



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

MARCOS MAURÍCIO TOSTA LEAL

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIINFLAMATÓRIO DAS
CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA EM
CAMUNDONGOS COM EPILEPSIA INDUZIDA POR
CLORETO DE PILOCARPINA**

Salvador, BA

2011

MARCOS MAURÍCIO TOSTA LEAL

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIINFLAMATÓRIO DAS
CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA EM
CAMUNDONGOS COM EPILEPSIA INDUZIDA POR
CLORETO DE PILOCARPINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dra. Milena Botelho Pereira Soares
Co-orientador: Dra. Zaquer Suzana Costa-Ferro

Feira de Santana, BA

2011

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio e força em todos os momentos do desenvolvimento desta importante etapa da minha vida. Agradeço especialmente a meu pai, minha mãe e minha irmã, pessoas inacreditáveis que sempre acreditaram em mim em todos os momentos da minha vida, que dedicaram todo o amor, admiração, carinho e compreensão durante a minha formação pessoal e profissional.

À professora Dra. Milena Soares, pela orientação e a oportunidade de poder desenvolver este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade estadual de Feira de Santana- Bahia, pelo apoio acadêmico e pela oportunidade de desenvolvimento deste projeto. Agradeço especialmente ao Helton Carneiro pela prestatividade e paciência.

Ao Dr. Ricardo Ribeiro, por me aceitar em seu laboratório durante todo este período, possibilitando o meu ingresso na pós-graduação e fornecendo o suporte necessário ao desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Zaquer Costa Ferro, certamente a peça principal da minha formação durante todo este período, até mesmo antes do início do mestrado. Agradeço por ser sempre muito mais que uma simples co-orientadora, sendo quase uma mãe adotiva durante estes anos de convivência, amizade e intermináveis experimentos.

Ao Thiago Carvalho, pela amizade e eterna parceria na realização deste trabalho como estudante de iniciação científica, desenvolvendo com brilhantismo este papel. A sua eterna flexibilidade para estar presente em todas as etapas do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Bruno Solano, pelo incondicional apoio espiritual e principalmente experimental deste trabalho, apresentando sempre um pensamento positivo e milhões de soluções nas horas mais difíceis.

À Dra. Carla Kaneto, pela sua paciência oriental na realização dos infindáveis PCRs necessários neste estudo.

Ao Dr Adriano Alcântara, pelas análises sorológicas realizadas no bioplex e pelos grandes conselhos e apoio nesta reta final.

Ao Cássio, pela grande ajuda e participação nos experimentos de transplante celular durante todas as etapas deste trabalho.

À Dra. Juliana Vasconcelos, pela grande ajuda e paciência com as técnicas de ELISA e TÚNEL.

À Cristina, Paula, Fernanda, Renato e Fagner, pela compreensão e fornecimento de animais, possibilitando o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do CBTC e do LETI, pelo carinho e convívio maravilhoso durante todo este período, tornando as dificuldades encontradas plenamente superáveis. Agradeço especialmente a Carine Machado, Edlúcia Santos e Roseane Benta pela grande amizade e eterno apoio em todos os momentos.

Ao Juracy Barbosa, pelos ensinamentos que revelaram o amor pela pesquisa na minha primeira iniciação científica possibilitando a minha chegada até o mestrado.

A CAPES pelo apoio financeiro.

"Obstáculos são as coisas assustadoras que encontra quando desvia os olhos do seu sonho" - Henry Ford

RESUMO

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é o tipo de epilepsia mais frequente, representando aproximadamente 30% dos casos em adultos e tem como manifestação típica, a crise parcial complexa. Este tipo de acometimento é frequentemente refratário ao tratamento medicamentoso e os principais sintomas são gerados, predominantemente, pelo acometimento das estruturas mediais do lobo temporal. Recentemente, alguns genes ligados a processos inflamatórios, como o da interleucina-1 beta (IL-1 β), têm sido implicados na ELT em humanos e em modelos animais. Por sua vez, as células-tronco representam uma esperança de tratamento das epilepsias, visto que possuem grande capacidade de proliferação, diferenciação, regeneração de tecidos e imunomodulação. Nosso estudo apresentou como principais objetivos: avaliar o potencial modulador inflamatório das células mononucleares de medula óssea e o efeito destas terapias celulares sobre a perda neuronal no modelo de epilepsia em camundongos induzidos por pilocarpina. Após a indução do modelo (*status epilepticus*-SE), os animais foram transplantados com células mononucleares de medula óssea íntegras e lisadas, obtidas de camundongos C57BL/6 transgênicos para a GFP. Os animais foram sacrificados nos períodos de 12 h, 24 h e 7 dias após o transplante. Foram avaliadas as expressões de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias no tecido cerebral. Nossos resultados demonstraram que ambas as terapias celulares empregadas foram capazes de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF α , IL-1 β e IL-6), assim como estimular uma resposta anti-inflamatória com elevação da produção de IL-10 e TGF β . Observamos também que os animais transplantados com células de medula óssea apresentaram uma menor perda neuronal nas regiões hipocâmpais de CA1 e CA3. Acreditamos que os resultados obtidos neste estudo possam contribuir para o entendimento de um possível mecanismo de ação destas células no modelo experimental de epilepsia.

Palavras-chave: epilepsia, pilocarpina, neuroinflamação, perda neuronal, célula mononuclear de medula óssea.

ABSTRACT

The temporal lobe epilepsy (TLE) is the most frequent form of epilepsy, standing for approximately 30% of cases in adults and the complex partial seizures is its typical manifestation. This type of involvement is often refractory to drug treatment and the main symptoms are generated predominantly by the involvement of the medial temporal lobe structures. Recently, some genes related to inflammatory processes, such as interleukin-1 beta (IL-1 β), have been implicated in TLE in humans and in animal models. Stem cells represent a hope for epilepsy treatment, as they have great capacity for proliferation, differentiation, tissue regeneration and immunomodulation. Our main study goals were to assess the potential of bone marrow mononuclear cells (BMMC) on the control of inflammatory responses and their effects on the cellular model of neuronal loss in pilocarpine-induced epilepsy in mice. After being induced epilepsy model (*status epilepticus* - SE), animals were transplanted with live and lysed BMMC obtained from C57BL/6 GFP transgenic mice. Animals were euthanized at 12 h, 24 h and 7 days after transplantation. We evaluated the pro-inflammatory and anti-inflammatory expression profile on serum samples and brain tissue. Our results demonstrated that both cell therapies employed were able to reduce the pro-inflammatory response as well as stimulate an anti-inflammatory response. Based on neuronal quantification we noted that transplanted animals showed a smaller loss of hippocampal neurons in regions CA1 and CA3. We believe the results obtained in this study may contribute to the understanding of a mechanism of action of these cells in an experimental model of epilepsy.

Keywords: epilepsy, pilocarpine, neuroinflammation, neuronal loss, bone marrow mononuclear cells.

LISTA DE ABREVIATURAS

- BHE: Barreira hemato-encefálica
- CD: (Cluster of differentiation) Cluster de diferenciação
- CER: Crises epilépticas recorrentes
- DAE: Drogas anti-epilépticas
- ICAM: Molécula de adesão intracelular
- IL: Interleucinas
- JAK: Cinase janus
- M: Molaridade
- NADH: Dinucleótido de nicotinamida-adenina reduzido
- NFkB: Fator de transcrição nuclear kappa B
- NMDA: N-metil D-aspartato
- NR2A/2B: Subunidade da proteína 2 NMDA
- PCR: (Polimerase chain reaction) Reação em cadeia da polimerase
- PECAM: Molécula de adesão de plaqueta e células endoteliais
- ROS: (Reactive oxygen species) espécies reativas de oxigênio
- SE: *status epilepticus*
- SNC: Sistema nervoso central
- STAT: (Signal transducers and activation of transcription protein) Sinal de transdução e ativação de transcrição de proteínas
- TGF: (Transforming growth factor) Fator de crescimento e transformação
- TLR: (Toll like receptor) Receptores semelhantes ao Toll
- TNF: (Tumor necrosis factor) Fator de necrose tumoral
- VCAM-1: Molécula de adesão vascular-1

LISTA DE FIGURAS E TABELAS:

Figura 1: Anatomia hipocampal	16
Figura 2: Diferenças na estrutura hipocampal em animais epiléticos e não epiléticos	17
Figura 3: Interações entre resposta inflamatória e a neuroinflamação	23
Figura 4: Evidência de plasticidade de células-tronco adultas	27
Figura 5: Representação do desenho experimental.....	41
Figura 6: Quantificação da expressão de RNAm da citocina IL-1 no cérebro.....	43
Figura 7: Quantificação da expressão de RNAm da citocina IL-4 no cérebro.....	44
Figura 8: Quantificação da expressão de RNAm da citocina IL-6 no cérebro.....	46
Figura 9: Quantificação da expressão de RNAm da citocina IL-10 no cérebro.....	47
Figura 10: Quantificação da expressão de RNAm da citocina TGF β no cérebro	48
Figura 11: Quantificação da expressão de RNAm da citocina TNF α no cérebro	49
Figura 12: Quantificação da concentração sorológica das citocinas IL-10 e TNF α	51
Figura 13: Quantificação de perda neuronal na região anatômica de CA1	53
Figura 14: Quantificação de perda neuronal na região anatômica de CA3.....	54
Figura 15: Quantificação de perda neuronal na região anatômica do Hilo	55
Figura 16: Migração das células transplantadas	56
Figura 17: Expressão de IL-1R no cérebro	57
Figura 18: Quantificação do receptor IL-1	58
Tabela 1: Expressão de citocinas no cérebro.....	50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	HISTÓRICO	12
1.2	EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL (ELT).....	15
1.3	INFLAMAÇÃO E CITOCINAS	18
1.3.1	A inflamação e o sistema nervoso.....	20
1.4	CITOCINAS E A REGULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA.....	23
1.4.1	Interleucina 1 β (IL-1 β).....	24
1.4.2	Interleucina 6 (IL-6)	25
1.4.3	Fator de Necrose Tumoral α (TNF α).....	26
1.4.4	Interleucina 4 (IL-4)	27
1.4.5	Interleucina 10 (IL-10).....	27
1.4.6	Fator de Transformação e Crescimento β (TGF β)	28
1.5	MODELOS EXPERIMENTAIS DE EPILEPSIA	29
1.5.1	Modelo de epilepsia induzida por pilocarpina	30
1.6.1	Células-tronco	31
2	OBJETIVOS	35
2.1	OBJETIVO GERAL.....	35
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1	ANIMAIS	36
3.2	MODELO DE EPILEPSIA INDUZIDO POR PILOCARPINA	36
3.3	PREPARO E TRANSPLANTE DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA.....	37
3.4	SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS	38
3.5	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR qRT-PCR (PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL)	38
3.5.1	Extração de RNA.....	39
3.5.2	Síntese de cDNA	39
3.5.3	Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real.....	39
3.6	IMUNOFLOURESCENCIA E MIGRAÇÃO CELULAR	40
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
4	RESULTADOS	42
4.1	INDUÇÃO DO MODELO DE EPILEPSIA	43
4.2	EXPRESSÃO DE CITOCINAS NO CÉREBRO	43
4.2.1	Avaliação da expressão cerebral de IL-1 β	43
4.2.2	Avaliação da expressão cerebral de IL-4.....	44
4.2.3	Avaliação da expressão cerebral de IL-6.....	45
4.2.4	Avaliação da expressão cerebral de IL-10.....	47
4.2.5	Avaliação da expressão cerebral de TGF β	48
4.2.6	Avaliação da expressão cerebral de TNF α	49
4.3	AVALIAÇÃO DA PERDA NEURONAL.....	51
4.3.1	Avaliação neuronal da região CA1	52
4.3.2	Avaliação neuronal da região CA3	53
4.3.3	Avaliação neuronal da região do hilo do giro denteado	54
4.4	ANÁLISE DA MIGRAÇÃO CELULAR	55
5	DISCUSSÃO	57
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPILEPSIA

O interesse sobre o estudo da epilepsia possui registros nos primórdios da história humana. Os primeiros relatos de crises epiléticas datam de 3500 a.C., período marcado pela forte presença de mitologia e religiosidade, onde a presença das crises epiléticas eram manifestações patológicas atribuída à presença de possessões demoníacas. Os primeiros registros da existência do mal epilético são atribuídos aos egípcios e sumérios. O Papiro de Smith, o principal documento sobre neurobiologia no Egito Antigo, apresenta relatos das primeiras crises convulsivas por volta de 1700 a.C. Neste mesmo período também foram encontrados na antiga Mesopotâmia (Suméria) diversos manuscritos que registram o que hoje sabemos claramente que se trata de uma crise epilética (DA SILVA e CAVALHEIRO, 2004).

A compreensão da patologia evoluiu com o passar dos séculos e adquiriu novas definições importantes para os estudos que vieram a seguir. Em 400 a.C., Hipócrates afirmou que a epilepsia seria uma patologia associada ao cérebro, desvirtuando-a da sua antiga visão que associava a epilepsia à presença de espíritos malignos. Os estudos da neurobiologia mais avançados foram iniciados em 1860 por Hughling Jackson, possibilitando uma melhor compreensão da etiologia da epilepsia. Em 1870, a epilepsia teve o seu conceito redefinido pelo mesmo pesquisado, descrevendo-a como desarranjo intermitente do sistema nervoso devido a uma descarga cerebral sobre os músculos de forma excessiva e desordenada (LONDERO, 2010). Através das observações das crises epiléticas por Jackson postulou que estas crises poderiam causar mobilizações motoras sem associação a perda de consciência, diferenciando assim as crises generalizadas (com perda de consciência) de crises parciais (focais).

Um importante marco para a epileptologia foi o início das intervenções cirúrgicas empregada para no tratamento das crises epiléticas. Em 1886, o médico neurocirurgião Victor Horsley realizou a primeira cirurgia em pacientes epiléticos. O procedimento constitui na ressecção de córtex cerebral em região adjacente a área de afundamento de

crânio, promovendo a redução da intensidade das crises motoras no paciente operado. O pioneirismo de Horsley foi o alicerce para o aperfeiçoamento do tratamento cirúrgico desenvolvido por Wilder Perfield e Herbert Jasper no início da década de 50, desenvolvendo a metodologia empregada nos dias atuais.

Em 1904, o tratamento farmacológico teve seu início com a descoberta do fenobarbital pelos pesquisadores Emil Fisher e Joseph Von Mering (JONES, 2010) e mais tarde com o surgimento do medicamento fenoiína em 1938 (GUERREIRO *et al.*, 2006). No início da década de 80 foram introduzidos dois novos fármacos ao grupo das drogas anti-epilépticas (DAE), carbamazepina e valproato dando início ao politerapia com DAE.

A busca por alternativas terapêuticas para o tratamento da epilepsia demonstra a elevada importância desta patologia para saúde pública. A epilepsia é descrita como o mais frequente transtorno neurológico grave, além de ser uma das mais prevalentes doenças não-transmissíveis mundiais (WHO *et al.*, 2005). A prevalência desta desordem neurológica está estimada entre 1 a 2% na população mundial, totalizando aproximadamente 60 milhões de pessoas acometidas por esta síndrome. A prevalência em países em desenvolvimento é ainda mais elevada, abrigando cerca de 85% do número de casos de epilepsia mundial (CALVANO *et al.*, 2010).

Esta disfunção cerebral é clinicamente definida por alterações subjetivas comportamentais súbitas e estereotípicas denominadas crises epiléticas. O quadro de crise epilética é desencadeado por uma atividade elétrica anormal em uma ou várias regiões cerebrais que resulta em um disparo sincronizado, rítmico e de excitabilidade excessiva na ausência de condição febril ou tóxico-metabólica (GAUSTAUT, 1973; ROGAWASKI e PORTER, 1990; MCNAMARA *et al.*, 1994).

Uma importante definição para o estudo desta patologia é a distinção entre os conceitos de epilepsia e crise epilética. O diagnóstico de epilepsia se relaciona ao encontro de uma anormalidade epileptogênica cerebral permanente, onde mais tardiamente irá desencadear as crises recorrentes características. Em contraposição, as crises epiléticas podem se apresentar em pessoas não acometidas por esse mal. Estas crises podem ocorrer

de forma isolada em resposta a um insulto transitório ou à perda de homeostase, e deste modo, a situação de estresse presente naquele momento pode desencadear uma atividade elétrica anormal. A presença de crises epiléticas isoladas é um achado bastante comum, retratado por uma prevalência mundial de 7 a 10% (BEAR, 2006). Assim, a epilepsia presume a existência de uma anormalidade epileptogênica intrínseca, endógena ao próprio cérebro, independente de qualquer condição ou insulto agudo, apresentando a capacidade de gerar crises recorrentes após o dano inicial (GITAÍ *et al.*, 2008).

A epilepsia encontra-se definida como um complexo de mais de 40 tipos de síndrome, que se diferencia através dos seus aspectos clínicos. Entre as características importantes para a sua classificação estão o padrão de recorrência de crise, idade do início do evento epilético, padrões encefalográficos, presença ou ausência de ocorrência de epilepsia na família e prognóstico da doença (ENGEL e PEDLEY, 1997).

A utilização de DAEs oferece o tratamento apenas sintomático das epilepsias, promovendo a redução da frequência das CER. A elevada refratariedade encontrada na farmacoterapia, restringe as alternativas terapêuticas para o tratamento da epilepsia. O tratamento cirúrgico empregado nos casos refratários à farmacoterapia é limitado devido à localização das áreas de epileptogênese e do risco de perda de funções cerebrais. As restrições metodológicas presentes no tratamento das epilepsias revelam a necessidade da busca por novas alternativas terapêuticas.

1.2 EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL (ELT)

A partir de 1989, as ELTs passaram a ter uma classificação diferenciada dentro do grupo das síndromes epiléticas (*Commission of Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy*, 1989), sendo dividida em dois grandes grupamentos: epilepsia lateral ou neocortical e epilepsia mesial. A nomenclatura recebida diz respeito ao local de gênese das crises geradas. As epilepsias neocorticais ou laterais têm sua origem nas estruturas do neocórtex temporal e áreas associativas sensórias da visão,

funções lingüísticas e auditivas (BARTOLOMEI e WIGNAL, 1999), enquanto as epilepsias mesiais possuem as estruturas temporais mesiais (hipocampo, córtex entorinal e complexo amigdalóide) como as regiões geradoras de crises (KANNER e CAMPOS, 2004).

O fenômeno da epileptogênese pode ser apresentado em regiões cerebrais diversas, porém observa-se uma maior susceptibilidade das estruturas do lobo temporal ao desenvolvimento da epilepsia após um insulto inicial. Esta característica torna a ELT a mais freqüente forma de epilepsia em pacientes adultos (ENGEL *et al.*, 1989). A ELT apresenta uma prevalência de 60% dentro do complexo das síndromes epilépticas (ACSÁDY *et al* 1998; AMARAL *et al*, 1990), possuindo uma elevada refratariedade (30 a 40%) ao tratamento medicamentoso e uma expressiva indicação ao tratamento cirúrgico (Da COSTA, 1998). Em crianças, a ELT representa 20 a 30% dos casos não responsivos às DAEs (GUIMARÃES, 2006).

O quadro clínico desenvolvido por pacientes com ELT constitui-se um gradual desenvolvimento de CER com ou sem generalização secundária com associação à perda neuronal e declínio cognitivo progressivo independente de doença subjacente (VENTURIN, 2008). Em crianças é possível observar a presença de distúrbios de comportamento, problemas de aprendizado, na ausência de déficit cognitivo (SCHLINDWEIN-ZANIN *et al.*, 2008). Nesta fase inicial da vida, indivíduos com ELT apresentam freqüentemente características tais como a redução de memória, hiperatividade, além do comprometimento de funções psicossociais tais como atenção, linguagem, funções executivas e praxia construtiva (GUIMARÃES, 2006).

Os pacientes acometidos por este tipo de epilepsia apresentam a esclerose hipocampal como o achado histopatológico de maior freqüência (MARGERISON e CORSELLIS, 1996). Estima-se que haja uma prevalência 50 a 75% de associação entre a esclerose hipocampal e ELT (HONOVAM e MELDRUM, 1997). A prevalência de refratariedade ao tratamento farmacológico em pacientes com ELT encontra-se ainda mais elevada quando há uma associação entre epilepsia e a presença de esclerose hipocampal, apresentando uma prevalência em torno de 70% (ZENTINER *et al.*, 1995).

A esclerose hipocampal é determinada por uma série de modificações fisiológicas durante a fase de latência. As principais mudanças presentes são perda neuronal, gliose reativa, brotamento de fibras musgosas, alteração morfológica dos dendritos e de sua localização e por fim a neurogênese atípica (GUEDES *et al.*, 2006; BLUMCKE *et al.*, 1999; BLUMCKE *et al.*, 2002). Durante estes período é observada também a presença de uma reorganização axonal, representada pelo brotamento colateral de células granulares, fenômeno denominado de brotamento das fibras musgosas (TAUCK e NADLER, 1985).

A anatomia hipocampal (Fig.1) é composta pelo giro denteado (GD), hipocampo propriamente dito ou corno de Ammon (CA), complexo subicular (subículo, para-subículo e pré-subículo) e córtex entorrinal. O hipocampo, ou CA, conforme a descrição de Lorente de Nó (1934), subdivide-se em CA1, CA2, CA3 e CA4, sendo eles constituídos principalmente de células piramidais dispostas em uma camada uniforme, que por sua vez recebe o nome de camada piramidal. A região superior (*região superior*) da estrutura é chamada de CA1, a inferior (*região inferior*) de CA3, com a pequena área CA2 entre elas, e a última área de CA4. A área CA4, também chamada de hilo hipocampal, foi posteriormente incorporada ao GD, e passou a ser conhecida por região polimorfa do giro denteado. No GD encontramos as células musgosas hiliares, estas recebem das células da camada granular (fibras musgosas) aferência dos axônios excitatórios. As fibras musgosas se projetam em direção as células inibitórias que se conectam os dendritos das células granulares, promovendo a inibição das células granulares.

A perda neuronal se constitui como um importante achado histológico comum a diversas doenças cerebrais (VENTURIN, 2008). Em ELT este fenômeno encontra-se localizado preferencialmente na região do hipocampo, onde ocorre com maior intensidade, em ordem decrescente, nas regiões de CA1, Hilo e CA3 do hipocampo (BLUMCKE *et al.*, 1999).

