

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

**Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde – Área de Concentração
em Neurociências**

MARIA JULIA MACHLINE CARRION

**Análise da Factibilidade e Segurança do Transplante Autólogo de Células Tronco de
Medula Óssea em Pacientes com Epilepsia**

Porto Alegre

2010.

MARIA JULIA MACHLINE CARRION

Análise da Factibilidade e Segurança do Transplante Autólogo de Células Tronco de Medula Óssea em Pacientes com Epilepsia

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa

Porto Alegre

2010

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

C318a Carrion, Maria Julia Machline

Análise da segurança e factibilidade do transplante autólogo de células tronco de medula óssea em pacientes com epilepsia / Maria Julia Machline Carrion. Porto Alegre: PUCRS, 2010.

109 f.: gráf. tab.

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina. Mestrado em Neurociências.

MARIA JULIA MACHLINE CARRION

Análise da Factibilidade e Segurança do Transplante Autólogo de Células Tronco de Medula Óssea em Pacientes com Epilepsia

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Aprovada em 30 de setembro de 2010.

Banca Examinadora

Prof. Dr. André Luis Fernandes Palmirini

Prof.Dra. Magda Lahorgue Nunes

Prof. Dr. Marino Muxfeld Bianchin

Dedico essa dissertação aos meus pais pelo apoio
incondicional ao meu crescimento profissional

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa pela orientação, incentivo e oportunidade de aprendizado.

À toda a equipe de pesquisa: Danielle Irigoyen da Costa, Dr. Lucas Porcello Schilling, Dra. Carolina Machado Torres, Daniel Marinowic, Dr. Eduardo Floriani Raupp, Dra. Denise Cantarelli Machado, Dr. Bernardo Garicochea pela participação de todos durante o projeto.

À técnica Maria Dall Pozzo pela disposição à qualquer hora.

RESUMO

A Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) é a manifestação convulsiva mais comum em adultos e que comumente se apresenta como uma síndrome refratária aos tratamentos farmacológicos. Alterações anatômicas e fisiológicas estão geralmente presentes em pacientes com ELT, como a atrofia hipocampal vista em estudos de RM. As células tronco mostraram ter a habilidade de regenerar estruturas hipocampais em modelos experimentais. O objetivo do presente estudo é avaliar a segurança e factibilidade de uma nova estratégia terapêutica - o transplante autólogo de células tronco mononucleares da medula óssea (CTMMO) no tratamento de pacientes com ELT com esclerose hipocampal unilateral refratária. Foram avaliados 9 pacientes adultos com diagnóstico de ELT confirmado por história clínica, RM com volumetria hipocampal, vídeo EEG prolongado para registro de crises e exames laboratoriais. Após consentimento informado e preenchendo todos os critérios de congruência para lateralidade, os pacientes foram submetidos ao transplante de CTMMO. O transplante de células tronco foi realizado através de arteriografia seletiva da artéria cerebral posterior infundindo-se de $1,51 \times 10^8$ a $5,51 \times 10^8$ células mononucleares. Nenhum efeito adverso significativo foi registrado durante o procedimento nem durante o tempo de seguimento. Três pacientes (44.5%) permaneceram na Classe IA de Engel, 04 na classe IB e 02 pacientes na classe IIA. Dados os resultados obtidos, concluímos que o transplante de CTMMO parece factível e seguro em pacientes com ELT refratária. O controle de crises alcançado nessa população nos dá um potencial terapêutico promissor no tratamento dessa população.

Palavras Chave: Epilepsia Refratária . Células Tronco . Segurança . Factibilidade

ABSTRACT

Temporal Lobe Epilepsy (TLE) is the most common convulsive presentation in adults and commonly presents as refractory to pharmacological treatment. Anatomical and physiological changes are often present in patients with TLE such as Hippocampal Atrophy seen in MRI studies. Stem cells are proven to have the ability of regenerating hippocampal structures in experimental models. The aim of this study is to evaluate safety and feasibility of bone marrow mononuclear stem cells (BMMSC) transplant for the treatment of patients with refractory TLE with unilateral hippocampal sclerosis. Nine TLE adult patients were studied, with diagnose confirmed by clinical history, MRI study and hippocampal volumetry, prolonged video EEG for seizure recording and laboratory tests. After informed consent and fulfilling all criteria for side congruence patients underwent BMMSC transplant. The transplant was performed by selective posterior cerebral artery catheterism, transplanting from 1.51×10^8 to 5.51×10^8 mononuclear cells. No significative adverse effect was registered neither during procedure nor during follow up period. Three patients (44.5%) remained at Engel Class IA,) 04 patients at IB and 02 patients IIA. Given the results obtained, we conclude that BMMSC transplant seems to be feasible and safe so far in patients with refractory TLE. Seizure control achieved in this first population gives us a promising therapeutic potential in treatment of this population,

