v. 422, n. 6933, p. 688-694, 2003.

PLUCHINO, S. et al. Neurosphere-derived multipotent precursors promote neuroprotection by an immunomodulatory mechanism. **Nature**, v. 436, n. 7048, p. 266-271, 2005.

PRICE, F. D. et al. Canonical Wnt signaling induces a primitive endoderm metastable state in mouse embryonic stem cells. **Stem Cells**, v. 31, n. 4, p. 752-764, 2012.

RACINE, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. **Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.**, v. 32, n. 3, p. 281-294, 1972.

RANSOHOFF, R. M.; CARDONA, A. E. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. **Nature**, v. 468, n. 7321, p. 253-262, 2010.

RAOL, Y. H.; BROOKS-KAYAL, A. R. Experimental models of seizures and epilepsies. **Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.**, v. 105, n., p. 57-82, 2012.

RAOL, Y. H. et al. Enhancing GABA_A receptor $\alpha 1$ subunit levels in hippocampal dentate gyrus inhibits epilepsy development in an animal model of temporal lobe epilepsy. **J. Neurosci.**, v. 26, n. 44, p. 11342-11346, 2006.

RAVIZZA, T. et al. Inactivation of caspase-1 in rodent brain: A novel anticonvulsive strategy. **Epilepsia**, v. 47, n. 7, p. 1160-1168, 2006.

REYNOLDS, B. A.; WEISS, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. **Science**, v. 255, n. 5052, p. 1707-1710, 1992.

ROPER, S. N.; STEINDLER, D. A. Stem cells as a potential therapy for epilepsy. **Exp. Neurol.**, v. 244, p. 59-66, 2013.

SANKAR, R. et al. Epileptogenesis during development: Injury, circuit recruitment, and plasticity. **Epilepsia**, v. 43 Suppl 5, p. 47-53, 2002.

SCHINDER, A. F.; GAGE, F. H. A hypothesis about the role of adult neurogenesis in hippocampal function. **Physiology**, v. 19, p. 253-261, 2004.

SCORZA, F. A. et al. The pilocarpine model of epilepsy: What have we learned? **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 81, n. 3, p. 345-365, 2009.

SHARMA, A. K. et al. Mesial temporal lobe epilepsy: Pathogenesis, induced rodent models and lesions. **Toxicol. Pathol.**, v. 35, n. 7, p. 984-999, 2007.

SHETTY, A. K. Neural stem cell therapy for temporal lobe epilepsy. In: NOEBELS, J. L. et al. (Ed.). **Jasper's basic mechanisms of the epilepsies**. Bethesda, MD, 2012.

_____. Progress in cell grafting therapy for temporal lobe epilepsy. **Neurotherapeutics**, v. 8, n. 4, p. 721-735, 2011.

SHETTY, A. K.; HATTIANGADY, B. Concise review: Prospects of stem cell therapy for temporal lobe epilepsy. **Stem Cells**, v. 25, n. 10, p. 2396-2407, 2007.

SHINNAR, S.; GLAUSER, T. A. Febrile seizures. **J. Child. Neurol.**, v. 17 Suppl 1, p. S44-52, 2002.

SISODIYA, S. Etiology and management of refractory epilepsies. **Nat. Clin. Pract. Neurol.**, v. 3, n. 6, p. 320-330, 2007.

SMOLDERS, I. et al. Nmda receptor-mediated pilocarpine-induced seizures: Characterization in freely moving rats by microdialysis. **Br. J. Pharmacol.**, v. 121, n. 6, p. 1171-1179, 1997.

SORENSEN, A. T.; KOKAIA, M. Novel approaches to epilepsy treatment. **Epilepsia**, v. 54, n. 1, p. 1-10, 2013.

SPENCER, S. S. Neural networks in human epilepsy: Evidence of and implications for treatment. **Epilepsia**, v. 43, n. 3, p. 219-227, 2002.

STEM CELL THERAPIES AS AN EMERGING PARADIGM IN STROKE, P. Stem cell therapies as an emerging paradigm in stroke (steps): Bridging basic and clinical science for cellular and neurogenic factor therapy in treating stroke. **Stroke**, v. 40, n. 2, p. 510-515, 2009.

STEWART, R. R. et al. Neural progenitor cells of the neonatal rat anterior subventricular zone express functional gaba(a) receptors. **J. Neurobiol.**, v. 50, n. 4, p. 305-322, 2002.

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

SWISTOWSKI, A. et al. Efficient generation of functional dopaminergic neurons from human induced pluripotent stem cells under defined conditions. **Stem Cells**, v. 28, n. 10, p. 1893-1904, 2010.

TAGA, T.; FUKUDA, S. Role of il-6 in the neural stem cell differentiation. **Clin. Rev. Allergy Immunol.**, v. 28, n. 3, p. 249-256, 2005.

TAKACS, E. et al. Matrix metalloproteinase-9 activity increased by two different types of epileptic seizures that do not induce neuronal death: A possible role in homeostatic synaptic plasticity. **Neurochem. Int.**, v. 56, n. 6-7, p. 799-809, 2010.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663-676, 2006.