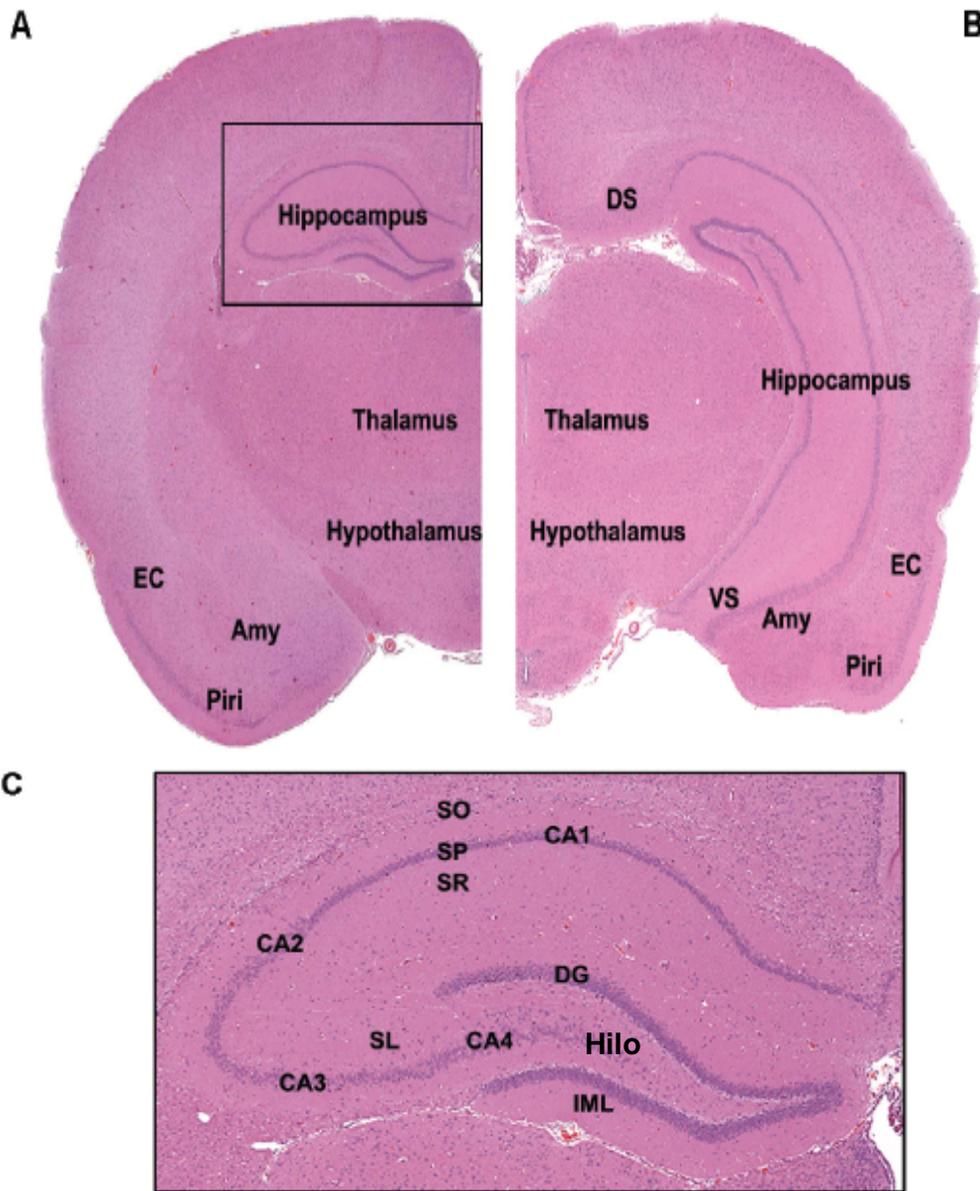


Figura 1: Anatomia da regional do hipocampo. CA1, CA3, CA4, hilo e giro denteado. Esta imagem apresenta um a secção coronal encefálica de rato corado por hematoxilina-eosina, apresentado as diferentes regiões do hipocampo nas figuras A (localizado ~ -3,12 Bregman) e B (localizado ~ -5,28 Bregman), juntamente à magnificação e descrição detalhada da estrutura hipocampal na figura C.

Legenda: Piri:, Amy: Amígdala; EC: córtex entorinal DG:Giro denteado; DS:subículo dorsal; Thalamus: Tálamo; Hypothalamus: Hipotálamo; ImL: Camada molecular interna; SL: Stratum lucidium; SP: Stratum pyramidale; SO: Stratum oriens; SR: Stratum radiatum; VS:Subículo ventral Fonte: modificado de SHARMA *et al.*, 2007.

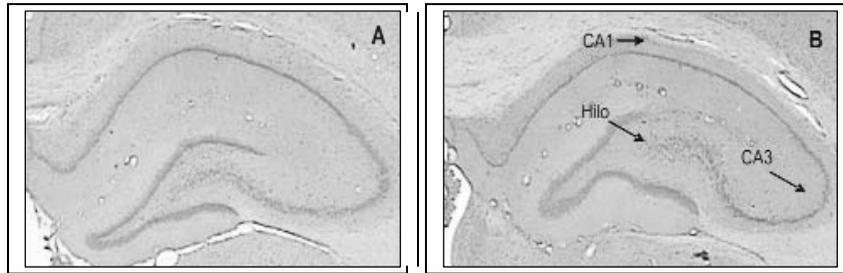


Figura 2: Diferenças na estrutura hipocampal em animais epiléticos e não epiléticos. Micrografias de corte de cérebro com coloração de Nissl, apresentando esclerose hipocampal característica da epilepsia com perda neural nas regiões de CA1, Hilo e CA3. A Figura 2A representa um animal normal, enquanto o animal epilético encontra-se representado na figura 2B. (Fonte: modificado de SCORZA *et al.*, 2005).

1.3 O PAPEL DA INFLAMAÇÃO NA EPILEPSIA

O estudo dos processos inflamatórios e suas relações com patologias do sistema nervoso central têm apresentado uma grande importância nas pesquisas da última década. Evidências experimentais e clínicas indicam a inflamação cerebral ou neuroinflamação como um constituinte comum e crucial na epileptogênese e no desenvolvimento das CERs (VEZZANI *et al.*, 2005; VEZZANI *et al.*, 2011). As primeiras evidências da influência da resposta inflamatória na epilepsia foram observadas em pacientes resistentes ao tratamento com DAEs que apresentaram uma redução do número de crises após o uso de medicamentos anti-inflamatórios (RIIKONEN, 2004; WIRRELL *et al.*, 2007).

A atividade epilética induz rapidamente a produção de diversos mediadores pró-inflamatórios, tais como as citocinas, quimiocinas, receptores tipo Toll (TLR), prostaglandinas, fatores do sistema complemento, moléculas de adesão celular, e transdutores de sinal que ativam o fator de transcrição nuclear kappa B (NFkB) (VEZZANI, 2005). Achados em modelo experimental de epilepsia demonstram que induções utilizando quimioconvulsivantes ou estímulos elétricos promovem a liberação de uma onda de mediadores inflamatórios (VEZZANI *et al.*, 2011). Esta produção de mediadores é iniciada pelas células do endotélio cerebral e induzida na presença de crises

epilépticas. A presença desta inflamação, por sua vez, pode promover o recrutamento periférico de células inflamatórias, corroborado pelo expressivo encontro de infiltrado de granulócitos durante o período da epileptogênese, juntamente ao reduzido número de linfócitos T na epilepsia crônica em modelos experimentais e humanos (FABENE *et al.*, 2008; RAVIZZA *et al.*, 2008).

A inflamação parece também contribuir para o desenvolvimento das crises epiléticas ou no estabelecimento do quadro de CER. Inicialmente a resposta inflamatória produz mediadores que promovem a expressão de moléculas de adesão necessárias para migração leucocitária através da barreira hemato-encefálica (BHE) e de proteínas com imunoglobulinas e albumina. Tais componentes podem se ligar aos receptores de TGB β dos astrócitos, promovendo a sua ativação, eleva a síntese de glutamato e aumenta a excitabilidade neuronal, favorecendo o desenvolvimento das crises.

A resposta inflamatória promove a liberação de prostaglandinas (GATTI *et al.*, 2002) atua sobre o centro hipotalâmico (ZETTERSTROM *et al.*, 1998), desenvolvendo a reação febril, um dos cinco sinais da resposta inflamatória (KUMAR *et al.*, 2005). A resposta febril é conhecida como uma das principais causas mundiais de epilepsia na infância (DUBÉ *et al.*, 2007; BERG *et al.*, 1998). A elevação da temperatura cerebral *per se* promove o aumento de IL-1 β , uma das principais citocinas pró-inflamatórias. A inflamação, mesmo quando periférica, pode influenciar o desenvolvimento das crises epiléticas. A resposta inflamatória ao lipopolissacarídeo de paredes de bactérias gram-negativas (LPS) promove a ativação de TLR4, induzindo a produção de uma proteína denominada *high mobile group box 1* (HMGB1), um potente ativador de astrócitos e microglia, favorecendo mais uma vez o desenvolvimento das crises através do aumento da excitabilidade neural (MAROSO *et al.*, 2010).

1.3.1 A inflamação e o sistema nervoso

A inflamação é uma resposta imune de grande importância para a regulação da homeostase corporal. A resposta inflamatória pode ser gerada a partir de um dano causado

por patógenos, agentes químicos ou físicos (ex: trauma mecânico). A inflamação sistêmica tem o importante papel de realizar a eliminação de patógenos e agentes lesivos circulantes que conseguiram transpor as barreiras físicas primárias de defesa. A atividade pró-inflamatória conta com a participação de uma série de linhagens celulares que atuam de acordo ao estímulo ambiental celular em que se encontram. A identificação deste ambiente é mediada por proteínas solúveis chamadas citocinas. As principais efetoras da resposta inflamatória são as células do sistema fagocitário, principalmente os macrófagos.

O sistema nervoso central (SNC) apresenta uma proteção diferenciada oferecido pela BHE, conferindo a este sistema um caráter imunoprivilegiado. Tal qualidade é resultado de um conjunto de características presentes neste tecido, tais como o reduzido tráfego de monócitos e linfócitos entre SNC e sangue. Os locais de drenagem linfática e a presença da BHE garantem um privilégio ao sistema nervoso, desta forma os mediadores pós-insulto encontrados no cérebro são majoritariamente produzidos por células do parênquima cerebral, células da BHE e do plexo coróide (VEZZANI e GRANATA, 2005).

A BHE é constituída por um grupamento de células endoteliais que envolvem o encéfalo possuindo como principal função o rígido controle hídrico cerebral, permitindo a troca de água, íons, proteínas, endocitose de receptores específicos. Estas células endoteliais especializadas são capazes de conferir proteção através de uma barreira semipermeável e seletiva (ABBOTT e ROMERO, 1996). Ao transpor a BHE, encontramos três grupos celulares distintos: os neurônios, a macróglia e microglia. A macróglia é representada pelos oligodentrócitos e astrócitos que apresentam as funções de mielinização axonal e regulação de permeabilidade da BHE, respetivamente (DA COSTA *et al.*, 1998). A microglia representa os macrófagos residentes do SNC e de forma semelhante às células do sistema fagocitário periférico elas também podem responder a estímulos ambientais e serem ativadas para a realização de suas atividades fagocíticas (DA COSTA *et al.*, 1998; CHOI, 2008; VEZZANI *et al.*, 2005, VEZZANI e GRANATA, 2005; VEZZANI *et al.*, 2011).

A neuroinflamação pode ser desencadeada em resposta à presença de agentes infecciosos, traumas, dano cerebral, isquemias ou doenças crônico-degenerativas

(VEZZANI *et al.*, 2011). Inicialmente, este estímulo lesivo promove a liberação de citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF α , proteínas de potencial atividade pró-inflamatórias liberadas que são liberadas no foco lesivo. Ao serem liberadas, elas atuam sobre a expressão e regulação gênica das células microgliais e astrócitos, ativando-as e aumentando a expressão de receptores para estas citocinas nas demais células do SNC (VEZZANI *et al.*, 2011; ROGAWSKI e LOSCHER, 2004). A elevação numérica dos receptores citados tem como objetivo propiciar um maior número de células ativas em um curto período, otimizando a percepção do estímulo lesivo.

O recrutamento leucocitário periférico possui grande influência sobre a BHE. A presença do estímulo lesivo promove uma instabilidade na barreira mediante a ativação metaloproteinases, permitindo assim o contato das células do sistema imune periférico com o interior do encéfalo. O tecido cerebral lesionado libera mediadores estimulando a produção de IL-6 e TNF α que irão favorecer a expressão de moléculas de adesão (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 e PECAM) e integrinas de membrana (MAC-1, LFA-1 e VLA-4), promovendo a adesão leucocitária e quimiotaxia da mesma população celular. Estas ações resultam no aumento da permeabilidade da BHE, possibilitando a transmigração da circulação periférica para o foco lesivo encontrado no cérebro (VEZZANI *et al.*, 2011).

1.4 CITOCINAS E A REGULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Todo ambiente orgânico expressa estímulos que promovem atividades celulares especializadas permitindo que este órgão realize uma função específica, possibilitando por exemplo a contratilidade cardíaca dos cardiomiócitos, as sinapses nervosas das células neuronais ou trocas gasosas nos alvéolos pulmonares. Estes estímulos ambientais estão relacionados a proteínas solúveis denominadas citocinas, tais compostos são definidas como polipeptídeos secretados por células do sistema imune inato e adaptativo, com a capacidade de mediar diversas funções celulares distintas (ABBAS *et al.*, 2008). A produção destas proteínas pode ser desencadeada em resposta à presença de agentes agressores, patógenos, antígenos, traumas ou crises epiléticas (VEZZANI *et al.*, 2005). As citocinas são liberadas por grupos celulares específicos, e ao entrarem em contato com

estes polipeptídios podem sofrer diferenciação, proliferação, ativação e/ou inibição de acordo com a citocina encontrada (ABBAS *et al.*, 2008).

1.4.1 Interleucina 1 β (IL-1 β)

A citocina IL-1 β é um importante mediador de atividade pró-inflamatória, agindo em conjunto com TNF α na resposta imune inata e adaptativa (ABBAS *et al.*, 2008). Este polipeptídeo é sintetizado por todos os tipos celulares, e é definido como um importante regulador da atividade da resposta imunológica (RIJKERS *et al.*, 2009). Esta citocina atua como um mediador solúvel da comunicação entre neurônios e células gliais, apresentando uma forte imunogenicidade durante a epileptogênese, atuando sobre astrócitos perivasculares e células endoteliais da microvasculatura. As alterações promovidas por esta citocina se relacionam ao extravasamento de proteínas (ex: albumina) possibilitando a gênese de uma resposta inflamatória que irá acarretar uma instabilidade da BHE (RAVIZZA *et al.*, 2008; BALOSSO *et al.*, 2008).

A IL-1 β apresenta seus efeitos biológicos após a ligação com o seu receptor de membrana específico (IL1R) a partir da qual desencadeia uma cascata de fosforilações que leva à formação de complexo de cinases e proteínas adaptadoras responsáveis por realizar a ativação de NF-kB (BALOSSO *et al.*, 2008), transcrição de genes relacionados à IL-6 e ao TNF α (ABBAS *et al.*, 2008; BALOSSO *et al.*, 2008), além de atuar sobre o balanço de íons nos neurônios.

As crises epilépticas são elementos promotores de uma rápida ativação de modificações nos canais iônicos. A ligação de IL-1 β ao seu receptor induz as Src kinases a fosforilarem as subunidades NR2A/2B dos receptores do N-metil D-aspartato (NMDA), promovendo a elevação do influxo de Ca⁺² nos neurônios, bem como o aumento de proteínas ceramide-ativadas (BALOSSO *et al.*, 2008). Juntamente ao mecanismo citados, Nalivaeva e colaboradores (2000) demonstraram que uma enzima produtora de ceramidas denominada esfingomielinase neural (N-Smase) é ativada na presença de IL-1 β . As

proteínas ceramidas por sua vez fosforilam tirosinas como Src e as NR2B, desta forma mediando o efeito pró-convulsivo desta citocina. Além disso, a IL-1 β parece desempenhar um papel pró-convulsivante através da inibição da recapitação de glutamato pelos astrócitos, aumento a liberação de glutamato pelos neurônios (LI *et al.*, 2011).

O papel anti-convulsivo da citocina IL-1 β é encontrado em um restrito número de estudos (LI *et al.*, 2011). Segundo Miller e colaboradores (1991), esta interleucina é capaz de promover uma aumento da permeabilidade ao cloreto mediando uma ação inibitória GABAérgica (GUYTON e HALL, 1997), reduzindo assim a excitação neural.

1.4.2 Interleucina 6 (IL-6)

A citocina IL-6 foi descrita como uma proteína multifuncional devido à sua atuação diversificada. Esta citocina apresenta um potencial regulatório sobre a imunidade inata e adaptativa sendo sintetizada por fagócitos mononucleares, células endoteliais vasculares, fibroblastos e células T ativadas (ABBAS *et al.*, 2008). A sua produção pode ser estimulada pela presença de IL-1 β e TNF α . O mecanismo efetor deste peptídeo é a ativação da via de sinalização JAK1/STAT3 levando à transcrição de diversos genes que irão desencadear a síntese de proteínas de fase aguda e o estímulo à produção de linfócitos B e produção e maturação de neutrófilos.

As crises epiléticas induzem um rápido aumento de RNAm de IL-6 nas regiões do hipocampo, giro denteado, amídalas e meninge, aumentando da produção de RNAm para o receptor de IL-6 (IL-6R) na região hipocampal. Em modelos de ácido caínico e indução por estímulo elétrico foi apresentado uma elevação na expressão de IL-6 e IL-6R em células gliais (VEZZANI *et al.*, 2002; KALLUEFF *et al.*, 2004), demonstrando experimentalmente que a administração de IL-6 exacerba a gravidade das crises epiléticas, assim como é bem estabelecido o efeito neurotóxico e pró-convulsivante desta citocina (KALLUEFF *et al.*, 2004; CAMPBELL *et al.*, 1993; SAMLAND *et al.*, 2003; JONAKAIR, 2007).

1.4.3 Fator de Necrose Tumoral α (TNF α)

O TNF α é considerado um dos principais mediadores da resposta inflamatória a patógenos bacterianos. A sua produção é realizada principalmente pelos fagócitos mononucleares, embora também possa ser secretadas por células T ativadas, células NK e mastócitos (ABBAS *et al.*, 2008). O TNF α apresenta diversas ações biológicas como o estímulo ao recrutamento de neutrófilos e monócitos, através da ativação endotelial e da promover secreção de quimiocinas produzidas por macrófagos e células endoteliais. Ele atua ainda estimulando a produção de IL-1 β . No sistema nervoso central, o TNF α é ativado através da ligação dos receptores p77 e p75, promovendo a ativação do NF κ B e a morte celular programada, respectivamente (NATOLI *et al.*, 1997; ZHUANG *et al.*, 1999).

A presença de crises epiléticas provoca a elevação de RNAm para esta citocina nas regiões do hipocampo, amígdala e córtex piriforme, pré-frontal e parietal (PLATA-SALAMÁN *et al.*, 2000; GODLEVSKY *et al.*, 2002). Estudos em modelos experimentais demonstram um efeito dose-dependente desta citocina. Baixas concentrações (< 10 M) de TNF α desencadeiam um inflamação local e ativação de leucócitos, uma dose mediana desenvolve efeitos sistêmicos como a atuação no eixo hipotalâmico provocando febre, maturação de leucócitos na medula, e produção de proteínas de fase aguda no tecidos hepáticos, enquanto que altas concentrações produzem o choque séptico, gerando a baixa resistência vascular, hipoglicemia e a redução do débito cardíaco (ABBAS *et al.*, 2008). O TNF α influencia à susceptibilidade ao desenvolvimento de crises epiléticas de forma dose-dependente (STELLWAGEN *et al.*, 2005; SHINODA *et al.*, 2003). Reduzidas concentração de TNF α ativam a via de sinalização do receptor p55, que produz efeitos que aumentam a susceptibilidade às crises, enquanto que elevadas concentrações da citocina desencadeiam a sinalização do receptor p77 e diminuem a suscetibilidade (GRELL *et al.*, 1998), demonstrando atividade anti-convulsivante para uma mesma citocina (LI *et al.*, 2011).

1.4.4 Interleucina 4 (IL-4)

A interleucina IL-4 foi caracterizada como o principal estimulante da produção de anticorpos IgE, contribuindo significativamente para a montagem de uma resposta celular do tipo Th2. A IL-4 é principalmente produzida pelos linfócitos T CD4⁺, apresentando suas ações biológicas mediante a ligação ao seu receptor de superfície IL-4R. Esta ligação promove a regulação da expressão gênica através da sinalização da via JAK/STAT (JAK3 ou 4 STAT6), resultando na diferenciação em células do tipo Th2 e troca de isotipo de células B ao atuar em linfócitos T e B, respectivamente (ABBAS *et al.*, 2008).

No sistema nervoso central a citocina IL-4 esta associada a uma resposta anti-inflamatória, juntamente a outras citocinas como TGFβ, IL-10 e IL-1ra (antagonista IL-1) (ALLAN e ROTHWELLI., 2001) e a produção desta proteína é realizada pelos astrócitos nas fases neonatal e adulta (HULSHOF *et al.*, 2002; ACARIN *et al.*, 2000). Estudos de Liu e colaboradores (2000) demonstraram a presença da subunidade α do receptor de IL-4 em astrócitos reativos próxima a focos epilépticos e regiões neoplásicas cerebrais. A atividade *in vitro* desta citocina demonstrou um ação redutora sobre citocinas pró-inflamatórias e a ativação de microglia (FURLAN *et al.*, 2000; PALUDAN *et al.*, 1997).

A ativação de uma resposta Th2 promovida por IL-4, juntamente a outras citocinas anti-inflamatórias, irá promover um desvio de resposta imune, prevenindo a formação de uma resposta do tipo Th1. A resposta Th1 é caracterizada por uma ação pró-inflamatória marcada pela produção de IL-1β e TNFα, portanto o aumento de IL-4 poderia desempenhar um papel anti-convulsivo na epilepsia devido à promoção de uma redução da atividade inflamatória provocada por um desvio do tipo de resposta imune de Th1 para Th2 (NELMS *et al.*, 1999; FURLAN *et al.*, 2000; PALUDAN *et al.*, 1997).