Key words: Refractory Epilepsy . Stem Cells . Stem Cells . Feasibility

LISTA DE SIGLAS

AHS	Amigdaló-Hipocampectomia Seletiva
AVC	Acidente Vascular Cerebral
CA 1	Corno de Amon 1
CA 2	Corno de Amon 2
CA 3	Corno de Amon 3
CA 4	Corno de Amon 4
CPC	Crises Parciais Complexas
CPS	Crises Parciais Simples
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CMN	Células Mononucleares
CONEP	Comitê Nacional de Ética e Pesquisa
CT	Células Troncos
CTMMO	Células Tronco Mononucleares de Medula Óssea
EEG	Eletroencefalograma
EH	Esclerose Hipocampal
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
ELT	Epilepsia do Lobo Temporal
EMT	Esclerose Mesial Temporal
FAE	Fármaco Antiepilético
FAEs	Fármacos Antiepiléticos
ILAE	International League Against Epilepsy
IR	Inversion Recovery
KTTP	Tempo de Tromboplastina
ml	mililitro
mm	milímetros
mT	miliTesla
MO	Medula Óssea

µm	micrometro
RM	Ressonância Magnética
STIR	Supression T2 Inversion Recovery
T	Tesla
T1	Seqüência de aquisição de RNM
T2	Seqüência de aquisição de RNM
TCI	Termo de Consentimento Informado
TGO	Transaminase Oxalacética
TGP	Transaminase Pirúvica
TP	Tempo de Protrombina
TIRDA	Atividade Delta Rítmica Intermitente Temporal
TIRTA	Atividade Theta Rítmica Intermitente Temporal
µl	microlitros

SUMÁRIO

1	Fundamentação Teórica.....	12
1.1	Epilepsia	12
1.1.1	Epilepsia do Lobo Temporal	12
1.3	Células Tronco	16
1.3.1	Células Tronco de Medula Óssea	17
1.3.4	Terapia Celular em Epilepsia	21
1.3.4.1	Terapia Celular em Epilepsia - Estudos Pré-Clínicos.....	22.
2	Objetivos.....	25
2.1	Objetivos Gerais.....	25
2.2	Objetivos Específicos.....	25
3	Material e Métodos.....	26
3.1	Delineamento.....	26
3.2	Variáveis.....	26
3.3	Pacientes.....	26
3.4	Exames Complementares.....	26
3.5	Coleta de Medula Óssea	29
3.6	Processamento das Células Mononucleares.....	29
3.7	Transplante de Células Tronco de Medula Óssea via Cateterismo Seletivo de Artéria Cerebral Posterior.....	30.
3.8	Sequência do Protocolo.....	31
3.9	Considerações Éticas.....	32
3.10	Análise Estatística	32
4	Resultados	34
4.1	Perfil e Variáveis Demográficas	34
4.2	Intercorrências durante o procedimento de cateterismo e durante o seguimento	35
4.3	Volume de medula coletado e Fenotipagem	35
4.4	Análise da Video monitorização Eletroencefalográfica	40
4.5	Análise do EEG durante o seguimento.....	46
4.6	Avaliação por neuroimagem do hipocampo.....	48
4.7	Análise das Crises Epilépticas Durante o Seguimento.....	52
5	Discussão.....	55

1 Fundamentação Teórica

1.1 Epilepsia

Epilepsia é um distúrbio cerebral caracterizado por predisposição a geração de crises epilépticas e pelas conseqüências neurobiológicas, cognitivas, fisiológicas e sociais dessa condição (Loddenkemper 2008). As manifestações clínicas da epilepsia (crises) são recorrentes e espontâneas, isto é, que ocorrem mesmo na ausência de doença tóxica metabólica ou estado febril (Gastaut 1973; Rogawski and Porter 1990) Estas manifestações clínicas são causadas pelo disparo intenso, sincronizado e rítmico de populações neuronais no sistema nervoso central (McNamara 1994).

A incidência de epilepsia tem sido estimada em até 100 casos por 100 000 pessoas em países em desenvolvimento (Sander 1999). Cerca de 10-20% dos pacientes têm suas crises inadequadamente tratadas e 30% apresenta resistência à terapia medicamentosa. Entre as epilepsias refratárias ao tratamento clínico, aquelas com crises parciais complexas com origem no lobo temporal são as mais freqüentes

1.1.1 Epilepsia do Lobo Temporal

A forma mais comum de manifestação convulsiva é a Epilepsia do Lobo Temporal (ELT), reconhecida como uma síndrome altamente prevalente que atinge 40% dos indivíduos que apresentam convulsões, usualmente é refratária aos fármacos antiepilépticos e é cirurgicamente tratável.