TAKEBE, T. et al. Vascularized and functional human liver from an ipsc-derived organ bud transplant. **Nature**, v. 499, n. 7459, p. 481-484, 2013.

THIRABANJASAK, D.; TANTIWONGSE, K.; THORNER, P. S. Angiomyeloproliferative lesions following autologous stem cell therapy. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 21, n. 7, p. 1218-1222, 2010.

THOMSON, J. A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1145-1147, 1998.

TURSKI, W. A. et al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: Behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behav. Brain Res.**, v. 9, n. 3, p. 315-335, 1983.

UCCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, n. 9, p. 726-736, 2008.

VEZZANI, A.; BALOSSO, S.; RAVIZZA, T. The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy. **Brain Behav. Immun.**, v. 22, n. 6, p. 797-803, 2008.

VEZZANI, A.; BARAM, T. Z. New roles for interleukin-1 beta in the mechanisms of epilepsy. **Epilepsy Curr.**, v. 7, n. 2, p. 45-50, 2007.

VEZZANI, A. et al. The role of inflammation in epilepsy. **Nat. Rev. Neurol.**, v. 7, n. 1, p. 31-40, 2011.

VEZZANI, A.; GRANATA, T. Brain inflammation in epilepsy: Experimental and clinical evidence. **Epilepsia**, v. 46, n. 11, p. 1724-1743, 2005.

VEZZANI, A. et al. Powerful anticonvulsant action of il-1 receptor antagonist on intracerebral injection and astrocytic overexpression in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, n. 21, p. 11534-11539, 2000.

VUKICEVIC, V. et al. Genetic instability and diminished differentiation capacity in long-term cultured mouse neurosphere cells. **Mech. Ageing Dev.**, v. 131, n. 2, p. 124-132, 2010.

WAGERS, A. J.; WEISSMAN, I. L. Plasticity of adult stem cells. **Cell**, v. 116, n. 5, p. 639-648, 2004.

WALDAU, B. et al. Medial ganglionic eminence-derived neural stem cell grafts ease spontaneous seizures and restore gdnf expression in a rat model of chronic temporal lobe epilepsy. **Stem Cells**, v. 28, n. 7, p. 1153-1164, 2010.

WALTON, N. M. et al. Derivation and large-scale expansion of multipotent astroglial neural progenitors from adult human brain. **Development**, v. 133, n. 18, p. 3671-3681, 2006.

WATT, F. M.; HOGAN, B. L. Out of eden: Stem cells and their niches. **Science**, v. 287, n. 5457, p. 1427-1430, 2000.

WIESER, H. G.; EPILEPSY, I. C. O. N. O. Ilae commission report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. **Epilepsia**, v. 45, n. 6, p. 695-714, 2004.

WIRTH, E. D., 3RD et al. Feasibility and safety of neural tissue transplantation in patients with syringomyelia. **J. Neurotrauma**, v. 18, n. 9, p. 911-929, 2001.

XAPELLI, S. et al. Neuropeptide y as an endogenous antiepileptic, neuroprotective and pro-neurogenic peptide. **Recent Pat CNS Drug Discov.**, v. 1, n. 3, p. 315-324, 2006.

YABE, J. T. et al. Regulation of the transition from vimentin to neurofilaments during neuronal differentiation. **Cell Motil. Cytoskeleton**, v. 56, n. 3, p. 193-205, 2003.

YANG, T.; ZHOU, D.; STEFAN, H. Why mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis is progressive: Uncontrolled inflammation drives disease progression? **J. Neurol. Sci.**, v. 296, n. 1-2, p. 1-6, 2010.

YIN, P. et al. Matrix metalloproteinase-9 may be a potential therapeutic target in epilepsy. **Med. Hypotheses**, v. 76, n. 2, p. 184-186, 2011.

YOHN, D. C. et al. Transplanted mouse embryonic stem-cell-derived motoneurons form functional motor units and reduce muscle atrophy. **J. Neurosci.**, v. 28, n. 47, p. 12409-12418, 2008.

YOUNG, D.; DURING, M. J. Using the immune system to target epilepsy. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 548, p. 134-144, 2004.

ZAGO, M. A. **Células-tronco: Origens e propriedades**. In: ATHENEU, S. P. (Ed.), 2006. p.21-34

ZAGO, M. A. Terapia com células-tronco. Fundamentos, oportunidades e obstáculos. In: (Ed.): **Rev. Soc. Bras. Hipert.**, v. 8, p.145-150, 2005.

ZHANG, X. A. J., G. Neural stem cells and therapy. In: SUN, T. (Ed.). **Neural Stem Cells and Therapy**: InTech, 2012. p.31-58

ZHAO, Y. et al. Targeted suicide gene therapy for glioma using human embryonic stem cell-derived neural stem cells genetically modified by baculoviral vectors. **Gene Ther.**, v. 19, n. 2, p. 189-200, 2012.