1.4.5 Interleucina 10 (IL-10)

A citocina IL-10 apresenta uma marcante atividade anti-inflamatória, e age a partir de ligações com receptores de membrana IL-10R associado as cinases Jak1 e Tyk2. A

ligação desta citocina aos seus receptores ativa uma cascata de sinalização que finaliza com a passagem da proteína STAT na sua forma ativa para o interior do núcleo, ativando a transcrição e ativação de genes específicos (ABBAS *et al.*, 2008).

A produção de IL-10 é realizada principalmente por macrófagos ativados e células T regulatórias. A ação biológica destas proteínas consiste na inibição de moléculas de MHCII em macrófagos e células dendríticas deste modo inibindo a apresentação de antígenos para os linfócitos T que, conseqüentemente, deixam de ser ativados. A IL-10 pode ainda inibir a produção de IL-12, e secundariamente inibindo o IFN γ , um importante promotor da resposta pró-inflamatória. A IL-10 possui uma ação inibitória sobre a NADH oxidase, uma enzima apresenta potencial regulatório sobre a produção de TNF α que medeia a formação das espécies reativas de oxigênio (ROS). A IL-10 é também um potente inibidor da ativação de NFkB, um importante ativador de microglia (QIAN *et al.*, 2006).

1.4.6 Fator de Transformação e Crescimento β (TGF β)

O TGF β possui uma importante função supressora do sistema imunológico promovendo a inibição, e ativação de linfócitos e de outros leucócitos. A produção e secreção desta proteína é realizada pelas células T e macrófagos estimulados. A via de sinalização ativada pela ligação de TGF β ao seu receptor (TGF β -R) proporciona a ativação citoplasmática e translocação nuclear do complexo Smad2/Smad4 (SIDDIQUI *et al.*, 2004), possibilitando a indução de formas epiléticas ativas (CACHEAUX, 2009). Ao acessar o interior do núcleo este complexo irá atuar ativando diversos genes relacionado à ativação de vias de sinalização pró-inflamatórias como sistema complemento e NFkB, e a inibição de genes relacionados a regulação da produção de neurotransmissores GABAérgicos e de receptores NMDA, promovendo uma regulação negativa dos canais iônicos dependentes de voltagem (Ca⁺, Cl⁻, K⁺). A junção de todo este quadro indica a promoção de uma elevada atividade epileptogênica. As mesmas vias de sinalização de TGF β podem ser ativadas pela simples ligação de albumina ou anticorpos sorológicos ao receptor desta citocina, um achado comprovado nos estudos de Cacheaux (2009).

A resposta inflamatória apresenta um papel determinante no desenvolvimento da epilepsia e a manifestação das CER. Ainda não foi totalmente elucidado se as crises epiléticas são geradas a partir dos episódios de inflamação neural ou se as crises que promovem a inflamação. Neste caso, as CERs alteram o micro ambiente neuronal desencadeando a ativação de microglia e outros grupos celulares, promovendo a liberação de fator, culminando com a gênese da neuroinflamação. Dentro desta difícil definição, o equilíbrio entre as respostas pró e anti-inflamatória desempenha um importante papel na regulação da excitabilidade neuronal e no desenvolvimento das CERs (VEZZANI *et al*, 2011).

A figura 3 ilustra uma visão geral da resposta inflamatória e a sua interação com o sistema nervoso.

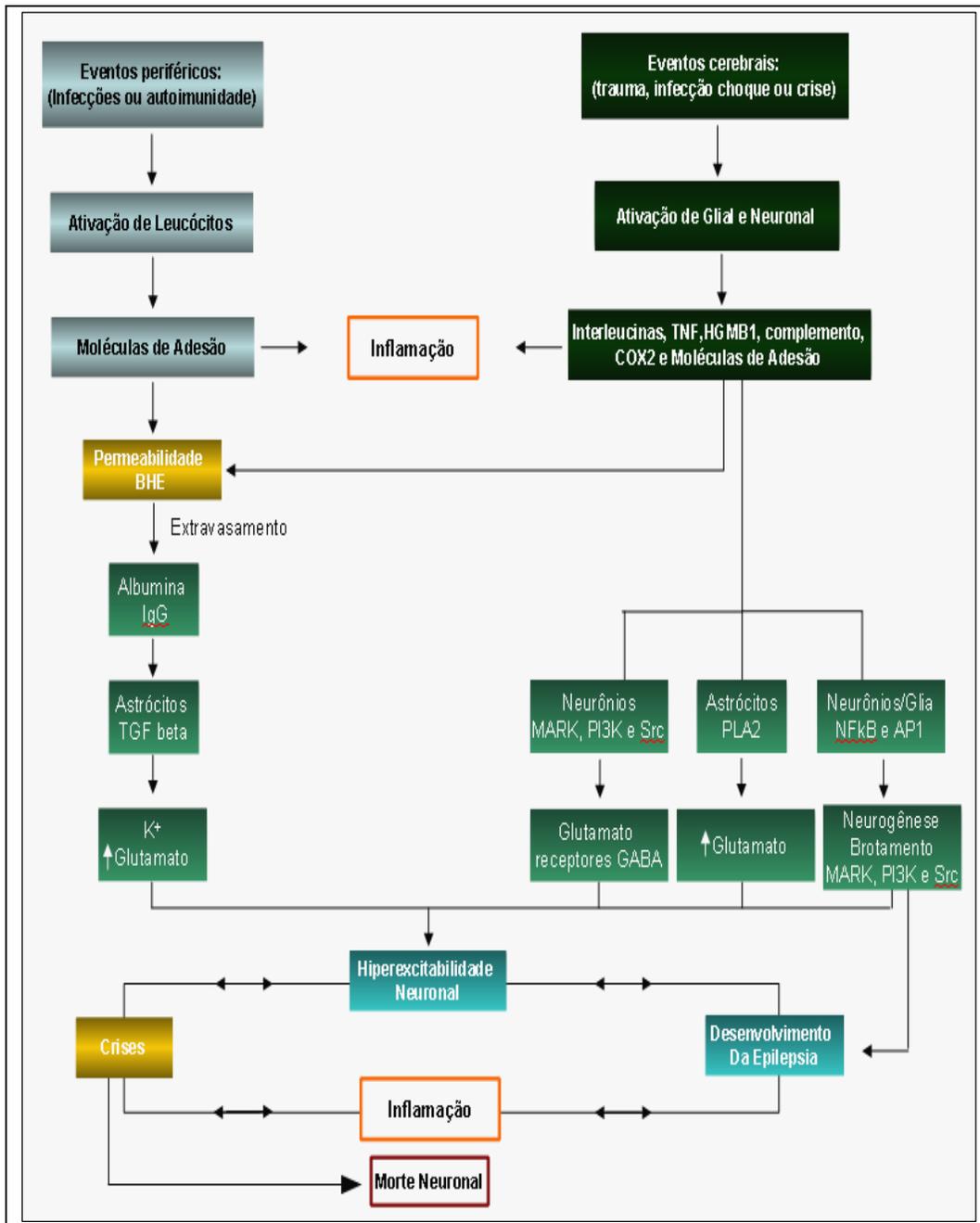


Figura 3: Interações entre resposta inflamatória e a neuroinflamação (modificado de VEZANNI *et al.*, 2011)

1.5 MODELOS EXPERIMENTAIS DE EPILEPSIA

A utilização de modelos experimentais tem como objetivo a mimetização da condição patológica humana, de modo a possibilitar a aplicação de intervenções almejando trazer benefícios curativos ou uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos que a promovem. Os modelos experimentais de epilepsia induzem uma cascata de eventos moleculares e estruturais que modificam propriedades neurais intrínsecas que resultam na formação de uma rede neural favorável ao desenvolvimento da epilepsia. O estabelecimento desta nova rede neural é iniciado pela indução do SE, provocando uma lesão cerebral de elevada capacidade epileptogênica, equivalente ao encontrado no ser humano (MATHERN *et al.*, 1996).

Os modelos experimentais de epilepsia apresentam uma marcante atividade epileptiforme observados através de exames eletroencefalográficos que são semelhantes aos achados clínicos presente durante uma crise epiléptica (LOUIS *et al.*, 1987). Estes modelos podem ser definidos como agudos ou crônicos de acordo às crises convulsivas apresentadas. Em modelos agudo as crises epilépticas encontram-se apenas no momento da indução do SE, sendo em seguida bloqueadas por um inibidor específico (VENTURIN, 2009). No modelo crônico, a apresentação das crises perdura por um período mais longo após a indução, recorrendo em intervalos variáveis e podendo perpetuar durante toda a vida do animal (CAVALHEIRO e LEITE, 1991; SANABRIA e CAVALHEIRO, 2000).

O desenvolvimento experimental deste modelo pode ser classificado em dois grandes grupos, a epilepsia genética e epilepsia adquirida (sintomática). O modelo genético é desenvolvido experimentalmente através de mutações pontuadas ou animais com genes silenciados que desencadeiam uma cascata de sinalização fornecendo as condições necessárias para o desenvolvimento da epilepsia (SUZUKI, 2004), apresentando CER. Por sua vez, os modelos sintomáticos diferenciam-se inicialmente das epilepsias genéticas por apresentar uso de animais inicialmente saudáveis. Os animais quando submetidos ao SE, mediante aplicação de pilocarpina, ácido caínico ou eletro-choque, desenvolvem um quadro patológico caracterizado por manifestações motoras específicas (crises) que são

interrompidas com o uso de anti-convulsivante. Em seguida, os animais submetidos ao agente indutor passam por um período variável de ausência de crises (de dias ou meses) e ressurgem com as CER que pode durar toda a vida do animal (COULTER *et al.*, 2002). O emprego dos modelos de epilepsia adquirida pode ser utilizado no estudo tanto de fase aguda quanto de fase crônica da patologia.

1.5.1 Modelo de epilepsia induzida por pilocarpina

A indução da epilepsia poder ser realizada utilizando diferentes fármacos, porém o emprego do cloridrato de pilocarpina como agente indutor tem a capacidade de reproduzir condições necessárias ao desenvolvimento de um quadro sintomático com alterações morfológicas idênticas às observadas no tecido epilético humano (CAVALHEIRO e LEITE, 1991).

A pilocarpina é um alcalóide extraído das folhas da *Pilocarpus jaborandi* e *Pilocarpus microphyllus*, plantas encontradas nas florestas da América do Sul. Ao ministrar este alcalóide ocorrerá a promoção da ativação dos receptores colinérgicos muscarínicos do subtipo M1 (SANBRIA e CAVALHEIRO, 2000), localizado na camada do córtex entorrinal ampliando o influxo de cálcio, causando uma despolarização da membrana e o disparo repetitivo dos neurônios, acompanhado de atividade pós-sináptica (KLINK e ALONSO, 1997).

A atividade neuronal intensa promove a ativação secundária do sistema glutamatérgico promovendo ações excitotóxicas no hipocampo e estruturas adjacentes. O dano neural agudo resultante da ação excitotóxica somado às alterações moleculares resultam em morte celular, reorganização sináptica (sinaptogênese) e neurogênese na região do giro denteado, promovendo também mudanças em propriedades eletrofisiológicas. Este conjunto de alterações circuitárias compõe o estado epileptogênico do tecido hipocampal (SANBRIA e CAVALHEIRO, 2000).

Ao receber uma dose única de pilocarpina os animais permanecem em um estado SE duradouro. Este evento deve apresentar um tempo mínimo de aproximadamente 30 min e é caracterizado pela presença de crises epiléticas de intensidade variável, podendo apresentar imobilidade, movimentos bucofaciais, abalos de extremidade, ataxia e culminando com as crises tônico-clônicas (crise generalizada com perda de consciência). Este período agudo é seguido de um período silencioso denominado período de latência. Na epileptogênese são apresentadas diversas alterações estruturais na região hipocampal tornando possível a gênese das CER na fase crônica da doença (CAVALHEIRO e LEITE, 1991).

1.6 TERAPIA CELULAR

Terapia celular é o conjunto de métodos e abordagens tecnológicas com a utilização de células no tratamento de doenças como: diabetes melito, câncer, pneumopatias, doenças genéticas, cardíacas e neurodegenerativas. A terapia com células-tronco tem despertado maior interesse na comunidade científica devido à capacidade que essas células indiferenciadas possuem de preservar sua própria população e de se diferenciar em células dos diversos tecidos (ZAGO, 2005).

1.6.1 Células-tronco

O desenvolvimento corpóreo se inicia na fase embrionária após a formação do zigoto, resultado da fecundação dos gametas parentais. Este componente celular ao ser formado apresenta uma intensa divisão, seguido em um segundo momento por uma marcante diferenciação celular, originando assim a enorme diversidade orgânica. Esta capacidade é necessária para o desenvolvimento corpóreo, mas apresenta uma significativa redução deste potencial ao atingir maturação. Tecidos especializados apresentam um controle homeostático da sua população celular na fase adulta, realizando assim a reposição das células mortas pelo processo de envelhecimento ou dano tecidual. A plasticidade celular encontrada nas células do zigoto ainda permanece na fase adulta em

alguns especializados (ex: medula óssea, fígado e epitélio). A capacidade de diferenciação na fase adulta e embrionária apresenta uma relação direta com as células-tronco (FUCHS e SEGRE, 2000).

Células-tronco apresentam características que as distinguem dos demais tipos celulares encontrados no organismo, como o caráter indiferenciado e não-especializadas destas células, permitindo a sua multiplicação e mantendo uma população indiferenciada por longo período (tanto *in vivo* quanto *in vitro*). Estas particularidades permitem que, diante de um estímulo ambiental, estas células apresentem a capacidade de originar múltiplas populações celulares idênticas, agregadas a um enorme potencial de diferenciação. Elas possuem a capacidade de realizar divisões assimétricas originando novos precursores com capacidade restrita de diferenciação, ao mesmo tempo em que repõem a população de células-tronco com a produção de células indiferenciadas (auto-renovação) (ZAGO, 2006).

Inúmeras são as fontes de células-tronco e encontrar a mais apropriada para uso terapêutico depende da investigação de diversos fatores como suas características fenotípicas, potencial de diferenciação, sua capacidade de proliferação e estabilidade citogenética, quando expandidas *in vitro*. As células-tronco são classificadas como embrionárias ou adultas de acordo com sua fonte e estágio de desenvolvimento (DAN *et al.*, 2008).

1.6.2 Células-tronco adultas

Segundo relatos, as células-tronco adultas podem assumir características de células que se desenvolvem a partir da mesma camada germinativa primária ou de camadas diferentes (**Figura 5**). Muitos experimentos que envolvem a plasticidade demonstram que células-tronco derivadas da medula óssea, que é proveniente do mesoderma podem se diferenciar em outros tecidos provenientes da mesma camada, tais como: do músculo esquelético, do músculo cardíaco e do fígado; mas também podem se diferenciar em tecido neural, que é derivado de camada embrionária diferente: o ectoderma (BRAZELTON *et al.*, 2000).

Na medula óssea podem ser observadas três populações de células-tronco: as hematopoiéticas, as mesenquimais (estromais) e provavelmente células progenitoras endoteliais (SHI *et al.*, 1998). As hematopoiéticas são responsáveis pela formação do tecido sanguíneo e as células mesenquimais encontram-se imersas no estroma medular e podem dar origem a diferentes tipos celulares (KÖRBLING *et al.*, 2003).

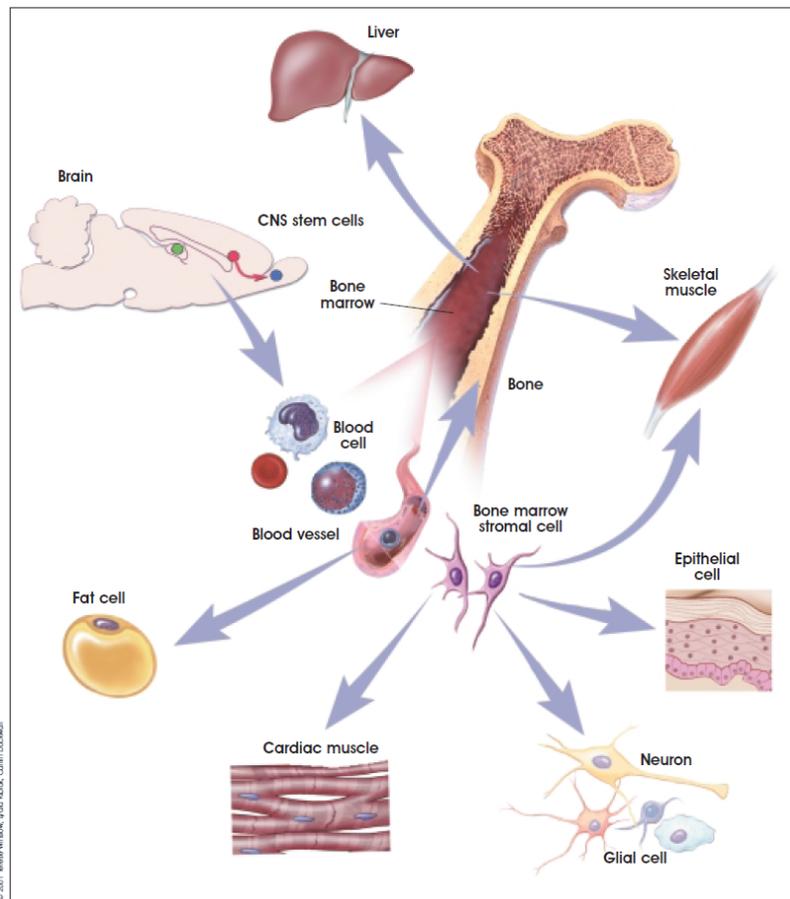


Figura 5: Evidência de plasticidade de células-tronco adultas (WINSLOW, 2001).

1.6.3 Terapia celular em modelos de epilepsia

O transplante de células-tronco e a mobilização de células-tronco endógenas têm sido estudados como potencial terapia para várias doenças neurológicas, tais como a esclerose lateral amiotrófica, doença de Huntington, doença de Parkinson, acidente

vascular cerebral, esclerose múltipla, lesão medular, degeneração muscular e epilepsia (MARIE e OBA-SHINJO, 2006).

O desenvolvimento da epilepsia implica na perda progressiva de subpopulações neuronais, conseqüentemente apresentando alterações da homeostase, podendo progredir com perdas funcionais importantes. As CMO compreendem as células hematopoiéticas e as não-hematopoiéticas, ambas possuem plasticidade, potencial de auto-renovação e diferenciação e por isso tem sido sugerido a utilização de CMO em terapia celular (CAMOZZATO, 2009). A capacidade de diferenciação das CMO em células microgliais (EGLITIS e MEZEY, 1997) e neurônios *in vitro* (BRAZELTON *et al.*, 2000; MEZEY *et al.*, 2000) caracterizam a possível aplicabilidade na epilepsia.

Utilizando células-tronco neurais, Chu e colaboradores (2004) demonstraram que a administração venosa é capaz de reduzir em 87% as crises epilépticas em ratos submetidos ao SE. Em 2005 estudos realizados por Ruschenschmidt e colaboradores demonstraram que o transplante de células-tronco embrionárias na região hipocampal de ratos epilépticos apresentam pouca capacidade migratórias porém foi capaz de gerar potenciais de ação. Em modelo experimental de epilepsia por administração de ácido caínico, Shetty e Hattiangady (2007), demonstraram que o transplante com células-tronco neurais isoladas da região hipocampal apresentam capacidade de diferenciação em neurônios e astrócitos, sendo que algumas delas expressaram receptores GABAérgicos. Recentemente, o mesmo grupo demonstrou que estas células diminuíram as CERs em 43% sendo que as CER grau V diminuíram em 90% (WALDAU *et al.*, 2010).

No nosso laboratório, células de medula óssea foram estudadas em modelo experimental de epilepsia. Foi demonstrada a distribuição das CMO no cérebro de ratos quiméricos, na fase aguda, após SE induzido por pilocarpina. As células GFP⁺ derivados da medula óssea foram encontradas por todo o cérebro, principalmente no hipocampo, apresentando características de microglia (LONGO *et al.*, 2010). No modelo da epilepsia aguda também foi demonstrando que o transplante venoso de células da medula óssea foi capaz bloquear o aparecimento das CER, preservando os neurônios do hipocampo, mantendo as sinapses da circuitária hipocampal (COSTA-FERRO *et al.*, 2010). A partir

destes dados, a busca por respostas sobre o mecanismo de ação destas células norteou o desenvolvimento do nosso presente trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial das células mononucleares de medula óssea na redução da inflamação e da perda neuronal na fase aguda da epilepsia experimental.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o efeito da terapia com CMO sobre a modulação da resposta inflamatória cerebral em modelo de epilepsia em camundongos.
- Avaliar o potencial da terapia com CMO na reorganização cito-arquitetônica na região hipocampal.
- Comparar os efeitos da administração das CMO íntegras com o lisado de CMO.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos *Swiss Webster* machos adultos (55-65 dias, peso 35-48g), procedentes do Centro de Biotecnologia e Terapia Celular - CBTC. Os experimentos realizados seguiram as normas éticas de pesquisa com animais estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), visando minimizar quaisquer sofrimentos aos animais utilizados. Todo o protocolo experimental planejado para este estudo foi submetido à avaliação do Comitê de Ética no Uso Animal do referido centro de pesquisa, recebendo após aprovação a numeração 05/11.

Os camundongos foram mantidos sob iluminação e temperatura controladas (ciclo de 12 h claro-escuro) e temperatura de $21^{\circ} \pm 2$ com alimentação e água *a libitum*. Os animais foram divididos em 4 grupos: 1) Controle (n=18), não induzidos; 2) Salina-SE (n=15), animais submetidos ao SE não transplantados, recebendo salina no lugar das células por via endovenosa pelo plexo orbital; 3) Salina-Lisado (n=15), animais submetidos ao SE e transplantados com células mononucleares lisadas por choque térmico; 4) SE-CMO (n=15), transplantado com células mononucleares da medula óssea por via endovenosa pelo plexo orbital. Os animais dos grupos 2, 3 e 4 foram submetidos à indução do SE mediante a aplicação de pilocarpina em seguida transplantados com as células mononucleares íntegras ou lisadas. Por fim, os animais foram sacrificados nos tempos 12 h, 24 h e 7 dias após o transplante.