A maior parte dos pacientes com ELT apresentam, à ressonância magnética do encéfalo, sinais indicativos de Esclerose Mesial Temporal (EMT) (Cendes, Brodie e Anderman 2005). A EMT é definida por suas particularidades anatômicas, caracteristicamente esclerose hipocampal

(EH) associada a graus variáveis de gliose e perda neuronal no hipocampo, subiculum, giro parahipocampal e córtex temporal ínfero-medial. A EH consiste na perda neuronal e gliose marcadas no campo CA 1 de Sommer e hilo hipocampal, menos visível em CA 3 e CA4, com preservação relativa da estrutura de CA2 (Falconer 1974; Valerio e Rosemberg 1995; Lüders 2008).

Os indivíduos portadores de EH têm história clínica característica, crises convulsivas prolongadas na infância, freqüentemente associadas com hipertermia (Cendes et al 2005). Os danos neuronais evidenciados no hipocampo parecem ser decorrentes de uma liberação excessiva de glutamato no decorrer dos episódios comiciais, que produz nos neurônios pós-sinápticos um excessivo influxo de cálcio (Blumcke, Beck et al. 1996)

Clinicamente, a ELT manifesta-se por crises parciais simples (CPS) com desconforto e calor epigástrico ascendente associados a distúrbios comportamentais como o medo. Ocorrem igualmente crises parciais complexas (CPC) nas quais existe comprometimento da consciência associada à fixação do olhar, automatismos orofaciais e gestuais, (Cendes et al 2005), automatismos ipsilaterais ao hipocampo lesado e postura distônica do membro superior contralateral ao hipocampo lesado (Kotagal et al 1989) podendo evoluir para generalização secundária (Cendes et al 2005) Apesar da maioria dos pacientes com diagnóstico de EMT responderem de forma adequada ao tratamento clínico, 40% dos pacientes tornam-se refratários aos fármacos antiepiléticos (Semah 1998; Palmiini et al 1998). Nestes casos, a cirurgia da epilepsia – Amigdaló-hipocampectomia Seletiva (AHS) – com a ressecção das estruturas mesiais do lobo temporal, uncus, amígdala e hipocampo é uma opção terapêutica (Palmiini 1998; Paglioli, Palmiini et al. 2004; Palmiini 2001), mas que tem sua morbimortalidade e, mesmo nos melhores centros, há um grupo de 20-30% dos pacientes que continuam com crises epiléticas e necessitam de tratamento medicamentoso associado. (Paglioli et al. 2004)

Os critérios diagnósticos da Epilepsia de Lobo temporal utilizados mundialmente são baseados na história clínica do paciente, avaliação neuropsicológica, achados eletroencefalográficos interictais e ictais e dados de neuroimagem por Ressonância Magnética (Watson e Cendes 1998; Palmiini et al 2001). A história de crises parciais complexas, com ou sem generalização secundária, não provocadas e recorrentes constitui o pilar da avaliação. A história típica é a do paciente com episódios inesperados de um “mal-estar epigástrico” (aura epigástrica ascendente) evoluindo com desconexão do ambiente, automatismos oro alimentares e gestuais e posturas distônicas nos membros superiores. Esta

manifestação pode, ou não, evoluir com uma generalização secundária. Na ELT refratária, a despeito do uso de altas doses de fármacos antiepilépticos em mono ou politerapia, não há remissão completa destas crises (Cendes et al 2005); (Lüders 2008).

A avaliação neuropsicológica evidencia alteração da memória verbal ou da memória não-verbal nos pacientes com comprometimento de estruturas hipocampais no hemisfério dominante ou não dominante, respectivamente. O teste do amital utilizado em casos pré-operatórios para definição da lateralidade em relação à memória nos casos em que o lado acometido é o hemisfério dominante. (Portuguez 1998) (Paglioli et al. 2006)

A avaliação eletroencefalográfica interictal dos pacientes com ELT costuma evidenciar paroxismos epileptiformes do tipo pontas (descargas epileptiformes) envolvendo a região ântero-mesial do lobo temporal, com repercussão nos eletrodos Fp1-F7 e Fp2-F8 na montagem bipolar longitudinal segundo o sistema 10-20 internacionalmente utilizado na eletroencefalografia. A evidência de um predomínio de descargas em um dos lobos temporais, mais do que 70% , é aceita para identificação da lateralidade provável. Além destas descargas epileptiformes, comumente há atividade lenta associada, representada por TIRDA (Atividade Delta Rítmica Intermitente Temporal) ou TIRTA (Atividade Theta Rítmica Intermitente Temporal) no lado correspondente ao início das crises(Lüders 2008).