3.2 MODELO DE EPILEPSIA INDUZIDO POR PILOCARPINA

Os animais dos grupos SE-Salina, SE-CMO e SE-Lisado receberam metilescopolamina 1 mg/kg via intraperitoneal (i.p.) (Boehringer, Ingelheim Germany, Binger, Germany, cat, 5194), este pré-tratamento tinha como objetivo atenuar as manifestações periféricas da pilocarpina. Decorridos 30 minutos, ambos os grupos receberam 220 mg/kg de cloridrato de pilocarpina (i.p.) (Sigma, St. Louis, MO, EUA). Foi

considerado SE quando o animal atingiu o grau V da escala de Racine (Racine, 1972), apresentando convulsões tônico-clônicas sustentadas. Aproximadamente 120 minutos após a instalação do SE, foi injetado 10 mg/kg de diazepam (Santiasa Laboratórios Farmacêuticos, Bauru, São Paulo, BR, cat:0801019) (i.p) para interromper as crises em ambos os grupos.

3.3 PREPARO E TRANSPLANTE DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA

As células mononucleares de medula óssea utilizadas foram obtidas a partir de 30 camundongos C57BL/6 EGFP objetivando o transplante em 15 animais do grupo SE-CMO e 15 animais do SE-Lisado. A escolha desta fonte transgênica de célula doadora se deu devido à expressão da proteína verde fluorescente no citoplasma desta célula, de modo a poder ser facilmente identificada no tecido com ajuda de anticorpos (imunofluorescência) ou por primers específicos (PCR). Para a obtenção destas células inicialmente os camundongos foram anestesiados com Ketamina/Xilazina (50mg/cada) e em seguida dissecados, isolando os ossos longos e tíbia. A tíbia e o fêmur foram utilizados como fonte de células-tronco devido à fácil obtenção de um grande número de células nestas regiões ósseas. As epífises foram seccionadas permitindo a lavagem da cavidade óssea obtendo-se um lavado de medula que foi ressuspensão em DMEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium – GibcoBRL, cat:11054) sem soro e centrifugadas a 1.500 rpm por 10 minutos. O *pellet* obtido foi ressuspensão em DMEM sem soro, adicionado gentamicina e transferido para um tubo de 15 mL com a adição de Ficoll-Paque (densidade 1.077 g/mL – G&E, cat:171440-02) na mesma proporção da suspensão utilizada (diluição Ficoll: meio de 1:1), evitando que as duas fases líquidas se misturem. Esta mistura foi centrifugada a 2.000 rpm durante 15 minutos à temperatura ambiente, sem freio. A seguir, coletou-se o anel de células na interface Ficoll-células e posto em uma ressuspensão em solução DMEM com gentamicina, respeitando a diluição 1:5 (Células/DMEM). Centrifugou-se novamente a 1.500 rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente, desprezando o sobrenadante.

Após a última lavagem, o *pellet* foi ressuspensão em DMEM com 20% de soro fetal bovino (SFB – StemCell Technology), e a viabilidade celular foi avaliada utilizando Trypan Blue (GibcoBRL). Ao final, as CMO foram injetadas via plexo orbital dos animais experimentais na concentração de 1×10^7 . As células destinadas ao grupo Lisado seguiram a mesma metodologia empregada no preparo das CMO, porém ao término da quantificação e avaliação da viabilidade estas células foram submetidas à lise celular por choque térmico. O procedimento utilizado para efetuar a lise inicia-se com a transferência do conteúdo celular para um tubo de criopreservação. Em seguida, estas células foram submetidas a episódios seqüenciais de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria 37°C. Esta seqüência foi repetida até lise total das células, observada em microscópio óptico (Olympus CKX4). A preparação de células lisadas foi administrada pela mesma via utilizada no grupo SE-CMO.

3.4 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, após estarem anestesiados por a aplicação intraperitoneal da solução de quetamina (Ketamin-S+, da Cristália) 50 mg/mL e xilazina (Anasedan, da Vetbrands) 50 mg/mL na proporção de 0,1 mL/10 g de peso do animal. Ao atingir o máximo grau anestésico os animais tiveram o sangue coletado através de punção cardíaca. Após o sacrifício, os animais tiveram o segmento cefálico manipulado em ambiente estéril (Fluxo Laminar da marca VECO, cat:VLFS-09) para evitar a degradação do material pela ação de RNAses. Os encéfalos foram retirados e tiveram os seus hemisférios separados para diferentes finalidades. Um hemisfério de cada animal foi imerso em nitrogênio líquido para prover o rápido congelamento e evitar contaminações. Em seguida, foram armazenados para conservação em freezer -80° C até o momento da extração de RNA das amostras. O outro hemisfério foi fixado com formol 10% e posteriormente submetida inclusão em blocos de parafina. As secções obtidas deste material foram utilizadas para as marcações de imunofluorescência, com o intuito de avaliar a migração das células transplantadas e a perda neuronal.

3.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR qRT-PCR (PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL)

3.5.1 Extração de RNA

O RNA total foi isolado pelo método TRIZOL (Life technologies, EUA), de acordo com a metodologia proposta pelo fabricante. Posteriormente, realizou-se checagem em gel de agarose 1% e quantificação por espectrofotometria em comprimento de onda de 260 nm.

3.5.2 Síntese de cDNA

Para a síntese do cDNA foi utilizado o kit de transcrição reversa *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems). Dois microgramas de RNA total foram adicionados 5 µL de Random primers, 5 µL de 10X First Strand Buffer, 2 µL de DNTP 10 mM, 3 µL de Enzima *Multiscribe*, todos da marca Applied Biosystems. Foi adicionada água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) em quantidade suficiente para completar um volume final de 50 µL. Essa mistura foi incubada a 25°C por 10 minutos e a 37°C por duas horas. O armazenamento foi realizado a 4°C.

3.5.3 Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real

A análise da expressão dos genes codificadores de citocinas inflamatórias foi feita por PCR em tempo real. As reações foram preparadas em placas de 96 poços utilizando o reagente Taqman Universal Master Mix (Applied Biosystems) e o equipamento 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems).

As sondas utilizadas e as reações de amplificação foram feitas de acordo com as especificações propostas pelo fabricante. As reações foram preparadas em triplicatas em um volume final de 20 μ L. As condições da reação para todos os genes avaliados envolveram 10 minutos a 95°C para ativação da polimerase e quarenta ciclos a 95°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto. O máximo coeficiente de variação permitido entre as triplicatas foi de 1%. Nos casos em que esse valor for superior o experimento deveria ser repetido.

A escolha dos normalizadores utilizados foi feita com o auxílio do programa BestKeeper, disponível no site <http://gene-quantification.com/bestkeeper.html>. Foram testados três potenciais genes normalizadores: *TUBA1C*, *GAPDH* e *HPRT*.

A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada utilizando-se o modelo matemático denominado delta CT. Neste modelo, é feita a comparação dos valores de CT obtidos para uma determinada amostra de interesse e os valores de CT obtidos para uma amostra calibradora ou de referência. Em ambos os casos, os valores de CT obtidos para o gene alvo são normalizados com um gene endógeno de expressão constante ou similar em todas as amostras avaliadas. Usando este método, os dados foram representados como diferenças (em vezes) na expressão gênica, que foi normalizada para um gene endógeno de referência e é relativa a um controle ou calibrador. No experimento, o calibrador usado foi o valor da média da expressão dos genes nas células de animais do grupo controle. Foram avaliados os genes: IL-1 β , IL-4, IL-6, IL10, TNF α e TGF β .

3.6 IMUNOFLUORESCENCIA E MIGRAÇÃO CELULAR

As avaliações a seguir foram realizadas em material incluído em parafina. Os encéfalos foram seccionados em micrótomo, para produção de cortes de espessura de 3 μ m que foram desparafinizados com diluições gradativas de álcool (100, 85, 70 e 30%). Ao final da etapa foi realizada a recuperação antigênica por calor empregando a solução *retrieval antigenic* (zymed, cat: 4-5000), de acordo com as especificações do fabricante. Em seguida, foi efetuado o bloqueio da biotina endógena utilizando o kit *avidin-biotin*

(Vector laboratories Burlingame, US, cat: SP-2001), segundo o protocolo determinado pelo fabricante. As lâminas foram lavadas em PBS 3 vezes por 5 minutos cada, e em seguida incubadas overnight (16 a 18h/ 4°C) com os anticorpos primários para o marcador de núcleo neuronal (NeuN, Neomarker, Fremont, CA 94538 USA, cat: MAB3778) e receptor de IL-1 (IRAK 4, Cayman, Michigan, USA, cat :13845). Ao término da incubação, as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS tween e mais duas vezes com PBS por 5 min, em cada uma das soluções, e ao final incubadas com streptavidina (Streptavidin A555, molecular probes cat: S-32355) e anti-rabbit 488 (Goat-anti-rabbit conj. Alexafluor 488, Molecular Probes-Invitrogen, Carlsbad,USA A-11008) por 1 hora a temperatura ambiente, revelando respectivamente NeuN e IL-1R. Por fim as laminas foram mais uma vez lavadas PBS Tween e PBS, com informado anteriormente, e montadas com meio específico contendo o corante nuclear DAPI (VectaShield with DAPI, Vector laboratories Burlingame US. cat: H1200). A avaliação da migração das células transplantadas constituiu na busca da coloração verde fluorescente da proteína GFP, e com esse objetivo as lâminas foram montadas com o meio contendo o corante DAPI. A análise do material foi efetuada através da observação das lâminas no microscópio confocal (Olympus Fluoview 1000) fotografadas no aumento de 40x.

A quantificação neuronal através da marcação para NeuN e IL-1R foram efetuadas a partir de 2 lâminas de cada animal contendo 2 cortes em cada uma delas, em 5 animais escolhidos aleatoriamente em cada grupo experimental. A contagem dos neurônios marcados foi realizada utilizando o software (Image pro plus versão 7.1) em um quadrante (AOI) de $104.400 \mu\text{m}^2$ nas três regiões de interesse, CA1, CA3 e hilo do GD.

Objetivando sumarizar a metodologia apresentada, a **Figura 6** ilustra de forma simplificada as etapas realizadas neste estudo.

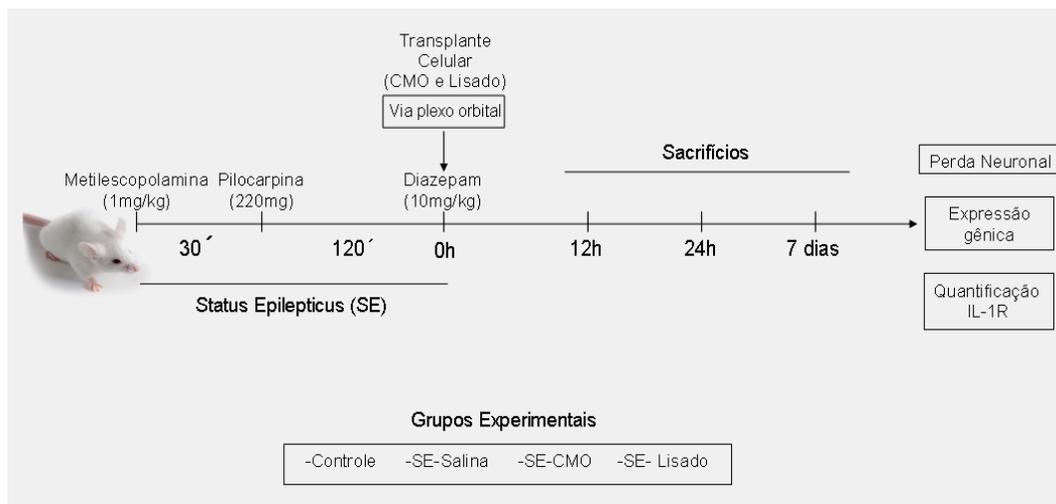


Figura 6: Representação do desenho experimental: Os animais foram induzidos ao SE através da aplicação de metilescopolamina, e pilocarpina. Após 120 minutos as crises foram bloqueadas com diazepam. Os animais foram divididos em 4 grupos. O grupo Salina constitui de animais normais não induzidos, enquanto os animais dos grupos, SE-Salina, SE-Lisado e SE-CMO, são animais epilépticos que foram transplantados com células de medula óssea, lisada e integra, respectivamente. Os animais foram sacrificados nos tempos de 12 e 24 horas e 7 dias, sendo avaliada a perda neuronal, e a expressão gênica de citocinas inflamatórias .

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas dos dados foram realizadas com o uso do software GraphPad Prisma (versão 4.01, *GraphPad Software Inc.EUA*) e os dados foram expressos na forma de média (\pm erro padrão), onde valores de *P* menores de 0,05 são considerados estatisticamente significantes.. A análise da expressão gênica através da metodologia RT-PCR utilizou como ferramenta estatística o teste ANOVA de duas vias com pós-teste Bonferroni. As quantificações de perda neuronal tiveram suas análises utilizando ANOVA de uma via com pós-teste de Turkey, enquanto as quantificações de receptor IL-1 (IL-1R) utilizaram ANOVA de uma via com pós-teste de Turkey.

4 RESULTADOS

4.1 INDUÇÃO DO MODELO DE EPILEPSIA

Para realização deste experimento foram utilizados 78 camundongos *swiss* (60 induzidos e 18 controles), após a submissão do SE com uma única dose de pilocarpina observou-se uma mortalidade de aproximadamente 48%. Devido a esta elevada mortalidade, foi necessária a indução de novos grupos experimentais. Assim, foram induzidos 3 grupos de 30 animais para compor os experimentos de 12 h, 24 h e 7 dias pós-transplante, além do uso de 18 animais controle, resultando em 6 animais para cada tempo de sacrifício realizado. Os animais empregados em nosso estudo apresentaram uma média de peso (g) de $40,26 \pm 0,90$ e idade média 60 dias. A média do tempo de latência (min) das crises durante o SE foi de $12,18 \pm 1,71$.

4.2 EXPRESSÃO DE CITOCINAS NO CÉREBRO

Os resultados a seguir representam a variação de expressão das citocinas pró- e anti-inflamatórias avaliadas neste trabalho através da metodologia de qRT-PCR. As citocinas pró-inflamatórias mensuradas foram: IL-1 β , IL-6 e TNF α , enquanto as anti-inflamatórias foram: IL-4, IL-10 e TGF β . Os dados representam, em valores relativos à quantidade de vezes a expressão de RNAm para as citocinas inflamatórias analisadas.

4.2.1 Avaliação da expressão cerebral de IL-1 β

A quantificação de IL-1 β após 12 h do SE indica uma elevação de ~15 vezes na expressão desta interleucina no grupo SE-Salina em relação ao grupo Controle ($p < 0,001$). O comparativo do grupo SE-Lisado com o Controle revelou um aumento de ~20 vezes na expressão do gene desta citocina ($p < 0,001$). Em oposição aos achados citados, o grupo SE-CMO apresentou uma reduzida expressão do gene de IL-1 β , semelhante aos animais

Controle, não apresentando diferença estatística entre os dois grupos. O comparativo entre os dois tratamentos celulares empregados demonstrou uma clara distinção entre os SE-Lisado e SE-CMO, apresentando de um aumento de expressão em ~7 vezes do grupo Lisado.

Após 24 horas do SE foi observada uma elevação da expressão de RNAm no grupo SE-Salina, encontrado aumento de ~9 vezes na expressão de IL-1 β em comparação ao grupo Controle. Neste período, os demais grupos experimentais (SE-Salina-CMO e SE-Lisado) apresentaram valores de expressão semelhante ao grupo Controle, não havendo diferença estatística entre eles.

A análise da expressão de IL-1 β não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos no período de 7 dias após o SE (**Figura7**).

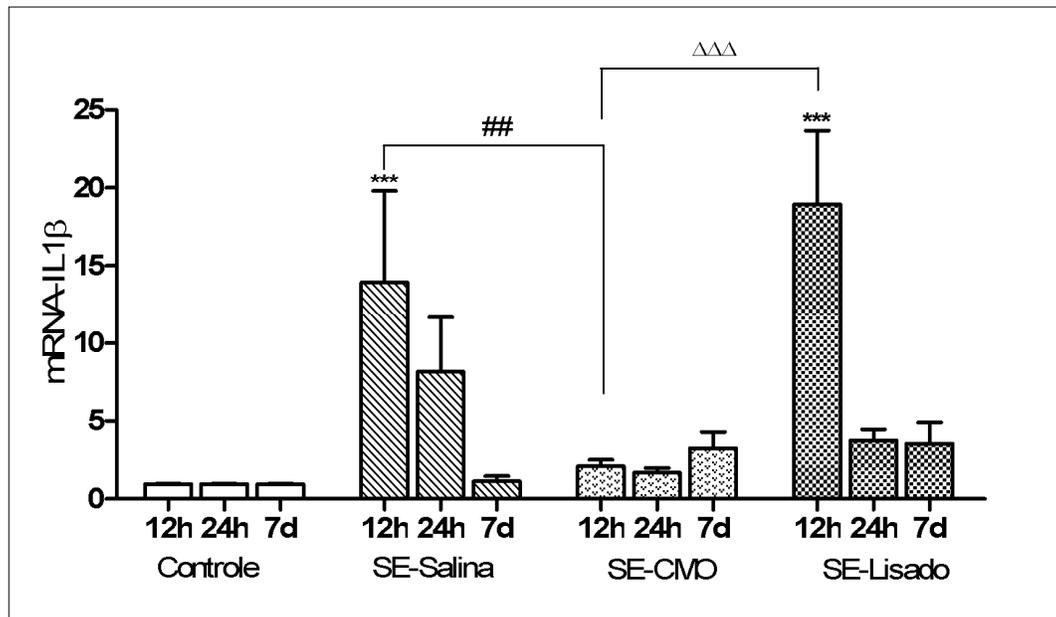


Figura 7: Quantificação da expressão de RNAm da citocina IL-1 β no cérebro de camundongos. O gráfico apresentado em barras ilustra os valores de média \pm DP (número de vezes expresso) dos grupos Controle (n=6), SE-Salina (n=5), SE-CMO (n=7) e SE-Lisado (n=6) nos tempos de 12 h, 24 h e 7 dias após a sua

indução. Foi utilizado nesta análise o teste ANOVA de 2 vias seguido de pos-teste de Bonferroni. Os valores de significância encontrados no comparativo ao grupo Controle apresentaram-se com a simbologia (** $p < 0,001$); comparativos ao grupo SE-Salina receberam o símbolo ($\#p < 0,01$). Os comparativos realizados ao grupo SE-CMO foram simbolizado por ($\Delta\Delta\Delta p < 0,001$).

4.2.2 Avaliação da expressão cerebral de IL-4

A análise da expressão do gene da interleucina 4 revelou um perfil de similaridade entre os grupos Controle e SE-Salina, quando avaliados 12 h após a indução do SE. Em oposição a este achado, foi encontrado uma expressão ~ 4 vezes maior nos grupos SE-CMO e SE-Lisado comparado aos grupo Controle e SE-Salina ($p < 0,001$).

A avaliação da expressão do gene de IL-4 nos períodos de 24 h e 7 dias mostrou-se semelhante em todos grupos experimentais analisados, não apresentando diferença estatística entre eles (**Figura 8**).

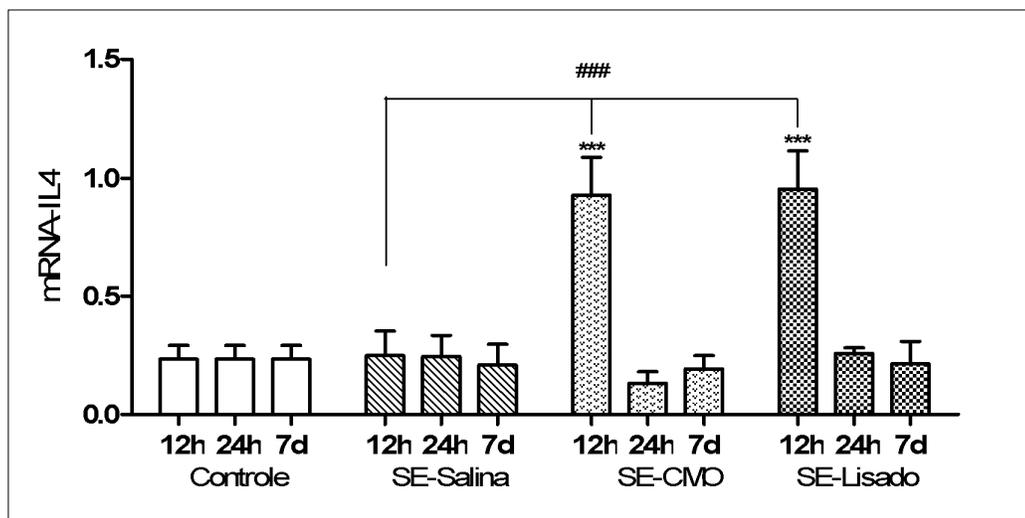


Figura 8: Quantificação da expressão de RNAm da citocina IL-4 no cérebro. O gráfico apresentado em barras ilustra os valores de média \pm DP (número de vezes expresso) dos grupos Controle (n=6), SE-Salina (n=5), SE-CMO (n=7) e SE-Lisado (n=6) nos tempos de 12 h, 24 h e 7 dias após a sua indução. Foi utilizado nesta análise o teste ANOVA de 2 seguido de pós-teste de Bonferroni Os valores de significância encontrados no comparativo ao grupo Controle apresentaram-se com a simbologia (** $p < 0,001$); comparativos ao grupo SE-Salina receberam o símbolo ($\#p < 0,01$).

4.2.3 Avaliação da expressão cerebral de IL-6

Após 12 h do SE, a análise da IL-6 revelou uma elevada diferença de expressão nos grupos SE-Salina e SE-Lisado quando comparados ao controle experimental, aumentando respectivamente ~35 vezes e ~ 43 vezes ($p < 0,001$). No grupo SE-CMO a expressão do gene de IL-6 apresentou um aumento de ~11 vezes em comparação ao controle ($p < 0,01$).

Após 24 h da indução do SE observamos o grupo SE-Salina apresentou uma aumento de ~35 vezes na expressão de IL-6 comparada ao grupo Controle ($***p < 0,001$). O grupo tratado com CMO apresentou um aumento em ~11 vezes da expressão desta citocina comparado ao grupo Controle ($p < 0,01$). No grupo tratado com lisado celular (SE-Lisado) observou-se uma elevação de ~26 vezes na expressão de IL-6 em relação ao controle ($p < 0,001$), e uma expressão ~2 vezes maior que a encontrada no grupo SE-CMO ($p < 0,01$).