A avaliação eletroencefalográfica ictal é obtida através da avaliação de vídeo-monitorização eletroencefalográfica prolongada. Neste procedimento, o paciente é mantido conectado ao aparelho de eletroencefalografia, com registro simultâneo de vídeo. Esta parte da investigação pode durar em torno de 24-72hs ou até mais tempo, dependendo da obtenção ou não de eventos ictais (crises). O objetivo é o registro de crises típicas do paciente. O estudo detalhado da semiologia da crise (fornecido pelas imagens do vídeo) e do traçado eletroencefalográfico simultâneo, permite, na maioria dos casos, identificar a zona de início ictal.

Os estudos de RM utilizam os seguintes parâmetros para a interpretação da EMT: 1) atrofia do lobo temporal anterior; 2) assimetria dos cornos temporais; 3) atrofia hipocampal e 4) alteração de sinal do hipocampo nas seqüências Flair e T2. A atrofia hipocampal e as alterações de sinal são os indicadores mais confiáveis de esclerose hipocampal (Kuzniecky 1987; Berkovic 1991; Jackson 1995). A volumetria hipocampal obtida através da RM correlaciona-se com

intensidade da esclerose hipocampal vista à análise patológica (Watson et al 1995), permitindo assim prever a gravidade da esclerose hipocampal através da RM (Watson and Cendes 1995).

Os achados clínicos, neuropsicológicos, eletroencefalográficos e de neuroimagem permitem realizar um diagnóstico preciso de ELT (Portuguez 1998; De Paola 2001; Palmini 2001; Paglioli et al. 2006). Em resumo:

- História clínica de crises têmporo–límbicas recorrentes
- Evidências de comprometimento da memória verbal ou não-verbal
- EEG interictal com mais 70% das descargas em um dos lobos temporais e ou atividade lenta temporal
- RM crânio com alteração de sinal do hipocampo e redução volumétrica do mesmo.

1.2 Por que pesquisar novas terapêuticas?

Pesquisas realizadas nas últimas décadas trouxeram muitos avanços no desenvolvimento de fármacos antiepiléticos (FAEs). No entanto um número significativo de pacientes não obtém resposta com a terapêutica medicamentosa, e, além disso, tais medicações não previnem o desenvolvimento e progressão da doença.

Sabe-se que a deterioração da memória e das habilidades cognitivas ocorre nas epilepsias crônicas, particularmente em pacientes com epilepsia do lobo temporal, e é principalmente relacionada à idade e à duração da patologia. (Helmstaedter e Kurthen 2001; Helmstaedter, Kurthen et al. 2003). Também é importante salientar o alto risco de morte súbita nesses pacientes com epilepsia refratária ao uso de fármacos antiepiléticos (Walczak et al. 2001; Almeida et al 2010) Face a essas considerações, torna-se imprescindível a tentativa de cura ou de, pelo menos melhora na qualidade de vida desses pacientes.

A ressecção cirúrgica focal de áreas cerebrais epileptogênicas é considerada a única terapêutica curativa disponível para pacientes com epilepsia. No entanto, é restrita a pacientes com epilepsia refratária ao tratamento medicamentoso, e muitos deles ainda necessitam manter o uso dessas medicações após a cirurgia. Há também muitas formas de epilepsia refratária que não são passíveis de tratamento cirúrgico. Ademais, a cirurgia de epilepsia implica em custo financeiro elevado e, em algumas situações, riscos que devem ser considerados. O risco de

ocorrerem complicações neurológicas pós-cirúrgicas varia entre 0-25% e a mortalidade de 0-3% (De Paola 2001). Dessa forma, a busca de estratégias terapêuticas menos invasivas e que possam possibilitar o tratamento da epilepsia a um maior número de pacientes é plenamente justificada.