Após 7 dias da indução do SE foi observado um perfil de similaridade entre os grupos estudados. A comparação entre os diferentes valores de expressão desta interleucina não demonstrou diferença estatística entre grupos neste último período (**Figura 9**).

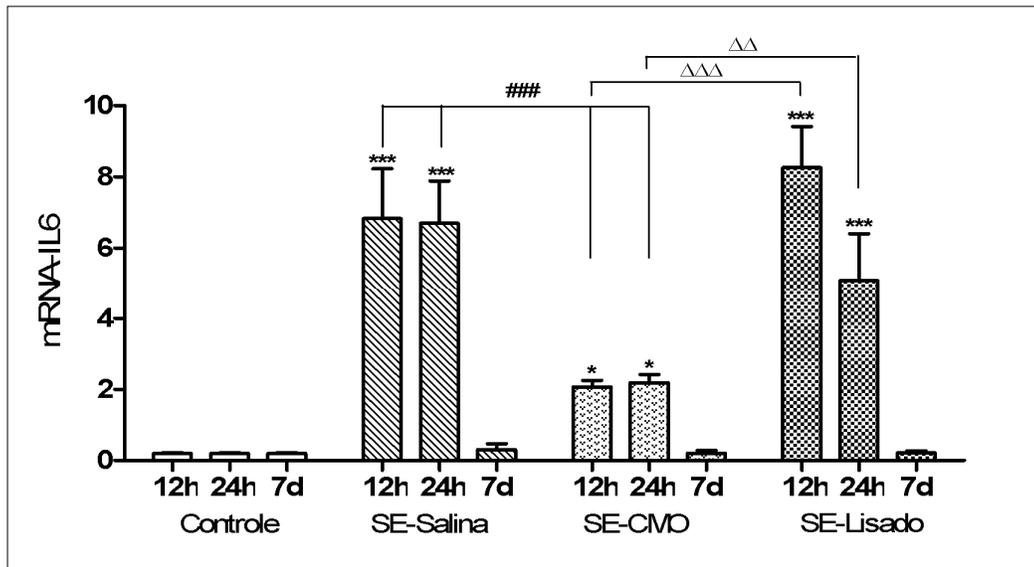


Figura 9: Quantificação da expressão de RNAm da citocina IL-6 no cérebro. O gráfico apresentado em barras ilustra os valores de média \pm DP (número de vezes expresso) dos grupos Controle (n=6), SE-Salina (n=5), SE-CMO (n=7) e SE-Lisado (n=6) nos tempos de 12 h, 24 h e 7 dias após a sua indução. Foi utilizado nesta análise o teste ANOVA de 2 seguido de pós-teste de Bonferroni. Os valores de significância encontrados no comparativo ao grupo Controle apresentaram-se com a simbologia (***) $p < 0,001$; (*) $p < 0,5$; comparativos ao grupo SE-Salina receberam o símbolo (###) $p < 0,001$. Os comparativos realizados ao grupo SE-CMO foram simbolizado por ($\Delta\Delta$ $p < 0,01$; $\Delta\Delta\Delta$ $p < 0,001$)

4.2.4 Avaliação da expressão cerebral de IL-10

A avaliação da expressão de RNAm para a citocina IL-10 foi semelhante nos grupos Controle e SE-Salina. Após 12 h do SE foi possível observar nos referidos grupos reduzidos títulos de expressão para a interleucina 10. Em contrapartida um aumento significativo da expressão desta citocina foi encontrado nos grupos SE-CMO e SE-Lisado, respectivamente ~ 3 e ~ 5 vezes comparado ao controle ($p < 0,001$).

No período de 24 h após a indução do SE foi encontrado um reduzido valor de expressão desta interleucina nos grupos Controle, SE-Salina e SE-CMO. No grupo SE-

Lisado a expressão de IL-10 foi de ~3 vezes maior que o grupo Controle do mesmo período ($p < 0,05$).

Após 7 dias do SE foi possível observar uma perfil de semelhança entre os grupos avaliados caracterizado pelo ausência de diferença estatística neste tempo (**Figura 10**).

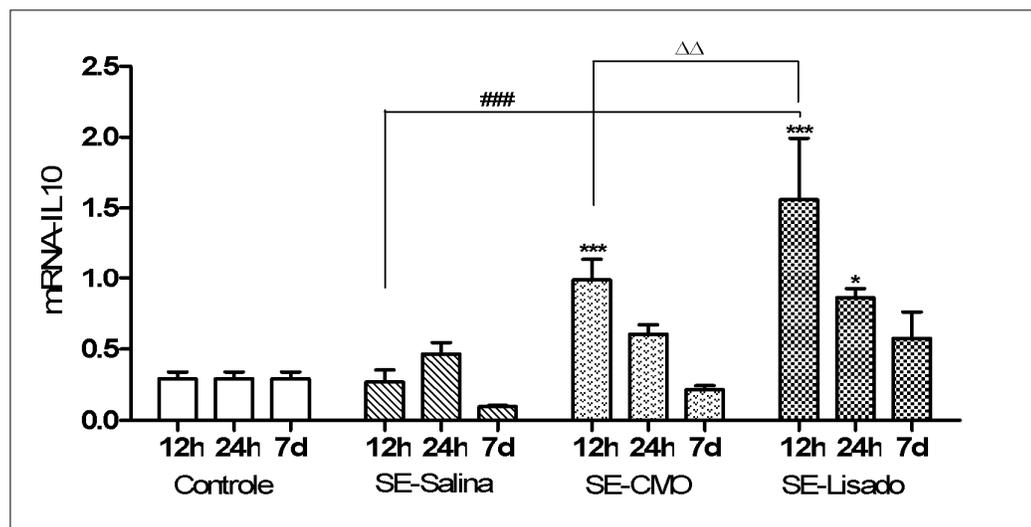


Figura 10: Quantificação da expressão de RNAm da citocina IL-10 no cérebro. O gráfico apresentado em barras ilustra os valores de média \pm DP (número de vezes expresso) dos grupos Controle ($n=6$), SE-Salina ($n=5$), SE-CMO ($n=7$) e SE-Lisado ($n=6$) nos tempos de 12 h, 24 h e 7 dias após a sua indução. Foi utilizado nesta análise o teste ANOVA de 2 vias, seguido de pós-teste de Bonferroni. Os valores de significância encontrados no comparativo ao grupo Controle apresentaram-se com a simbologia (***) $p < 0,001$; (*) $p < 0,05$; comparativos ao grupo SE-Salina receberam o símbolo (###) $p < 0,001$. Os comparativos realizados ao grupo SE-CMO foram simbolizado por ($\Delta\Delta$) $p < 0,01$.

4.2.5 Avaliação da expressão cerebral de TGF β

Os valores de expressão de RNAm para TGF β no período de 12 h após a indução do SE apresentam-se igualmente estáveis nos grupos Controle e SE-Salina. A análise dos valores médios de SE-CMO indicou uma elevação desta expressão em ~3 vezes ($p < 0,01$),

aumento que se faz presente também no grupo SE-Lisado em ~ 2,6 vezes ($p < 0,05$), ambos comparados ao controle experimental. No período de 24 h após a indução foi observada a redução da expressão de TGF β nos grupos SE-CMO e SE-Lisado, indicando um retorno aos níveis basais.

A avaliação 7 dias após o SE apresentou uma reduzida expressão de TGF β nos grupos Controle, SE-Salina e SE-CMO. O grupo SE-Lisado destacou-se por apresentar uma expressão de TGF β ~3,3 vezes maior que os valores médios encontrado em no grupo Controle ($p < 0,01$) (**Figura 11**).

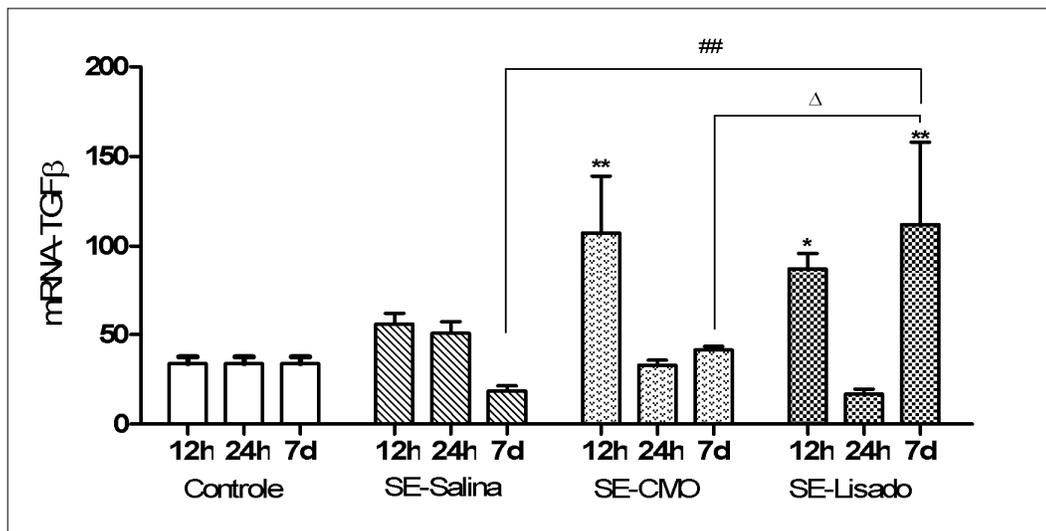


Figura 11: Quantificação da expressão de RNAm da citocina TGF β no cérebro. O gráfico apresentado em barras ilustra os valores de média \pm DP (número de vezes expresso) dos grupos Controle (n=6), SE-Salina (n=5), SE-CMO (n=7) e SE-Lisado (n=6) nos tempos de 12 h, 24 h e 7 dias após a sua indução. Foi utilizado nesta análise o teste ANOVA de 2 vias seguido de pós-teste de Bonferroni. Os valores de significância encontrados no comparativo ao grupo Controle apresentaram-se com a simbologia (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$); comparativos ao grupo SE-Salina receberam o símbolo (## $p < 0,01$). Os comparativos realizados ao grupo SE-CMO foram simbolizado por (Δ $p < 0,05$).

4.2.6 Avaliação da expressão cerebral de TNF α

Após 12 h da indução do SE foi observado um aumento de ~ 62, ~ 65 e ~ 48 vezes na expressão de RNAm para TNF α nos grupos SE-Salina, SE-CMO e SE-Lisado, respectivamente, quando comparados ao grupo Controle experimental ($p < 0,001$).

Após as primeiras 24 h, os dados apresentados mostram que a indução da epilepsia foi capaz de perpetuar os altos níveis de expressão de TNF α nos grupos tratados, diferindo significativamente do controle experimental. O grupo SE-Saline apresentou uma expressão ~ 64 vezes aumentada em relação ao grupo Controle ($p < 0,001$). As análises revelaram uma redução da expressão de RNAm para TNF α nos grupos SE-CMO e SE-Lisado. A análise dos resultados obtidos no período de 7 dias após o SE permitiu observar uma redução na expressão desta citocina em todos os grupos avaliados. (Figura 12).

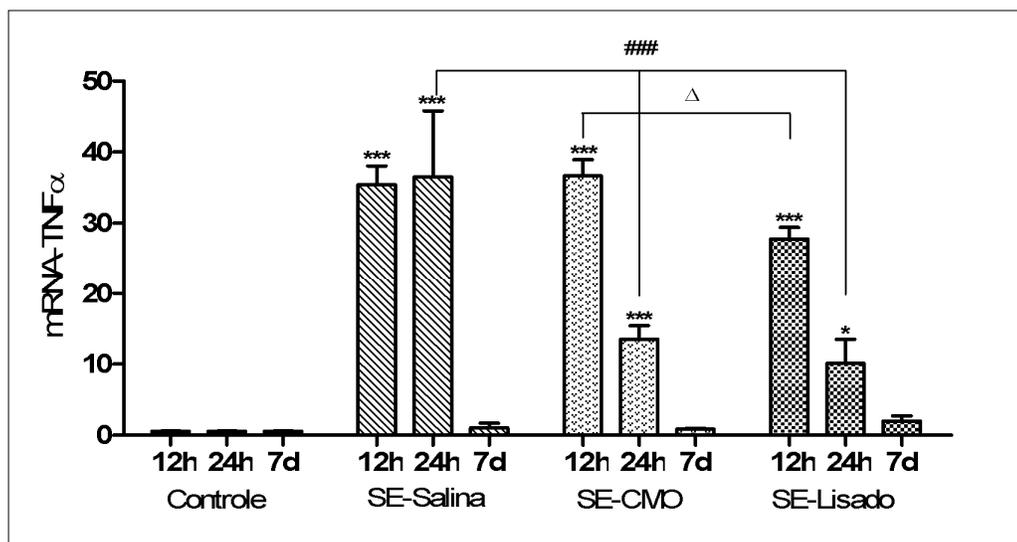


Figura 12: Quantificação da expressão de RNAm da citocina TNF α no cérebro. O gráfico apresentado em barras ilustra os valores de média \pm DP (número de neurônios/campo) dos grupos Controle ($n=6$), SE-Salina ($n=5$), SE-CMO ($n=7$) e SE-Lisado ($n=6$) nos tempos de 12 h, 24 h e 7 dias após a sua indução. Foi utilizado nesta análise o teste ANOVA de 2 vias seguido de pos-teste de Bonferroni. Os valores de significância encontrados no comparativo ao grupo Controle apresentaram-se com a simbologia (***) $p < 0,001$; * $p < 0,05$; comparativos ao grupo SE-Salina receberam o símbolo (###) $p < 0,001$. Os comparativos realizados ao grupo SE-CMO foram simbolizado por (Δ) $p < 0,05$

A Tabela 1 apresenta um resumo dos dados de expressão de citocinas no cérebro obtidos no presente estudo.

Tabela 1: Sumário dos achados da expressão de citocinas no cérebro

	12 horas			24 horas			7 dias		
	SE Salina	SE CMO	SE Lisado	SE Salina	SE CMO	SE Lisado	SE Salina	SE CMO	SE Lisado
IL-1 β	+++	-	+++	++	-	-	-	-	-
IL-6	+++	+	+++	+++	+	+++	-	-	-
TNF α	+++	+++	+++	+++	+	+	-	-	-
TGF β	-	++	++	-	-	-	-	-	++
IL-4	-	+++	+++	-	-	-	-	-	-
IL-10	-	+++	+++	-	+	+	-	-	-

Expressão baixa (-), moderada (+), elevada (++) e muito elevada (+++).

4.3 AVALIAÇÃO DA PERDA NEURONAL

Os resultados obtidos constituem uma análise do hipocampo através da quantificação neuronal das regiões de CA1, CA3 e hilo do GD, possibilitando a observação do efeito dos diferentes tratamentos 24 h e 7 dias após a indução do SE. Os resultados dessa análise encontram-se estratificados por região anatômica.

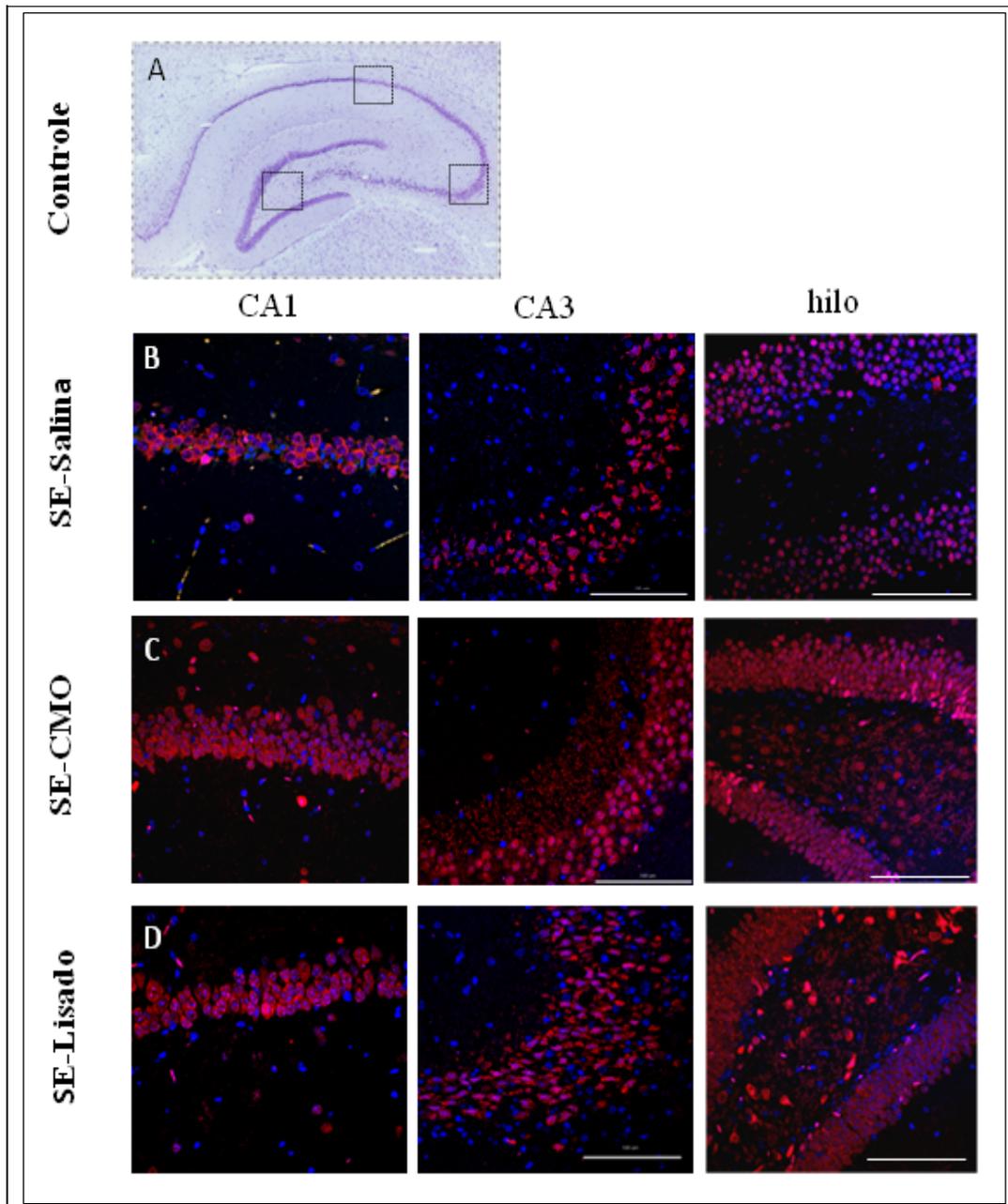


Figura 13: Painel com microfotografias da quantificação da perda neuronal na região hipocampal 24 h após o SE. (A) exemplo de um hipocampo do animal controle. As subáreas de CA1, CA3 e do hilo do GD nos grupos (B) SE-Salina, (C) SE-CMO e em (D) SE-Lisado. Em azul, marcador nuclear Dapi e em vermelho, o marcador neuronal NeuN. Calibração de 100µm (aumento de 40x1).

4.3.1 Avaliação neuronal da região CA1

A quantificação neuronal realizada na região anatômica de CA1 encontrou valores de 134.4 ± 3.40 (AOI:104,400 μm^2) no grupo Controle. A quantificação da região de CA1 permitiu identificar diferenças estatísticas entre o controle e os grupos SE-Salina e SE-Lisado ($p < 0,001$), no grupo SE-CMO a quantificação foi semelhante ao controle.

Após 24 h após o SE foi encontrada uma redução de 64% no número de neurônios no grupo SE-Salina quando comparado ao controle ($p < 0,001$). Nos animais tratados com células mononucleares (SE-CMO) não foi observado perda neuronal. Ao comparar os grupos SE-Salina e SE-CMO constatou-se que o SE-Salina apresentou uma maior perda ($p < 0,001$). No grupo SE-Lisado a perda neuronal foi maior quando comparada aos grupos Controle e SE-CMO ($p < 0,001$).

Após 7 dias da aplicação do agente indutor da epilepsia, observa-se uma redução de 61% no grupo SE-Salina quando comparados ao grupo Controle. Nos grupos tratados com CMO e lisado celular (SE-Lisado), apenas o grupo SE-Lisado apresentou uma perda celular significativa ($p < 0,001$) em relação ao controle (**Figura 14**).

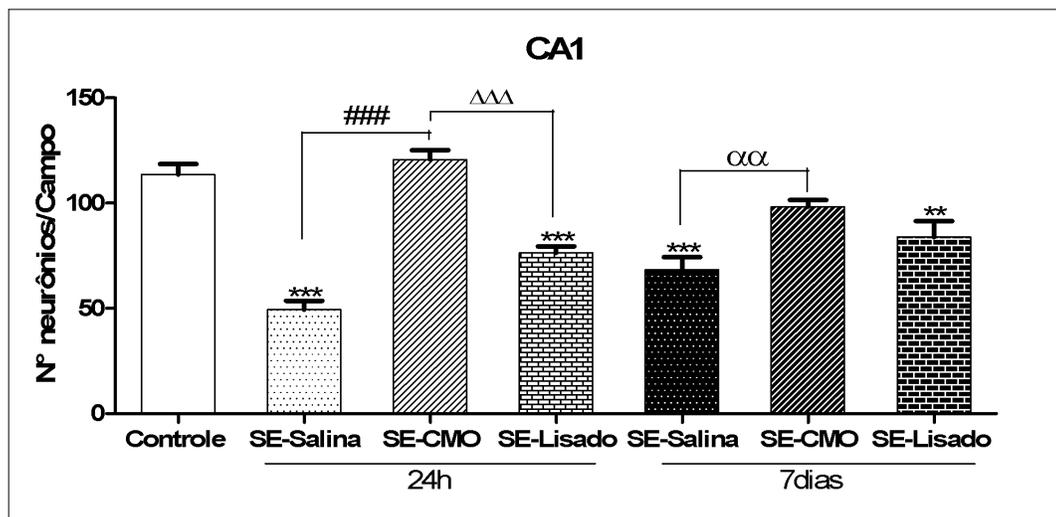


Figura 14: Quantificação de perda neuronal na região anatômica de CA1. Avaliação do número de neurônios por campo em camundongos submetidos ao SE por pilocarpina. O gráfico apresentado em barras ilustra os valores de média \pm DP (número de neurônios/campo) dos grupos Controle (n=6), SE-Salina (n=5), SE-CMO (n=7) e SE-Lisado (n=6) nos tempos de 24 h e 7 dias após a sua indução comparados ao grupo Controle, não induzido. Foi utilizado nesta análise o teste ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Turkey. Os valores de significância encontrados no comparativo ao grupo Controle apresentaram-se com a simbologia (***) $p < 0,001$; (***) $p < 0,01$; comparativos ao grupo SE-Salina 24 horas receberam o símbolo (###) $p < 0,001$. Os comparativos realizados ao grupo SE-Lisado foram simbolizado por ($\Delta\Delta\Delta$) $p < 0,001$. Por fim os comparativos ao grupo SE-Salina 7 dias apresentaram-se com o símbolo ($\alpha\alpha$) $p < 0,01$.

4.3.2 Avaliação neuronal da região CA3

A avaliação neuronal desta região revelou uma reduzida perda neural no período de 24h após o SE, sendo possível observar uma homogeneidade no número de neurônios nos diferentes grupos, não possuindo diferença estatística entre os grupos.

A análise no tempo 7 dias mostrou uma redução de 79% no número de neurônios do grupo SE-Salina quando comparado ao grupo Controle ($p < 0,001$). Os grupos tratados com CMO e Lisado apresentaram uma menor perda neural em relação ao controle. (**Figura 15**).

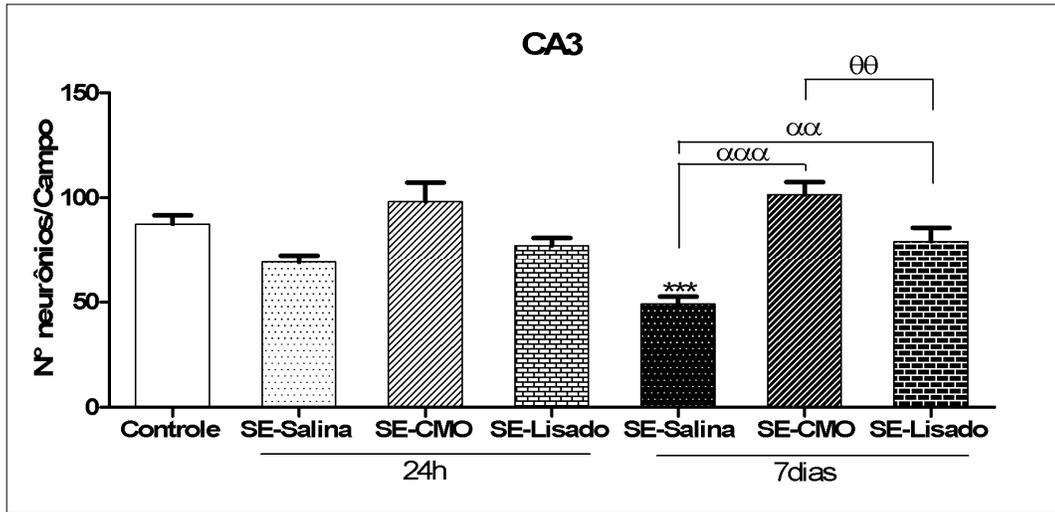


Figura 15: Quantificação de perda neuronal na região anatômica de CA3. Avaliação do número de neurônios por campo em camundongos submetidos ao SE por pilocarpina. O gráfico apresentado em barras ilustra os valores de média \pm DP (número de neurônios/campo) dos grupos Controle (n=6), SE-Salina (n=5), SE-CMO (n=7) e SE-Lisado (n=6) nos tempos de 24h e 7 dias após a sua indução comparados a um grupo Controle, não induzido. Foi utilizado nesta análise o teste ANOVA de uma via seguido de pós-teste Turkey. Os valores de significância encontrados no comparativo ao grupo Controle apresentaram-se com a simbologia (***) $p < 0,001$; os comparativos ao grupo SE-Salina 7 dias apresentaram-se com o símbolo ($\alpha\alpha$) $p < 0,01$; e os comparativos com o grupo SE-Lisado apresentaram o símbolo (θ) $p < 0,5$.

4.3.3 Avaliação neuronal da região do hilo do giro denteado

A quantificação neuronal realizada na região do hilo do giro denteado foi caracterizada pela reduzida variação entre os grupos. O comparativo deste grupo com os demais apresentou diferença estatística apenas com o grupo SE-Lisado 24 h, com uma redução 47% ($p < 0,001$) no número de neurônios em relação ao controle. Após 7 dias da indução do SE não foi demonstrado uma perda neuronal significativa entre os grupos (**Figura 16**).

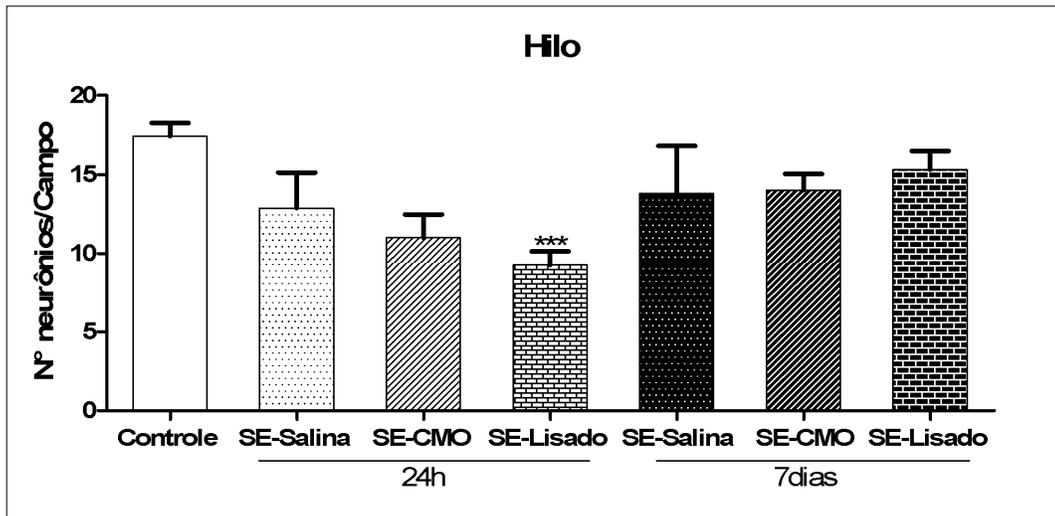


Figura 16: Quantificação de perda neuronal na região anatômica do hilo. Avaliação do número de neurônios por campo em camundongos submetidos ao SE por pilocarpina. O gráfico apresentado em barras ilustra os valores de média \pm DP (número de neurônios/campo) dos grupos Controle (n=6), SE-Salina (n=5), SE-CMO (n=7) e SE-Lisado (n=6) nos tempos de 24 h e 7 dias após a sua indução comparados a um grupo Controle, não induzido. Foi utilizado nesta análise o teste de ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Turkey. Os valores de significância encontrados no comparativo ao grupo Controle apresentaram-se com a simbologia (***) $p < 0,001$.

4.4 ANÁLISE DA MIGRAÇÃO CELULAR

A avaliação da migração das células GFP⁺ no cérebro foi realizada 24 horas após a indução do SE. Em nossas análises observamos um reduzido número de células transplantadas na região hipocampal (**Figura 17**).

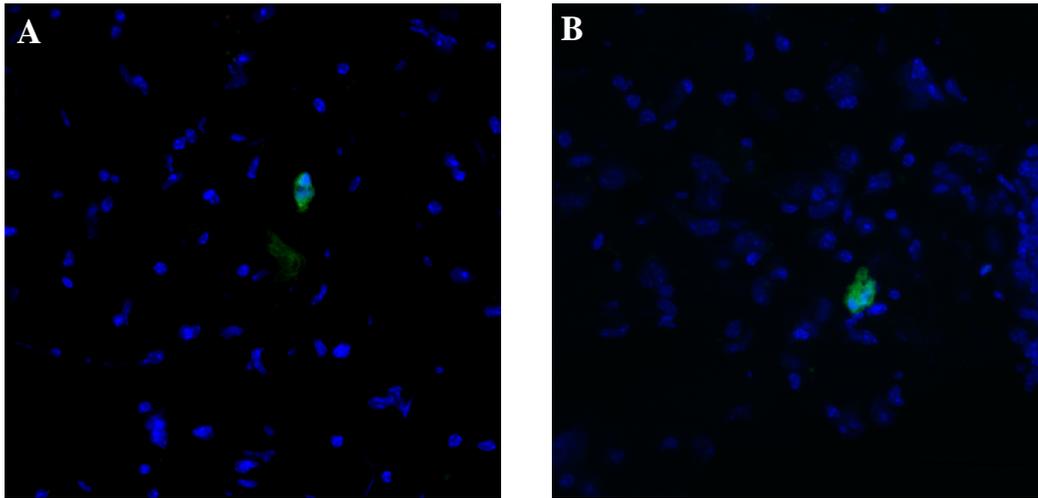


Figura 17: Migração das células transplantadas. Ilustração da migração das células transplantadas 24 h após indução do SE. Encontra-se marcados em verde as células transplantadas GFP⁺ e corados em azul o DAPI, marcador nuclear. Calibração de 100µm (aumento de 40x1).

4.5 QUANTIFICAÇÃO DO IL-1 RECEPTOR NO CÉREBRO

A quantificação do receptor IL-1 em cortes do hipocampo em ambos os grupos experimentais demonstrou que os animais tratados com as CMO apresentaram uma menor expressão desta receptor. No entanto no grupo SE-Salina possuía uma grande expressão do receptor IL- 1(**Figura 18 e 19**).

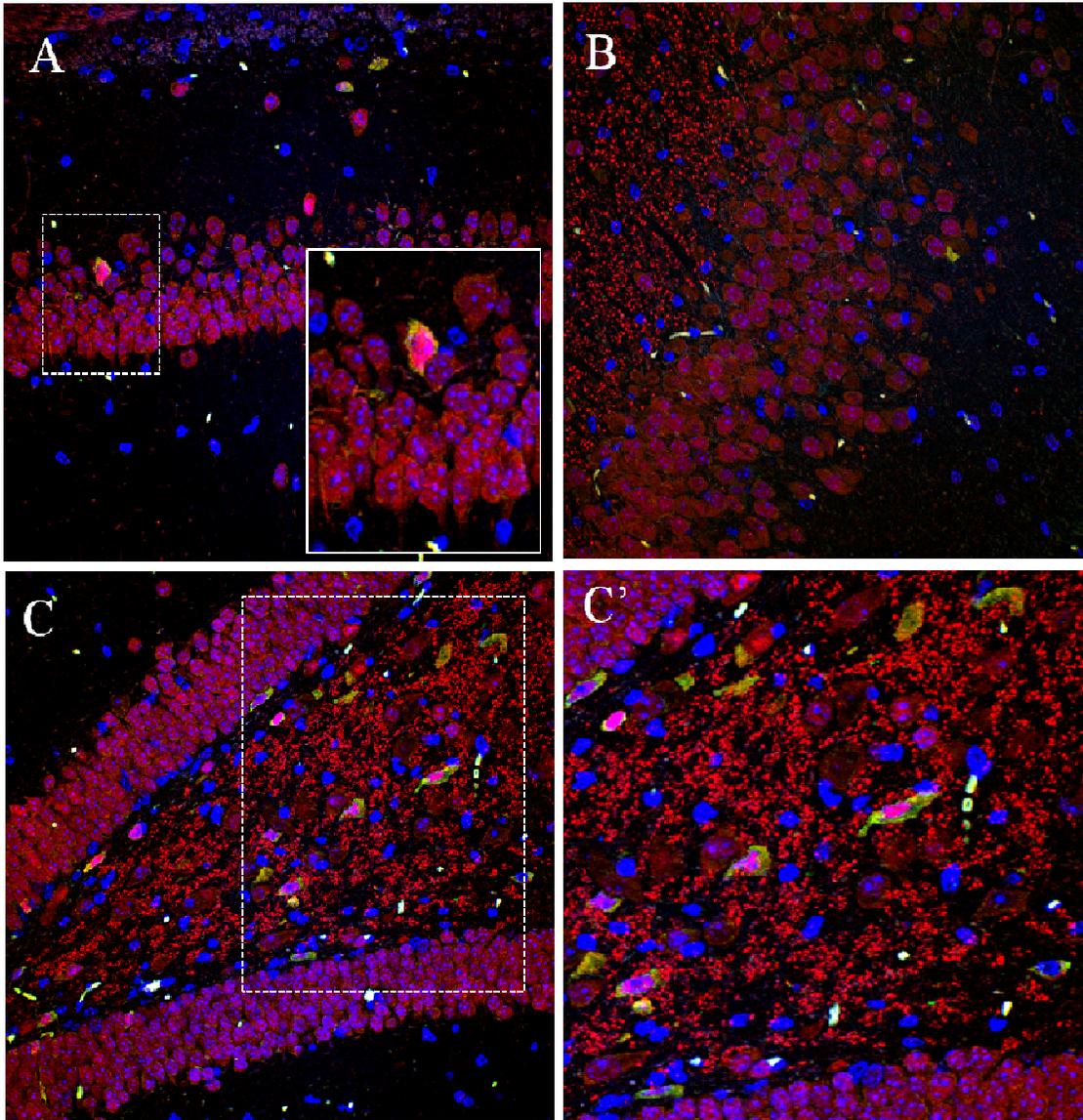


Figura 18: Expressão de IL-1R no cérebro. O painel com microfotografias representativas da expressão do receptor IL-1 no hipocampo dos animais com SE e tratados com CMO. Em (A) na região de CA1, em (B) na região de CA3 e em (C) na região do hilo do GD. C' representa um zoom do hilo de C. Em vermelho o marcador neuronal NeuN, em azul o marcador nuclear DAPI e em amarelo o marcador do receptor IL-1.

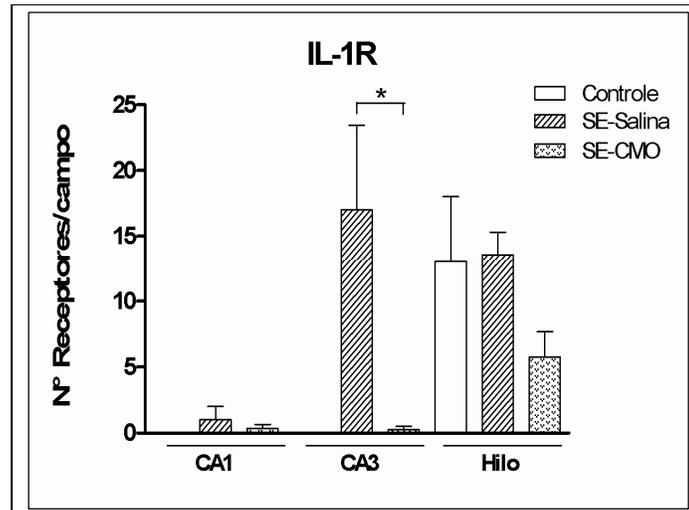


Figura 19: Quantificação do receptor IL-1. O gráfico acima representa a quantificação do receptor de IL-1 nas regiões hipocâmpais de CA1, CA3 e Hilo representando em barras os valores de média \pm DP (número de receptores/campo) dos grupos Controle (n=3), SE-Salina (n=4) e SE-CMO (n=4) 24 h após a sua indução. Foi utilizado nesta análise o teste de ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Turkey. Os valores de significância encontrados no comparativo ao grupo Controle apresentaram-se com a simbologia (* $p < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

O emprego da terapia celular em doenças do SNC tem se revelado uma importante alternativa terapêutica. Recentemente, trabalhos realizados pelo nosso grupo utilizando o modelo experimental de epilepsia, transplantando células da medula óssea, demonstraram eficácia sobre a redução das CERs, relatando a funcionalidade da terapia empregada (COSTA-FERRO *et al.*, 2010). Os expressivos valores de redução das crises encontrados direcionaram a busca de um possível mecanismo de ação destas células em um estudo da neuroinflamação no modelo da epilepsia.

O presente trabalho apresentou como principal objetivo a observação do efeito da terapia com células mononucleares da medula óssea, veiculada em diferentes condições (lisada ou íntegra), sobre a modulação da produção de citocinas. O objetivo do emprego da terapia com células mononucleares na forma lisada (grupo SE-Lisado) foi avaliar o efeito dos componentes produzidos por essas células, obtidos após a sua lise. A análise deste

parâmetro informaria se o efeito de uma célula depende da sua capacidade migratória ou de diferenciação.

Os resultados da expressão de citocinas no tecido cerebral demonstram uma evidente mudança no padrão de expressão de citocinas entre os grupos tratados e não tratados. A análise dos resultados permitiu observar que tais alterações são caracterizadas pela elevação na expressão destas citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF α) nas primeiras horas após o SE (12-24 horas) seguido de uma marcante redução global da expressão cerebral das citocinas no período tardio (7 dias) avaliados neste estudo.

A indução do SE desencadeia a produção de uma série de citocinas pró-inflamatórias que promovem ativações endoteliais e quimiotaxia, direcionando assim uma migração através da barreira hemato-encefálica (GLASS *et al.*, 2010; ALLAN *et al.*, 2005; VEZZANI *et al.*, 2010). Foi demonstrado por Minami e colaboradores (1991), utilizando o modelo de epilepsia induzida por ácido cáinico, uma importante elevação de expressão destas citocinas pró-inflamatórias logo após injeção do agente indutor na região hipocampal.

Em nosso trabalho foram analisadas as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF α . A análise da expressão de IL-1 β revelou uma elevação da sua expressão 12 horas após a indução do SE. Os elevados valores de expressão permanecem até o período de 24 horas retornando aos valores basais após 7 dias. Diversos estudos exemplificam que o aumento dos níveis de IL-1 β é um achado comum a diferentes quadros patológicos. Tutuncuoglu e colaboradores (2001) encontraram uma rápida elevação dos níveis sorológicos destas citocina em pacientes 12 horas após a manifestação de um quadro febril. Lehitmaki e colaboradores (2007) demonstraram o aumento sorológico desta citocina em pacientes com ELT e com epilepsia multifocal imediatamente após crise, assim como IL-1 β encontra-se aumentada no líquido cefalorraquidiano de pacientes com doença febril não-convulsiva 6 horas após a sua manifestação (HASPOLAT *et al.*, 2002).

Em modelos experimentais de epilepsia frequentemente as crises epilépticas encontram-se associadas a uma extensiva injúria neuronal que pode ser acompanhado pela produção de IL-1 β produzidos pelas células da microglia (ALLAN *et al.*, 2003) em resposta à ativação do fator nuclear kappa beta (NF κ B), resultando na produção da mesma citocina (RIJKERS *et al.*, 2009). A presença desta interleucina direciona o aumento as funções de NMDA-R, o influxo de Ca²⁺ e inibe o efluxo de K⁺, e o conjunto das alterações propiciadas pela elevação de IL-1 β contribui para o aumento da excitabilidade neural e a susceptibilidade à crise (MEINI *et al.*, 2000; VIVIANI *et al.*, 2003; ZHUANG *et al.*, 2008). Assim como em estudos experimentais demonstram que as crises epilépticas nas fases aguda e crônica podem ser reduzidas quando inibidores de caspase 1, componente da ativação da IL-1 β , são ministrados (MAROSO *et al.*, 2011).

No nosso estudo, os animais SE induzidos e transplantados com células mononucleares de medula óssea (SE-CMO) apresentaram uma redução da expressão de IL-1 β aos níveis basais. Foi observado que esta redução se fez presente nos tempos iniciais avaliados no estudo (12 e 24 horas). Assim, demonstramos uma possível supressão da expressão de IL-1 β pelas CMO na fase aguda da epilepsia.

Em oposição, o estudo do grupo SE-Lisado revelou uma tendência à elevação da produção de IL-1 β no tempo de 12 horas, semelhante ao grupo não tratado (SE-Salina). Entretanto, no período de 24 horas após o SE as taxas de expressão retornam ao seu valor basal, apresentando um efeito semelhante ao das CMO. O lento retorno aos níveis basais encontrados no grupo SE-Lisado pode ser justificado pela ausência de migração inerente ao conteúdo transplantado.

O papel biológico da IL-1 β apresenta ações antagônicas a sua atividade pró-inflamatória. Recentemente Li e colaboradores (2011) relatam que a produção de pequenas concentrações desta interleucina podem apresentar um efeito anticonvulsivo através do aumento da evocação GABAérgica sem afetar a evocação gluamatérgica do mesmo, resultando na prevenção ao aumento do aporte de Ca²⁺ intracelular reforçando a transmissão GABAérgica. Os estudos realizados por DOCAGNE e colaboradores (2005) e

NISHIYORI e colaboradores (1997) relatam que a dualidade encontrada no efeito desta interleucina reside na resposta à ligação aos receptores IL-1RI ou IL-1RII.

Quando ligado aos receptores IL-1RI desencadeia o aumento da fosforilação de NR2A/subunidade B do receptor de NMDA elevando o influxo de Ca^{2+} gerando um aumento da excitabilidade e a susceptibilidade a crise epiléptica. As células da microglia, ao expressarem IL-1RII, desencadeia um efeito competitivo entre os diferentes receptores, reduzindo a expressão de IL-1RI, conseqüentemente minimizando os efeitos pró-inflamatórios da sua ligação. Como resultado, observa-se uma menor excitabilidade, promovendo uma redução na susceptibilidade a crises e um efeito anticonvulsivo. Em modelos experimentais, as crises aumentam rapidamente a expressão de IL-1 β e IL-1R em microglia, astrocitos e neurônios (RAVIZZA *et al.*, 2006). No nosso estudo, no grupo tratado com CMO a expressão do IL-1R foi diminuída em relação ao grupo SE- salina.