1.3 Células Tronco

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

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

As células tronco podem ser classificadas segundo a sua potencialidade de diferenciação. São chamadas de totipotentes as células capazes de gerar todos os tipos celulares embrionários e extra-embrionários, como o zigoto; podem originar todas as células que formam o embrião (propriamente dito) e são provavelmente da camada interna do blastocisto (5º ao 7º dia de vida). As células tronco adultas ou somáticas (pós-natal) são multipotentes capazes de gerar tipos celulares que compõem tecidos e órgãos específicos de seu local de origem, mas também

pluripotentes, ou seja, com capacidade de gerar células de outros órgãos e tecidos. São pluripotentes, mas com habilidade de diferenciação mais restrita (Krause et al. 2001)

As células tronco adultas são denominadas somáticas por encontrarem-se na intimidade dos tecidos corporais (soma). Acreditava-se que estas células teriam opções mais restritas de diferenciação, podendo selecionar um programa de diferenciação dentre apenas poucas vias possíveis, ou seja, já comprometidas com determinada linhagem celular, não seriam pluripotentes a exemplo das embrionárias. Atualmente discute-se até que ponto isso é verdade, já que evidências apontam que estas células poderiam sim ignorar as restrições de sua linhagem específica, transdiferenciando-se em células com origem germinativa distinta. Estudos com células isoladas a partir do encéfalo de camundongos transgênicos mostraram diferenciação celular em células hematopoiéticas (Bjornson et al. 1999). Da mesma forma a diferenciação de células neurais a partir de células hematopoiéticas também já foi demonstrada (Mezey et al. 2000).

1.3.1 Células Tronco de Medula Óssea

A medula óssea (MO) é uma fonte permanente de células tronco pluripotentes, que podem originar não somente linhagens celulares hematógenas e mesenquimais (osso, cartilagem, adipócitos), mas também células de vasos sanguíneos (musculares lisas e endoteliais), (Korbling e Estrov 2003) e linhagens embriologicamente mais distantes tais como hepatócitos e células do sistema nervoso (Mezey et al. 2003; Silani e Corbo 2004; Mezey 2005). Uma das populações de células da medula óssea, as células tronco hematopoiéticas, é responsável pela formação de todos os tipos de células sanguíneas do corpo. A população de células estromais da medula óssea pode gerar osso e cartilagem (Petersen et al. 1999; Korbling e Estrov 2003). Essa população que se diferencia em células endoteliais foi identificada como sendo originária da medula óssea (Shii et al. 1998).

Muito se discute a respeito da plasticidade de células tronco adultas, incluindo as células tronco da medula óssea. Já foi demonstrado, por exemplo, que células da medula óssea de

camundongos podem originar microglia (Eglitis et al. 1999) e neurônios *in vivo* (Brazelton et al. 2000; Mezey, Chandross et al. 2000). Porém, ainda não se sabe quais subpopulações da medula são capazes de expressar este desenvolvimento neuronal. Além disso, a transdiferenciação de células da medula óssea em neurônios no sistema nervoso central foi também demonstrada em humanos (Cogle et al. 2004). Parece que a incorporação destas células no tecido nervoso é intensificada frente a um dano tecidual. Ainda, mesmo que estas células não regenerem o tecido lesado por transdiferenciação em determinado tipo celular é provável que a recuperação ou estabilização da doença neurológica ocorra por outros mecanismos biológicos tais como a fusão celular, a liberação de fatores tróficos, citocinas ou ativação de células endógenas (Terada et al. 2002)

. Em um estudo em mulheres que haviam recebido transplantes de indivíduos do sexo masculino para tratar suas doenças hematológicas percebeu-se que células da medula óssea podem penetrar no sistema nervoso e se diferenciar em neurônios (Goh et al. 2003; Mezey 2005) Em uma série de estudos animais, pesquisadores de diferentes grupos mostraram que células de MO injetadas na corrente sanguínea melhoraram significativamente a resposta comportamental de animais submetidos à isquemia cerebral focal. Estas células migram da corrente sanguínea para a área isquêmica e uma percentagem pequena delas expressaram marcadores neurais (Azizi et al. 1998; Eglitis et al. 1999) (Silani e Corbo 2004) (Chen et al. 2001; Li, Chen et al. 2001). Células tronco adultas podem ser convertidas em neurônios e/ou células gliais *in vivo* (Silani e Corbo 2004) (Kopen et al. 1999; Brazelton et al. 2000) (Mezey et al. 2000; Li, Chen et al. 2002; Mezey et al. 2003; Butovsky et al. 2006)

A expressão de marcadores neuronais e/ou gliais em células derivadas da medula óssea já foi amplamente demonstrada Na **quadro 2** abaixo relacionamos a espécie animal estudada, o tipo celular obtido e a referência dos estudos realizados.