A análise da citocina IL-6 apresentou elevados valores de expressão em 12 e 24 horas após a indução do SE (SE-Salina), retornando aos níveis basais no período de 7 dias. Estudos de KALUEFF e colaboradores (2004) e LETHTIMANKI e colaboradores (2003) demonstram que, após as crises epiléticas, os níveis de IL-6 são rapidamente elevados nas regiões do hipocampo, córtex, giro denteado, amígdala e meninges, corroborando a inicial elevação de expressão após o SE encontrada no nosso estudo. Por fim, os valores de IL-6 retornam ao nível basal 7 dias após o SE. A expressão desta interleucina obedece a diferentes ciclos de produção ordenados pelos agentes indutores empregados. Foi demonstrado em modelos de indução de SE por ácido cáínico, metiliodeto de bicucullina e eletrochoque, um aumento desta citocina 6 horas após o estímulo indutor (VEZZANI *et al.*, 2002), enquanto que no modelo de lítio-pilocarpina, a expressão de IL-6 encontrou-se aumentada de 10 a 16 horas após a indução, seguido de um retorno aos níveis basais após 5 dias (ROSELL *et al.*, 2003).

Esta interleucina apresenta importantes características pró-inflamatórias atuando juntamente com IL-1 β e TNF α , exacerbando a excitabilidade neural e promovendo o desenvolvimento das crises epiléticas (VEZZANI *et al.*, 2011). Estudos experimentais demonstram que a administração nasal da interleucina-6 em ratos adultos exacerba a

gravidade das crises epilépticas no modelo de indução por pentiletrazole (KALUEFF *et al.*, 2004). Apesar de exercer um importante papel no desenvolvimento do sistema nervoso, a exacerbação da produção de IL-6 pode prover um efeito pró-convulsivo e neurotóxico (KALUEFF *et al.*, 2004; CAMPBELL *et al.*, 1993; SAMLAN *et al.*, 2003; JONAKAIT, 2007).

Os elevados valores na expressão de IL-6 encontrados no grupo SE-Salina contrastam com a reduzida expressão encontrada no grupo SE-CMO 12 e 24 horas e 7 dias após a indução do SE. Sobre a perspectiva da citocina IL-6 atuando como um componente pró-convulsivante demonstramos que as CMO promoveram uma subtração da concentração de IL-6, comparada aos valores encontrados no grupo SE-Salina.

A análise do grupo experimental SE-Lisado revelou um perfil de expressão antagônico ao encontrado no grupo SE-CMO. Os animais deste grupo (12 e 24 horas após o SE) apresentaram uma elevada expressão de IL-6.

Diversos trabalhos encontrados na literatura referem um papel neuroprotetor e anti-convulsivo para esta interleucina. Fukada e colaboradores, (2007) utilizando ratos desafiados com baixas doses de IL-6 demonstraram um potencial redutor sobre a latência e duração de crises induzidas por hipertermia. Penkowan e colaboradores (2001) constataram que camundongos deficiente de IL-6 apresentam uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento de crises induzidas por ácido caínico.

O TNF α e a IL-1 β , são considerados os principais mediadores das mais graves doenças neurodegenerativas (RAO *et al.*, 2009). Estas citocinas funcionam como cofatores essenciais à sustentação da inflamação cerebral em diversas desordens neurológicas como Parkinson, Alzheimer, demência e doença de Huntington (PENKOWA *et al.*, 2009). No nosso estudo, no grupo SE-Salina foi observada uma expressiva elevação dos títulos de TNF α após 12 e 24 horas do SE, contrapondo com o retorno aos níveis basais de expressão encontrados no tempo de 7 dias neste mesmo grupo.

A elevada expressão da citocina TNF α é um achado comum após uma crise epiléptica (PLATA-SALAMÁN *et al.*, 2000; VEZZANI *et al.*, 2000). Em modelo de indução através de eletro-choque foram encontradas elevadas expressões de TNF α nas regiões de córtex piriforme, parietal, pré-frontal, amígdala e hipocampo (VEZZANI *et al.*, 2000; GODLEVSKY *et al.*, 2002). Vezzani e colaboradores (2000; 2002) também demonstraram que a produção desta citocina assume seu ápice no período de 6 horas após crise convulsiva, e Plata-Salamán e colaboradores (2000) apresentou o retorno aos níveis basais apenas três semanas após as crises. Ao submeter os animais ao SE mediante aplicação de pilocarpina, induzimos a manifestação de crises epilépticas de intensidades variáveis, e assim as elevações de expressão de TNF α após a indução observada no nosso modelo ilustram uma perfil de similaridade com os trabalhos citados anteriormente. A ausência de análise em menores intervalos de tempo e por um período mais longo impossibilitou a identificação de possíveis novos picos de produção de TNF α .

O TNF α é caracterizado por induzir uma importante resposta pró-inflamatória, mediando sinalizações de ativação de apoptose através de uma ativação sistêmica de NFkB. A via de sinalização pró-inflamatória desta citocina é responsável por induzir a expressão de IL-1 e IL-6, bem como promover a supressão de IL-10. Experimentos *in vitro* demonstraram que altas concentrações apresentam um efeito semelhante AMPA (RAO *et al.*, 2009), que mimetiza o efeito o glutamato, promovendo a abertura de canais de Ca²⁺, Na⁺ e K⁺ e gerando a excitação neuronal e citotoxicidade.

Diante desta característica, podemos afirmar que o emprego das células íntegras e lisadas resultou na redução das taxas de expressão para esta citocina. Ao reduzir a expressão desta citocina, o tratamento empregado poderia diminuir a apoptose, minimizando a morte neural e a produção de fatores quimiotáticos que direcionam células efectoras da resposta imune, e o conjunto destes fatores possivelmente apresentaria um efeito neuroprotetor. Estudos realizados por GRELL e colaboradores (1998) e por YUHAS e colaboradores (2003) descrevem um importante papel anti-convulsivo para esta mesma citocina, onde o controle desta ação efetora estaria relacionada aos receptores de membrana

utilizados, ligações com o receptor de membrana p77 e p55, promovendo uma atividade anticonvulsivante ou pró-convulsivante, respectivamente.

A citocina IL-10 apresenta um marcante caráter anti-inflamatório, contemplado não somente por doenças do sistema nervoso central como de outras doenças importantes. A presença desta proteína é principal responsável por uma ação inibitória sobre a resposta imune, prevenindo as ativações celulares e apresentações de antígenos. Utilizando o mecanismo de associado a ligação com proteínas cinases Jak1 e Tyk2, promovendo ação supressora sobre as citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF α (DE WAAL *et al.*, 1991; GENG *et al.*, 1994; HOWARD, 1992). Outra característica importante é a capacidade inibitória sobre as células da microglia (QIAN *et al.*, 2006; RAO *et al.*, 2009), uma das principais populações celulares produtoras de citocinas.

Os nossos resultados demonstram uma reduzida expressão cerebral de IL-10 no grupo SE-Salina em todos os períodos avaliados. A análise dos grupos tratados CMO e Lisado apresentou uma elevada expressão desta interleucina com os dois diferentes tratamentos empregados. Os achados encontrados no cérebro demonstraram aumento de IL-10 no grupo tratado com CMO, contrapondo a sua reduzida expressão nos animais não tratados.

Seguindo a hipótese da IL-10 como um composto anticonvulsivante e promotor da supressão da resposta inflamatória, nossos resultados mostram que a terapia com células mononucleares (íntegra e lisada) desenvolveu uma importante elevação na expressão desta citocina, proporcionando uma atividade anti-inflamatória e anticonvulsiva (LI *et al.*, 2011; RAO *et al.*, 2009; HOWARD e O'GARRA, 1992; GENG *et al.*, 1994; DE WAAL *et al.*, 1991). Juntamente ao aumento de expressão de IL-10 foi observada uma redução dos níveis de TNF nos grupos CMO e Lisado a partir de 24 h, seguido da diminuição de IL-6 no grupo CMO em 12 e 24 h e, por fim, o encontro de uma baixa expressão de IL-1 β 12 h após a indução do SE no grupo CMO e após 24h no grupo Lisado. Tais reduções são um efeito esperado com o aumento da expressão desta interleucina anti-inflamatória (HOWARD e O'GARRA, 1992; GENG *et al.*, 1994; DE WAAL *et al.*, 1991).

A análise da citocina anti-inflamatória IL-4 apresentou reduzidos valores de expressão nos grupos SE-Salina em todos os tempos avaliados. A análise do efeito da terapia mostrou uma acentuada elevação na produção de IL-4 no período de 12 horas em ambos os tratamentos (SE-Lisado e SE-CMO). Nossos dados demonstram que a elevação da expressão desta interleucina mediante a aplicação de células mononucleares na forma íntegra ou lisada indicam um possível papel anticonvulsivante da IL-4 no nosso modelo de estudo.

A citocina TGF- β apresenta uma marcante atividade anti-inflamatória através da inibição da atividade linfocitária e macrófagos de modo a minimizar o desenvolvimento da proliferação de células efetoras na periférica. A redução da atividade de linfócitos e macrófagos minimiza a ativação endotelial e a produção de citocinas inflamatórias pela ausência das sinalizações promovidas por essas células (ABBAS *et al.*,2008), resultando em uma supressão da resposta inflamatória. Nossos resultados apresentam valores de expressão semelhante no controle experimental e no animal não tratado (SE-Salina) mostrando um baixo nível de expressão de TGF- β em todos os tempos avaliados. No tempo de 7 dias após o SE foi encontrado uma divergência entre os dois tratamentos, no grupo SE-CMO observa-se a permanência dos níveis basais de TGF β , enquanto no grupo SE-Lisado foi caracterizado por uma aumento na expressão desta citocina.

Os dados observados no nosso estudo revelam um importante elevação da expressão de TGF- β . A presença de uma marcante atividade anti-inflamatória apresentada por esta citocina pode representar uma importante efeito terapêutico das células mononucleares de medula óssea e células lisadas, justificadas pela diminuição da resposta inflamatórias presente na epilepsia. Pode-se observar que a elevação marcante desta citocinas apresentou-se logo no período de 12 horas após a indução, possivelmente em resposta a elevação de citocinas pró-inflamatórias no mesmo período. O retorno aos níveis basais após 24 horas fornece um indício sobre a resolução desta atividade inflamatória expressa 12 horas após o SE.

Indo de encontro à afirmada atividade anti-inflamatória do TGF β , Siddiqui e colaboradores (2004) demonstraram que a via de sinalização ativada pela ligação de TGF β ao seu receptor (TGF β R) proporciona a ativação citoplasmática e translocação nuclear do complexo Smad2/Smad4 possibilitando a indução de formas epilépticas ativas. (CACHEAUX *et al.*, 2009). As mesmas vias de sinalização de TGF- β podem ser ativadas pela simples ligação de albumina ou anticorpos sorológicos ao receptor desta citocina, um achado comprovado nos estudos de Cacheaux e colaboradores (2009). O encontro de proteínas plasmáticas com os receptores cerebrais de TGF- β pode ser proporcionado por uma lesão à BHE, que irá expor não somente os seus receptores para esta citocina, como também todo um sistema anteriormente privilegiado.

Os resultados apresentados no nosso estudo permitiram uma análise da resposta inflamatória cerebral, onde ficou constatado que o desenvolvimento da neuroinflamação ocorre de forma integrada, sendo regulada por diferentes citocinas e /ou auto-limitado pela mesma citocina devido ao perfil dicotômico encontrado em boa parte de nossas análises. A complexidade ilustrada pelas análises de expressão de citocinas e suas relações de interdependência permitem afirmar que o encontro do sucesso terapêutico não será representado em avaliações focadas na busca de um mecanismo único, mas sim na montagem de um painel de expressões gênicas e fenotípicas desencadeando diferentes ações resultam no efeito desejado.

Os dados obtidos no presente trabalho demonstraram uma importante modulação da resposta pró-inflamatória com o emprego da terapia com células mononucleares de medula óssea marcado pela redução da expressão de IL-1 β e IL-6 12 horas após o SE e TNF α apresenta-se 24 horas após o SE. Por outro lado, neste mesmo grupo, a elevação das citocinas anti-inflamatórias encontraram-se elevada nas primeiras após 24 horas após o SE. No grupo SE-Lisado os efeitos redutores sobre as citocinas pró-inflamatórias foram observados a partir de 24 horas após o SE, enquanto o efeito anti-inflamatório foi encontrado 12 horas após a indução. Segundo o trabalho de Venturinni (2008) o lisado celular expõe o animal receptor ao conteúdo citoplasmático da célula transplantado, promovendo um possível efeito parácrino devido à reduzida capacidade migratória deste

conteúdo. O mesmo efeito foi observado na célula íntegra podendo indicar um mecanismo parácrino comum aos diferentes tratamentos, onde o imediato efeito supressor observado no grupo SE-CMO pode ser justificado pela melhor capacidade migratória desta célula devida a sua integridade.

Brenneman e colaboradores (2010) demonstraram, em modelo experimental de acidente vascular encefálico isquêmico, que o tratamento com CMO reduz a expressão de IL-1 β entre outras citocinas pró-inflamatórias (IL-1 α , IL-2, TNF- α , e IL-6). Ainda no modelo de acidente vascular, Li e colaboradores (2010) demonstraram um aumento da expressão de IL-10 após transplante com células-tronco mesenquimais, uma fração das células mononucleares de medula óssea, reduzindo a atividade inflamatória nas células da astroglia, permitindo um regresso da funcionalidade dos tecidos isquêmicos.

A escassez de estudos avaliando neuroinflamação e terapia celular no modelo de epilepsia, restringem discussões mais complexas, entretanto revelam uma área de estudo repleta de perguntas a serem respondidas. Os resultados encontrados no presente estudo apresentam uma importante modulação da resposta inflamatória cerebral oferecendo indícios de um possível mecanismo de ação da terapêutica utilizada.

No nosso estudo a quantificação neuronal realizada nos períodos de 24 h e 7 dias teve como objetivo avaliar se alterações de expressão de citocinas poderiam influenciar a perda neuronal no modelo de camundongo induzido ao SE. Procuramos nessa análise descobrir se alterações do balanço de citocinas poderia apresentar um efeito funcional, alterando assim um importante parâmetro fenotípico patológico como a morte neuronal.

A perda neural encontrada na epilepsia apresenta graves conseqüências. A permanência desta injúria neuronal no modelo crônico de epilepsia, progredir com acometimento de memória e aprendizado (SARKISIAN *et al.*, 1997).

A análise da região anatômica de CA1 apresentou uma significativa redução no número de neurônios nos animais não tratado (SE-Salina) no período de 24 horas e 7 dias

após o SE. Estes resultados foram acompanhados pela prevenção a perda neural nos grupos SE-CMO e SE-Lisado 24 horas após a indução do SE.

A quantificação neural realizada na região de CA3 apresentou uma similaridade no número de neurônios em todos os grupos quando avaliados 24 horas após o SE, apresentando apenas uma tendência à redução no grupo SE-salina, contrapondo ao encontro de próximos ao nível basal no grupo tratado com CMO (SE-CMO). Aos 7 dias após a indução, observamos a intensificação da perda neural no grupo SE-Salina, seguido de uma preservação do número de neurônios nos grupos SE-CMO e SE-Lisado.

O estudo da região anatômica do hilo do giro denteado revelou resultados pouco conclusivos caracterizados pela reduzida perda no grupo SE-Salina em ambos os períodos e a ausência de diferença estatística entre grupo SE-CMO e os animais não tratados nos tempos de 24 horas e 7 dias.

Nossos resultados apresentam coerência com a literatura, ao apresentar uma perda neuronal pronunciada na região anatômica de CA1 comparada as demais áreas quantificadas (BLUMCKE *et al.*, 1999; BABB *et al.*, 1984). Os achados encontrados no nosso estudo demonstram uma possível prevenção da perda neuronal na região de CA1 e CA3 no modelo de epilepsia aguda. Estudos realizados por Camazzoto (2009) mostram que ratos epiléticos transplantado com células mononucleares de medula óssea lisadas e com células-tronco mesenquimais, não preservou o hipocampo da morte neuronal.

A redução da perda neuronal encontrada no nosso estudo nos permite afirmar que o tratamento com células de medula óssea íntegras promovem um efeito preventivo sobre a progressão da perda neuronal diante do imediato efeito observado neste trabalho. Estes resultados oferecem importantes informações que direcionam a busca do mecanismo efetor da terapia celular empregada

.6 CONCLUSÃO

Os achados presentes neste trabalho possibilitaram demonstrar:

- 1- O transplante das células mononucleares de medula óssea e células lisadas apresentaram efeito sobre a inflamação aguda induzida durante o SE;
- 2- Nosso estudo revelou que a terapia celular empregada apresentou a capacidade de reduzir citocinas pró-inflamatórias e promove uma resposta anti-inflamatória;
- 3- Os resultados obtidos permitem identificar que tanto tratamento com CMO quanto o uso da preparação Lisada destas células apresentaram potenciais moduladores da resposta inflamatória, embora mantendo diferentes intensidades de modulação;
- 4- A análise do IL-1R demonstrou uma tendência à redução da sua expressão nas regiões anatômicas de CA1 e CA3 no grupo tratado com CMO;
- 5- A avaliação de perda neuronal revelou um importante efeito protetor do tratamento com CMO nas regiões hipocâmpais de CA1 e CA3.

7 PERPECTIVAS FUTURAS

1-Avaliar a durabilidade deste tratamento, indicando aumentando do número de aplicações do transplante celular a fim de perpetuar o efeito terapêutico;

2-Novos estudos podem ser realizados com sobrenadante de cultivo celular (meio condicionado) indicado pela eficácia encontrada no tratamento com o uso do lisado celular

3- O tratamento na fase aguda deve ser acompanhado por longos períodos para uma posterior avaliação funcional objetivando analisar a influencia desta modulação sobre a epileptogênese;

4- Novos experimentos devem ser realizados no modelo crônico da epilepsia como objetivo de responder se a neuromodulação por células mononucleares de medula óssea pode apresentar a mesma eficácia em circuito recorrente já estabelecido e posterior avaliação funcional

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, Abul K.; Lichtman, Andrew H.; Pillai, Shiv. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro, Elsevier, 2008.
- ABBOTT, N. J, ROMERO, I. A. Transporting therapeutic across the blood-brain barrier. *Mol Med Today*.2(3);106-113.1996
- ACARIN, L.*et al.* Neuronal, astroglial and microglial cytokine expression after an excitotoxic lesion in the immature rat brain. *Eur. J. Neurosci*. 12, 3505–3520.2000.
- ACHARYA MM, RAI KS, HATTIAGADY B *et al.* Pontencial of hippocampal stem/progenitor cell grafts for restraining spontaneous motor seizures during chronic temporal lobe epilepsy. *Society for neuroscience abstracts*; San Diego: *Act Neurol Scand*. 2004; 110(5): 291-300.
- ACSÁDY, L, KAMONDI A, SIK A, FREUND T, BUZSÁKI G. GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the hippocampus. *J Neurosci*. 18; 3386-3403. 1998
- AKIRA, *et al.* Toll-like receptors critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2: 675-680.2001.
- ALLAN, S. M., TYRRELL, P.J., ROTHWELL, N. J. Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat. Rev. Immunol*.5; 629-640.2005
- ALLAN, S.M., ROTHWELL, N.J. Cytokines and acute degeneration. *Nat. Rev.—Neurosci*.2001. 2, 734–744.
- AMARAL DG, ISHIZUKA N, CLAIBORNE B. Neurons, numbers and the hippocampal network. *Prog Brain Res*. 83; 1-11. 1990
- BABB, T. L., BROWN, W. J., PRETIUS, J., DAVENPORT., C., LIEB, J. P., CRANDALL, P.H.Temporal lobe volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 25(6):729-740, 1984.
- BABB TL, BROWN WJ. Pathological findings in epilepsy (Engel JJr ed). *Surgical Treatment of theEpilepsies*: New York: Raven Press, 511-540, 1987.
- BABB, T. L., Research on the anatomy and pathology of epileptic tissue. In: Luders, H. (Ed.), *Neurosurgery of Epilepsy*, Raven Press, New York, pp.719-727, 1991.

- BALOSSO, S. *et al.* A novel non-transcriptional pathway mediates the proconvulsive effects of interleukin-1 β . *Brain*. 131; 3256 -3265.2008
- BARTOLOMEI, F., WIGNAL, J. Seizures of temporal lobe epilepsy identification of subtypes by coherence analysis using stereoelectroencephalography. *Clinic of Neurophysiology*.110, 741-754.1999.
- BRENNEMAN Miranda, SUSHIL Sharma, MATTHEW Harting, ROGER Strong, CHARLES S Cox Jr, JAREK Aronowski, JAMES C Grotta e SEAN I Savitz. Autologous bone marrow mononuclear cells enhance recovery after acute ischemic stroke in young and middle-aged rats. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 30; 140–149. 2010.
- BERG, A. T. *et al.* Seizures with fever after unprovoked seizures: an analysis in children followed from the time of first febrile seizures.*Epilepsia*. 39:77-80. 1998.
- BLUMCKER, I *et al.* Altered distribution of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptor subunit NMDAR1 in hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *Acta Neuropathologica* 92(2-3): 205-23, 1999.
- BLUMCKER, I., *et al.* Ammon's horn sclerosis: a maldevelopmental disorder associated with temporal lobe epilepsy. *Brain Pathology*.12:199-211, 2002.
- BRAZELTON T.R, ROSSI F. M., KESHET G. I. *et al.* From marrow to brain : expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290: 1775-1779. 2000
- CACHEAUX, L. P. *et al.* Transcriptome profiling reveals TGF-beta signaling involvement in epileptogenesis. *J Neurosci*. 15;29(28):8927-8935.2009.
- CALVANO, L. *et al.* Epidemiologia das Epilepsias na População da Cidade de Maceió – Alagoas. *Neurobiologia*. 73 (1) jan./mar.55-60.2010.
- CAMOZZATO T. Efeito do transplante de células tronco mesenquimais de células lisadas da medula óssea em ratos submetidos ao modelo de lítio pilocarpina. 2009(Mestrado Neurociências). UFRS- Porto Alegre- Rio Grande do Sul-Brasil.
- CAMPBELL, *et al.* Neurologic disease in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90;10061-10065.1993.