Quadro 1- Efeitos obtidos em modelos animais de doenças neurológicas

Espécie	Tipo Celular ou efeito obtido	Referências
Camundongo/Niemann-Pick	Purkinje	Jin et al, 2002(Jin, Carter et al. 2002)
Camundongo/Desmielinização	Remielinização	Akiyama et al., 2002 (Akiyama, Radtke et al. 2002)
Camundongo/MPS VII	Melhora Clínica	Sakurai et al, 2004 (Sakurai, Izuka et al. 2004)
Camundongo/ALS	Neurônios e Glia	Corti et al, 2004(Corti, Locatelli et al. 2004) (Corti S 2004)
Ratos/lesão	Neurônio e Glia	Lu et al, 2001 (Lu, Mahmood et al. 2001) Mahmood et al, 2004 (Mahmood, Lu et al. 2004)
Ratos/AVC	Glia	Li et al, 2002 (Li, Chen et al. 2002)
Ratos/AVC	Neurônio e Glia	Zhao et al, 2002 (Zhao, Duan et al. 2002)
Ratos/Parkinson	Glia	Dezawa et al, 2004 (Dezawa, Kanno et al. 2004)

Quadro 2 - Tipos celulares obtidos em diferentes espécies animais

Espécie	Tipo Celular	Referências
Camundongo	Microglia	Eglitis & Mezey, 1997(Eglitis, Dawson et al. 1999);Kennedy & Abkowitz, 1997(Kennedy and Abkowitz 1997)
Camundongo	Neurônios e Glia	Kopen et al, 1999(Kopen, Prockop et al. 1999) ;Corti et al, 2002 (Corti, Locatelli et al. 2004)
Camundongo	Neurônios	Mezey et al. 2000(Mezey, Chandross et al. 2000)
Camundongo	Neurônios e Microglia	Brazelton et al., 2000 (Brazelton, Rossi et al. 2000)
Camundongo	Purkinje e Células. Gliais	Priller et al, 2001 (Priller, Persons et al. 2001)
Camundongo	Glia	Nakano et al, 2001 (Nakano, Yanagita et al. 2001)
Camundongo	Oligodendrócitos	Bonilla et al, 2002 (Bonilla, Alarcon et al. 2002)
Camundongo	Purkinje	Weimann et al, 2003(Weimann, Charlton et al. 2003), Alvarez-Dolando et al, 2003(Alvarez-Dolado, Pardal et al. 2003)
Humanos	Neurônios	Mezey et al, 2003(Mezey, Key et al. 2003)

Em humanos o transplante autólogo de células tronco de medula óssea já se mostrou bem sucedido no tratamento de cardiopatias. O procedimento foi efetivo na regeneração do músculo cardíaco humano e na revascularização da área infartada e mostrou-se seguro(Perin, Dohmann et al. 2003; Vilas-Boas, Feitosa et al. 2006)

Em doenças neurológicas a maior experiência é em acidente vascular cerebral (AVC). Primeiro estudo clínico com terapia celular em humanos com AVC incluiu 12 pacientes tratados com implante de neurônios derivados de um teratocarcinoma (Bjorklund e Lindvall 2000).Os estudos já realizados em pacientes com AVC e conduzidos por nosso grupo evidenciaram a segurança do procedimento (Araújo 2008)

1.3.4 Terapia Celular em Epilepsia

Os modelos experimentais de ELT utilizam o processo de *kindling* das estruturas límbicas (como amígdala e hipocampo) ou indução de *status epilepticus* induzido por lítio-pilocarpina (ou outras substâncias como ácido kaínico), baseado nesses experimentos formulou-se o conceito de que um dano neuronal inicial desencadeia uma cascata de eventos neurobiológicos que levam à ocorrência de crises espontâneas. (Morimoto et al. 2004) Ao longo dos anos esses experimentos também auxiliaram na quebra do conceito de que células neuronais adultas não poderiam se regenerar.

Até bem pouco tempo, a ciência desconhecia a capacidade regenerativa do cérebro. Sabe-se hoje que, a despeito do que se acreditou por décadas, novos neurônios podem sim ser integrados a determinadas regiões do encéfalo adulto a partir de células progenitoras neurais ou células-tronco adultas neurais, em um processo chamado neurogênese (Gross 2000). Na maioria dos mamíferos, a neurogênese ocorre ao longo de toda a vida na zona subventricular do ventrículo lateral e na zona subgranular do giro denteado no hipocampo (Ming e Song 2005).