- CAVALHEIRO, E. A., LEITE J. P., *et al.* Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia* 32(6): 778-82, 1991
- CHOI, J, KOH, S. Role of brain inflammation in epileptogenesis. *Yonsei Med J.* 49:1-18. 2008.
- CHUN, K. *et al.* Human neural stem cell transplantation reduces spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus in adult rats. *Brain Research*, Volume 1023, Issue 2, 15 October 2004, Pages 213-221
- *Commission of Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy.* Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia*, 30, 389-399.1998.
- COSTA-FERRO Z. S. M. Transplante de células mononucleares de medula óssea na epilepsia experimental induzida por lítio e pilocarpina em ratos. 2008.Dissertação (Doutorado Fisiologia). UFRS Porto Alegre- Rio Grande do Sul-Brasil.
- COULTER, D.A.; McINTYRE, D.C.; LOSCHER, W. Animal models of limbic epilepsies: What can they tell us? *Brain Pathology*, 12: 240–256, 2002.
- COULTER, D.A.; McINTYRE, D.C.; LOSCHER, W. Animal models of limbic epilepsies: What can they tell us? *Brain Pathology*, 12: 240–256, 2002.
- CYTOKINES. *Kelleys textbook of rheumatology*, Vol.1 Edited by L. B. Mc Innes. (Elsevier Saunders: Philadelphia, Pennsylvania) 2005, 379.
- DA COSTA J.C. *et al.* Fundamentos neurobiológicos das epilepsias – aspectos clínicos e cirúrgicos, Volume 1. 1998. Lemos Editorial, São Paulo. Edição 2010.
- DA SILVA, A. V., CAVALHEIRO, E. A.. *Epilepsia: uma janela para o cérebro.* São Paulo (UNIFESPEPM) Multi ciência. 2004
- DAN, Y.Y., YEOH, G.C. *et al.* Liver stem cells: a scientific and clinical perspective. *J Gastroenterol Hepatol.*, v. 23, n. 5, p. 687-698, 2008.
- DE WAAL Malefyt, R., ABRAMS, J., BENNETT, B., FIGDOR, C.G. DEVRIES, J.E., Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 reduced by monocytes, *J. Exp. Med.*, 174 ;1209–1220.1999

- DOCAGNE, F. CAMPBELL, S. J. , BRISTOW, A.F, POOLE, S., VIRGUES, S., GUAZA, C.,PERRY, V.H., ANTHONY, D. C. Differential regulation of type I and II interleukin-1 receptors in focal brain inflammation. *Eur. J. Neurosci.* 21, 1205-1214. 2005.
- DUBÉ, C. M. *et al.* Fever, febrile seizures and epilepsy. *Trends Neurosci.* 30;490-496. 2007.
- EGLITIS, M . A., E MEZEY, E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(8): 4080-5, 1997.
- ENGEL J *et al.* Surgical treatment of epilepsy: opportunities for research into basic mechanisms of human brain function. *Acta Neurochirug.* 46:3–8.1998.
- ENGEL J JR , PEDLEY TA. Introduction: what is epilepsy?. *Epilepsy: A Comprehensive Textbook* Lippincott-Raven Publishers, p. 1-7.1997.
- FABENE, P.F. *et al.* A role for leukocyte-endothelial adhesion mechanism in epilepsy. *Nat. Med.* 14; 1377-1383. 2008.
- FUCHS, E., SEGRE, J.A. Stem cells: a new lease on life. *Cell* 100: 143-155,2000.
- FURLAN,R, *et al.* Interferon-beta treatment in multiple sclerosis patients decreases the number of circulating T cells producing interferon- gamma and interleukin-4. *J Neuroimmunol* 111, 1-2: 86-92. 2000.
- GASTAUT H; Broughton R. *Epileptic Seizures. Clinical and Electrographic Features, Diagnosis and Treatment.* Springfield, EUA, 1973.
- GATTI, S. *et al.* Febrile Seizures.Chapter 12. Academic Press, San Diego 169-184. 2002.
- GENG, Y., GULBINS, E., ALTMAN, A. and LOTZ, M., Monocyte deactivation by interleukin 10 via inhibition of tyrosine kinase activity and the Ras signaling pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91; 8602–8606.1994
- GITAI, D. L. G. *et al.* Genes e epilepsia I: Epilepsia e alterações genéticas. *Rev Assoc Med Bras* .54(3): 272-278. 2008
- GLASS, C. K. SAIJO, K.WINNER, B., MARCHETTO, M. C. Mechanism underlying inflammation in neuro degeneration. *Cell.* 140;918-934. 2010.

- GODLEVSKY, L. S. *et al* . TNF alpha in cerebral cortex and cerebellum is effect ny amigdalar kindling but not by stimulation of cerebellum. Pol. J. Pharmacol.54;11294-11298. 2002.
- GRELL, M. *et al*. The type1 receptor (CD120a)is high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. Proc. Natl.Acad Scoi USA. 95;570-575.1998.
- GUEDES, *et al*. Plasticidade neuronal associada à epilepsia do lobo temporal mesial: Insights a partir de estudos em humanos e em modelos experimentais. Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology, 12(suppl. 1):10-17. 2006.
- GUERREIRO, C. A. M. Historia do surgimento e desenvolvimento das drogas antiepiléticas. J Epilepsy Clin Neurophysiol 12 (suppl. 1):18-21. 2006.
- GUIMARÃES C A. Epilepsia de lobo temporal na infância: avaliação neuropsicológica. .UNICAMP Campinas- São Paulo- Brasil.2006.
- GUYTON, A. C., HALL, J. E. Tratado de fisiologia médica. 9ª edição. Editora. Guanabara Koogan. 1997. São Paulo-Brasil
- HASPOLAT, S., MIHCI, E. COSKUN, M. GUMUSLU, S. OZBEN, T, YEGIN, O. Ilerleukin 1 beta, tumornecrosis factor-alpha, and nitrite levels in febrile seizures. J. Child. Neurol.2002. 17; 749-751.
- HONOVAR M, MELDRUM BS. Epilepsy. Greenfield's Neuropathology. 6th ed. London: Arnold. 1997. p. 931–971
- HOWARD, M. O'GARRA, A., Biological properties of interleukin 10, Immunol. Today, 13 198–200. 1992
- HULSHOF, S. *et al*. Cellular localization and expression patterns of Interleukin-10, Interleukin-4, and their receptors in multiple sclerosis lesions. Glia 38, 24–35. 2002.
- JONAKAIT, G. M. The effects of maternal inflammation on neuronal development: possible mechanism. J. Dev. Neurosci.25;11.415-425.2007
- JONES, A. W. Perspectives in Drug Discovery: A Collection of Essays on the History and Development of Pharmaceutical Substances. Disponivel em: http://www.rmv.se/fileadmin/RMVFiles/pdf/Drug_Discovery_skm_ori.pdf. Acesso: 12 de janeiro 2011.

- KALUEFF, A. V., *et al.* Intranasal administration increases of IL-6 increased the severity of chemically induced seizures in rats. *Neurosci lett.* 2004;365:106-110
- KANNER, A., CAMPOS, M. Epilepsia de lobo temporal. *Epilepsias: Diagnóstico y Tratamiento.*252-268.2004.
- KLINK, R., ALONSO A. Ionic mechanisms of muscarinic depolarization in entorhinal cortex layer II neurons. *J. Neurophysiology* 77: 1829-1843, 1997
- KLINK, R., ALONSO A. Ionic mechanisms of muscarinic depolarization in entorhinal cortex layer II neurons. *J. Neurophysiology* 77: 1829-1843, 1997
- KÖRBLING, M.; ESTROV, Z.; CHAMPLIN, R. Adult stem cells and tissue repair. *Bone Marrow Transplantation*, 32: S23–S24, 2003.
- KUMAR, V., ABBAS, A. K., FAUSTO, N. Robbins e Cotran. *Patologia: Base patológicas das doenças.* 2005. 7ª edição. Elsevier São Paulo.
- LATHTEINEN,S., PITKANEN,,A., KNUUTTILA, J., TORENEN, P. CASTREN, E. Brain-derived neutrophic factor signaling modifies hippocampal gene expression duringepilpetogenesis in transgenic mice. *Eur J. Neurosci.*19.3245-3254. 2004
- LEHTIMAKI, K. KERANEN, T., PALMIO, J. MAKINEN, R. HURMER, M., HUNKANIEMI, J., PELTOLA, J.Increased plasma levels of cytokines after seizures in localization-related epilepsy.*Acad. Neuronal. Scand.* 166(4);226-230. 2007.
- LI G. BAUER S., NOWAK M. NORWOOD B. TACKENBERG B. ROSENOW F. KNAKE S., WOLFGANG H. OERTEL H. H H. Cytokines and epilepsy.*Seizure* 20(3) 249-256. 2011.
- LI J, Zhu H, Liu Y, Li Q, Lu S, Feng M, Xu Y, Huang L, Ma C, An Y, Zhao RC, Wang R, Qin C. Human mesenchymal stem cell transplantation protects against cerebral ischemic injury and upregulates interleukin-10 expression in *Macacafascicularis*. *Brain Res.* 2010
- LIU, H. *et al.* In vivo expression of the Interleukin 4 receptor alpha by astrocytes in epilepsy cerebral cortex. *Cytokine*12, 1656–1661.2000.
- LONDERO, R. G. Prevalência e fatores de risco a cefalea e migrânea em epilepsia. 2010. Dissertação (Mestrado Ciências Médicas, área de concentração Neurologia). UFRS- Porto Alegre- Rio Grande do Sul-Brasil.

- LONGO, B., ROMARIZ, S., BIANCO, M.M, VASCONCELOS, J.F., BAHIA, L., SOARES, M. B.,MELLO, L. E.,RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.. Distribution and proliferation of bone marrow cells in the brain after pilocarpine-induced status epilepticus in mice. *Epilepsia*. 51(8):1628-32. 2010
- LOUIS, E.D. *et al*. Experimental models of chronic focal epilepsy: a critical review of four models. *The Yale Journal of Biol. and Med*. 60: 255-272, 1987 .
- LUCAS, S. M., ROTHWELL, N.J., GIBSON, R. M. Role of inflammation on CNS injury and disease. *Br J. Pharmacol*. 147; S232-S240.2006.
- MARGERISON, JH, CORSELLIS, J A N. Epilepsy and the temporal lobes: a clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. *Brain*.89:499-530. 1966.
- MARIE, S.K.N.; OBA-SHINJO, S.M. Célula-tronco no sistema nervosa central; potencial terapêutico. In: ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. Células-tronco: a nova fronteira da medicina. São Paulo: Atheneu; cap 11, p.145-158, 2006
- MAROSO, M. *et al*. Toll-like receptor4 and high mobility group box 1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures. *Nat Med*..16; 413-419.2010.
- MATHERN, G. W. *et al* .Childhood generalized and mesial temporal epilepsies demonstrate different amounts and patterns of hippocampal neuron loss and mossy fibre synaptic reorganization.*Brain*.3:965-987.1996
- MCNAMARA, J. C.Cellular and Molecular Basis of Epilepsy. *The Journal of Neuroscience*.14(6): 3413-3425.1994.
- MEINI, A. BENOCCI, A. FROSCINI, M., SAGARAGLI, G.,PESSINA, G., ALDINUCCI, C. YOUNBI,G.T., PALMI, M. Nitric oxide modulation of interleukin1(BETA)-evoked intracelular CA²⁺ release in human astrocytoma U-373 MG cells and brain striatal slices. *J. Neurosci*.20;8980-8986. 2000.
- MENDEZ-OTERO, R. *et al*. Introdução às células-tronco. In: MORALES, M.M. Terapias avançadas: células-tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada a saúde. São Paulo: Atheneu, cap 1, p. 3-23, 2007.

- MINIMI, M., KURAISHI, Y, SATOH, M. Effects of kainic acid on messenger RNA levels of IL-1 β , IL-6, TNF α and LIF in rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176, 593-598
- NAKASHIMA, K. *et al.* Mechanisms underlying cytokines-mediated cell-fate regulation in the nervous system. *Mol Neurobiol.* 25;233-244.2002.
- NALIVAEVA, NN, *et al.* Activation of neutral sphingomyelinase by IL-1beta requires the type 1 interleukin 1 receptor. *Cytokine.* 12(3);:229-232. 2000
- NATOLI G., *et al.* Tumor necrosis factor(TNF) receptor1 signaling downstream of TNF receptor associated factor kappa2 nuclearB (NFkappaB)-inducing kinase requires I κ B kinase but not of the c-Jun N-Terminal kinase/stress-activated protein kinase. *J. Biol Chem.* 272.26079-26082.1997.
- NELMS, K, *et al.* The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol* 17: 701-738. 1999.
- NIRANJAN B., *et al.* Interactions between TLR7 and TLR9 agonists and receptors regulate innate immune responses by astrocytes and microglia. *Glia.* 2010.58:650–664.
- NISHIYORI, A., MINAMI, M., TAKAMI, S. SATOH, M. Type2 interleukin-2 receptor mRNA is induced by kainic acid in rat brain . *Brain Res.* 50; 237-245.1997.
- PALUDAN, S. R. *et al.* Effect of IL-4 and IL-13 on IFN-gamma-induced production of nitric oxide in mouse macrophages infected with herpes simplex virus type 2. *FEBS Lett* 414, 1: 61-64. 1997.
- PARK KW, LEE DY, JOE EH, KIM SU, JIN BK. Neuroprotective role of microglia expressing interleukin-4. *J Neurosci Res* 81, 3: 397- 402. 2005.
- PENKOWA, M. MOLINERO, A, CARRASCO, J. HIDALGO, J. Interleukin-6 deficiency reduces the brain inflammatory response and increased oxidative stress and neurodegeneration after kainic acid-induced seizures. *Neuroscience* 102;805-818.2001.
- PLATA-SALAMÁN, C.R., ILYIN, S.E, TURRIN, N.P., GAYLE, D., FLYNN, M.C. ROMANOVITCH, A. E., *et al.* Kindling modulates the IL-1 beta system,

TNF α , TGF- β 1 and neuropeptide mRNAs in specific brain regions. *Brain Res Mol. Brain Res.* 75;248-58.2000.

- QIAN, L, Hong J S., Flood P M. Role of microglia in inflammation-mediated degeneration of dopaminergic neurons: neuroprotective effect of interleukin 10 . *J Neural Transm Suppl*, 70. 367.44-52. 2006.
- RATZLIFF A.H., *et al.* Mossy cells in epilepsy: rigor mortis or vigor mortis?. *Trends Neurosci.* 25(3):140-144. 2002.
- RAVIZZA, T, BOER, K. REDEKER, S, SPLIET, P. C, TROOST, D., VEZZANI, A, ARONICA, E .The IL-1 β system in epilepsy-associated malformations of cortical development *Neurobiology of Disease* . 24(1). 2006; 128-143.
- RAVIZZA, T. *et al.* Interleukin Converting Enzyme inhibition impairs kindling epileptogenesis in rats by blocking astrocytic IL-1beta production. *Neurobiol Dis.* 31(3):327-33. 2008.
- RIKONEN, R. Infantile spasms:therapy and outcome. *J. child neurol.* 19; 401-404. 2004.
- ROGASWKI, M. A., PORTER R. J. Antiepileptic drugs: pharmacological mechanisms and clinican efficacy with consideration of promising developmental stage compounds. *Pharmacol Rev.* 42(3): 223-286, 1990
- ROGAWSKI, M.A., LOSCHER, W. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat. Rev. Neurosci.* 5:553-564. 2004
- RUSCHEENSCHNIDT C, KOCH P.G., BRUSTLE, O. *et al.* Functional properties of ES cell-derived neurons engrafted into the hippocampus of adult normal and chronically epileptic rats. *Epilepsia* 2005; 46(5): 174-183.
- SAMLAN, H. *et al.* Profound increase in sensitivity to glutamatergic but not cholinergic agonist-induced seizures in transgenic mice with astrocyte production of IL-6. *73:176-187.*2003.
- SANABRIA E R G, CAVALHEIRO. E. A. Epileptogênese: Contribuição dos modelos experimentais. In *EPILEPSIA*. GM.M. Guerreiro C A M, Cendes F, Lopes-Cendes. São Paulo, Lemos editorial & Gráficos Ltda:29-57,2000.
- SCHLINDWEIN-ZANINI R,*et al.* Aspectos neuropsicológicos da Epilepsia do Lobo Temporal na infância. *Neurociências.* 1-4.2008.

- SCORZA, F.A. *et al.* Estudos qualitativos da formação hipocampal de animais hipertensos com epilepsia. *Arq Neuropsiquiatr.*63(2-A):283-288. 2005.
- SHARMA A. K *et al.* Mesial Temporal Lobe Epilepsy: Pathogenesis, Induced Rodent Models and Lesions. *Toxicol Pathol.* 5:984–999. 2007.
- SHETTY, A. K.; HATTIANGADY, B. Prospects of stem cell therapy for temporal lobe epilepsy. *Stem cells*, 25: 2396-2407, 2007.
- SHI, Q.; RAFIL, S.; WU M. H. *et al.* Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*, 92: 362-367, 1998
- SHI, S.; GRONTHOS, S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *Journal of bone and mineral research*, 18(4): 696-704, 2003.
- SHINODA, S. *et al.* Formation of tumour necrosis factor receptor 1 molecular scaffolding complex and activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 during seizure-induced neuronal death. *Eur. J. Neurosci.* 17;2065-2076. 2003.
- SIDDIQUI, S S *et al.* Albumin endocytosis in endothelial cells induces TGF-beta receptor II signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286:1016-1026. 2004.
- SLOVITER R.S. *et al.* Decreased hippocampal inhibition and selective loss of interneurons in experimental epilepsy. *Science.* 235:73-76. 1987.
- SLOVITER RS. *et al.* Permanently altered hippocampal structure, excitability, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: the “dormant basket cell” hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy. *Hippocampus.*1:41-66.1991.
- STELLWAGEN, *et al.* Differential regulation of AMPA receptor trafficking by tumour necrosis factor-alpha. *J. Neurosci.*25;3219-3228. 2005.
- SUZUKI J. Investigations of epilepsy with a mutant animal (EL mouse) model. *Epilepsia* 2004. *Epilepsia* 45 (Suppl.8): 2-5, 2004.
- SUZUKI J. Investigations of epilepsy with a mutant animal (EL mouse) model. *Epilepsia* 2004. *Epilepsia* 45 (Suppl.8): 2-5, 2004.
- TAUCK DL & NADLER JV. Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. *J Neurosci.* 5;1016-1022. 1985.

- TSAN, M. F , GAO, B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J. Leukoc. Biol.*;76; 514-519.2004.
- TUTUCUONGLU, S. KUTUKCULER, N., KEPE, L., COKER, C., BERDELI, A. TEKUL, H. Proinflammatory cytokines, prostaglandins and zinc in febrile convulsions. *Pediatr. Int.*43; 235-239. 2001.
- VENTURIN, G.T. Efeito do transplante de células mononucleares de medula óssea na frequência de crises e no desempenho cognitivo de ratos com epilepsia por lítio-pilocarpina. 2008 (Mestrado Neurociências). UFRS- Porto Alegre- Rio Grande do Sul-Brasil.
- VEZZANI A. Inflammation and epilepsy. *Epilepsy Curr.* 5 (1):1-6.2005.
- VEZZANI, A, *et al.* The role of inflammation in epilepsy. *Nat. Rev Neurol.*7.31-42. 2011.
- VEZZANI, A. *et al.* . Glia as source of cytokines: implication for neuronal excitability and survival. *Epilepsia.* 24-32.2008.
- VEZZANI, A., GRANATA T. Brain Inflammation in Epilepsy: Experimental and Clinical Evidence. *Epilepsia.* 46,1724–1743.2005
- VEZZANI, A., MONETA, CONTI, M., RICHINI, C., RAVIZZA, T. , DE LUIGI, A. *et al.* Powerful anticonvulsant action of IL-1 receptor antagonist on suon intracerebral injection and astrocytic overexpression in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 11534-11539.2000.
- VEZZANI, A., MONETA, D. RICHINI, C., ALIPRADI, M., BURROWS, S. J., RAVIZZA, T. *et al.* Functional role of inflammatory cytokines and anti-inflammatory molecules in seizures in rats. *Epilepsia.*43; 30-35.2002.
- VIVIANI, B. BARTESAGHI, S. GARDONI, F. VEZZANI, A. BEHRENS, M. M. , BARTFAI, T. BINAGLIA, M. CORSINI, E. DI LUCA, M. , GALLI, C.L., MARINOVICH, M. Interleukin1 beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increased through activation of Src family of kinases. *J. Neurosci.*23;8692-8700.2003.

- WAKSMAN, R.; BAFFOUR, R.; Bone marrow and bone marrow derived mononuclear stem cells therapy for the chronically ischemic myocardium. *Cardiovascular Radiation Medicine*, 4: 164–168, 2003.
- WALDAU B, HATTIAGADY B, KURUBA R, SHETTY, . Medial ganglionic eminence-derived neural stem cell grafts ease spontaneous seizures and restore GSDNF expression in rat model of chronic temporal lobe epilepsy. *Stem cell*. 28(7):1153-1164. 2010
- WINSLOW T. Stem cell: scientific progress and future research directions. National Institute of health. Dep. Of health and human services. cap 4, 23-42. 106p, 2001.
- WIRRELL, E. *et al.* The epileptic encephalopathies of infancy and childhood. *Can, J. Neurol. Sci.* 32, 409-415.2005.
- World Health Organization (WHO). Epilepsy care in the world, 2005. Disponível em: http://www.who.int/mental_health/neurology/Epilepsy_atlas_r1.pdf. Acesso: 10 de Outubro de 2009.
- YUHAS Y, WEIZMAN A., ASHKENAZI S. Bidirectional concentration-dependent effect of tumor necrosis factor alpha in shigella dysenteriae-related seizures. *Inf Immun.* 71;2288-2291.2003
- ZAGO, M. A. Terapia com células-tronco. Fundamentos, oportunidades e obstáculos. *Revista da Sociedade Brasileira de Hipertensão*, 8(4): 145-150, 2005.
- ZENTNER, J *et al.* Surgical treatment of temporal lobe epilepsy: clinical, radiological, and histopathological findings in 178 Patients. *J Neurol, Neurosurg and Psych* 1995;58:666-73
- ZETTERSTROM, M. *et al.* Delineation of the proinflammatory cytokine cascade in fever production. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 856; 48-52. 1998.
- ZHANG, L., *et al.* TNF receptor p55 plays a pivotal role in the murine keratinocyte apoptosis induced by ultraviolet B irradiation. *J. Immunol.* 162; 1440-1447. 1999.
- ZHANG, R, YAMADA, J., HAYAHY, Y., WU, Z., KOYAMA, S. , NAKANISHI, H. Inhibitions of NMDA- induced outward currents by interleukin-1beta in hippocampal neurons. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 372(4); 816-820.2008.