A neurogênese induzida por crises epiléticas e também por outros insultos como isquemia cerebral já foi amplamente demonstrada (Parent 1997; Parent 2003). O conceito de neurogênese no cérebro adulto, hoje já amplamente conhecido, principalmente a que ocorre na zona subventricular e na zona subgranular do giro denteado, motivou o desenvolvimento de técnicas que aproveitassem esse mecanismo na tentativa de obtenção de efeitos antiepileptogênicos e reparadores (Fisher et al 1998). Estudos já demonstraram que a terapia celular em modelos experimentais de epilepsia aguda e crônica resulta em efeitos anticonvulsivantes, talvez antiepileptogênicos e neuroprotetores/neuroreparadores. (Loscher, Ebert et al. 1998) (Costa-Ferro 2010). A maior parte dos estudos em vigência hoje, e que buscam tal finalidade, trabalha o uso de transplante de células progenitoras neurais ou de células fetais em modelos experimentais (Shetty and Hattiangady 2007; Loscher, Gernert et al. 2008). Células tronco embrionárias, neurais, e de medula óssea são candidatas ideais para o transplante terapêutico em diversas doenças neurológicas e também em epilepsia em estudos clínicos e experimentais (Zhao et al. 2002; Cogle et al. 2004; Silani e Corbo 2004) (Costa-Ferro 2010). No

entanto a terapêutica com células tronco de medula óssea parece bastante interessante e promissora.

Em doenças neurológicas a maior experiência é em acidente vascular cerebral (AVC). Primeiro estudo clínico com terapia celular em humanos com AVC incluiu 12 pacientes tratados com implante de neurônios derivados de um teratocarcinoma (Bjorklund and Lindvall 2000). Os estudos já realizados em pacientes com AVC e conduzidos por nosso grupo evidenciaram a segurança do procedimento (Araújo 2008).

1.3.4.1 Células tronco e Epilepsia: Estudos pré-clínicos

Os efeitos do transplante celular foram investigados em uma série de modelos experimentais de epilepsia como, por exemplo, em ratos geneticamente epiléticos (*genetically epilepsy-prone*), hipocampo subcorticalmente denervado e administração de ácido caínico ou pilocarpina (Eglitis, Dawson et al. 1999) A supressão das crises foi demonstrada em vários destes modelos. A maioria destes estudos foram realizados utilizando o modelo do *kindling* em ratos, que se assemelha ao tipo mais comum de epilepsia em indivíduos adultos (epilepsia do lobo temporal, crises parciais complexas). Lesões neuronais por neurotoxinas em vias noradrenérgicas, serotoninérgicas ou colinérgicas são utilizadas para facilitar o desenvolvimento do *kindling*. (Nestes animais, o transplante de neurônios embrionários noradrenérgicos, serotoninérgicos ou colinérgicos é eficiente em restaurar o desenvolvimento de crises induzidas pelo *kindling* Clough, Statnick e Maring-Smith 1996). Este efeito antiepileptogênico se correlaciona bem com a extensão da inervação noradrenérgica ou colinérgica derivada do enxerto e estabelecida na estrutura cerebral onde é aplicado o estímulo elétrico para a indução do *kindling*. Transplante de neurônios gabaérgicos estriatais fetais determinam efeito anticonvulsivante com supressão da propagação e generalização das crises em animais pós-*kindling* (Kokaia, Cenci et al. 1994; Loscher, Ebert et al. 1998) vide tabela. Células tronco quando transplantadas no cérebro, podem migrar para o tecido lesado recuperando a função neurológica (Azizi, Stokes et al. 1998; Akiyama, Radtke et al. 2002; Lee, Kuroda et al. 2003).

Alguns estudos utilizando células tronco humanas transplantadas para o cérebro de ratos com epilepsia induzida pelo modelo da pilocarpina mostraram redução no número de crises epiléticas (Chu, Kim et al. 2004). O benefício desta terapêutica no que diz respeito à redução de crises epiléticas e recuperação da estrutura hipocampal na epilepsia temporal já foi demonstrado no modelo experimental do lítio-pilocarpina (Costa 2006; Venturini 2008) (Costa-Ferro 2010), porém sua utilização até então não havia sido testada em humanos.

Evidências experimentais no modelo de crises induzidas por eletro choque evidenciam aumento da neurogênese angiogênese hipocampal, sugerindo um mecanismo de reparo (Hellsten, West et al. 2005) (Madsen, Treschow et al. 2000). A possibilidade de “auxiliarmos” este mecanismo fisiológico quando este falha nas epilepsias refratárias poderia ser a base do tratamento com CT de medula óssea.

Quadro 3- Modelos de Epilepsia efeito do transplante de células tronco

Modelo de Epilepsia	Tipo de transplante	Resultados	Correlação Clínica
Kindling em ratos depletados de serotonina ou acetilcolina	Neurônios embrionários no hipocampo (noradrenalina ou acetilcolina) ou bulbo olfatório (serotonina)	Retardo no desenvolvimento das crises relacionado com a extensão do enxerto	Efeito antiepileptogênico
Kindling em ratos epiléticos	Neurônios gabaérgicos embrionários estriatais	Redução da propagação e generalização das crises	Efeito anticonvulsivante
Pilocarpina em ratos	CT fetais humanas		Efeito anticonvulsivante
Lítio-Pilocarpina em ratos	Xenotransplante Fração mononuclear de medula óssea, pós-status epilepticus	Não desenvolveram epilepsia	Efeito antiepileptogênico (Costa et al, 2006) (Costa 2006)
Lítio-Pilocarpina em ratos	Xenotransplante Fração mononuclear de medula óssea, pós crises epiléticas crônico-recidivantes	Redução em 50% na frequência de crises epiléticas	Efeito anticonvulsivante (Costa et al, 2006; Venturini 2008; Costa-Ferro 2010)

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a factibilidade e segurança do procedimento proposto (transplante autólogo de células tronco da medula óssea em pacientes com epilepsia).

2.2 Objetivos Específicos

- 1- Avaliar a factibilidade do procedimento de obtenção e transplante de CTMMO;
- 2- Verificar a ocorrência de possíveis intercorrências clínicas durante o procedimento e durante o período de seguimento;
- 3- Quantificar a frequência de crises epiléticas após 3 e 6 meses do procedimento e comparar com o período anterior;
- 4- Identificar possíveis modificações no padrão do Eletroencefalograma interictal durante a infusão de CTMMO e após 3 e 6 meses do procedimento;
- 5- Avaliar pelo exame de Ressonância Magnética de Encéfalo as estruturas mesiais temporais e o volume do hipocampo antes do procedimento e 6 meses após.

3 Material e Métodos

3.1 Delineamento

O delineamento utilizado foi o de um estudo clínico prospectivo auto-controlado de casos selecionados a partir de uma população de pacientes portadores de epilepsia que se apresentaram como candidatos ao estudo. O fator em estudo foi o transplante autólogo de células tronco mononucleares de medula óssea para tratamento de epilepsia. O desfecho foi o surgimento ou não de intercorrências durante o procedimento e no período de seguimento.

3.2 Variáveis

As variáveis clínicas analisadas foram as seguintes: sexo, idade, tempo de evolução da doença, frequência de crises epiléticas e intercorrências durante o procedimento e seguimento, padrão do EEG, volumetria hipocampal.

3.3 Pacientes

A partir de uma população de 120 pacientes com epilepsia, encaminhados diretamente por outros colegas ou avaliados após anúncio pela imprensa, selecionamos 12 pacientes,

excluímos 3 durante a fase pré – procedimentos e nove foram então submetidos ao protocolo completo. Os nove indivíduos selecionados (quatro homens e 05 mulheres) fechavam critérios diagnósticos de ELT com EH unilateral refratários ao tratamento medicamentoso (segundo os critérios da ILAE: permanência de crises epiléticas em pacientes usando pelo menos dois FAEs em dose plena há pelo menos 01 ano). Cada paciente devia preencher os critérios de lateralização da doença: foco epilético e maior grau de atrofia hipocampal do mesmo lado, não devendo ocorrer divergências quanto à lateralidade.

Critérios de Inclusão:

- 1- Idade acima de 18 anos.
- 2- Refratária ao tratamento medicamentoso.
- 3- Exame de neuroimagem (RM) com sinais de esclerose hipocampal (EH).
- 4- Assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

Critérios de Exclusão:

- 1- Impossibilidade de obter acesso vascular para procedimento percutâneo;
- 2- Neoplasias Malignas;
- 3- Doenças auto-imunes;
- 4- Outras doenças neurodegenerativas;
- 5- Insuficiência cardíaca aguda ou descompensada;
- 6- Doenças hematológicas primárias;
- 7- Osteopatias que traduzam aumento de risco à punção medular;
- 8- Coagulopatias;
- 9- Insuficiência hepática;
- 10- Insuficiência renal moderada (creatinina acima de 2 mg/dl);
- 11- Gravidez;
- 12- Participação em outro ensaio clínico.

3.4 Exames complementares

Todos os pacientes foram submetidos aos seguintes exames pré-procedimento:

- 1-Eletrocardiograma

2- Coleta de sangue para dosagem de: glicose, sódio, potássio, creatinina, hemograma, plaquetometria, TGO, TGP, TP e KTTTP.

3-Vídeo- EEG durante 24-72hs e EEG de 30 minutos

Os eletroencefalogramas foram realizados em um aparelho EMSA BNT de 36 canais utilizando montagens segundo o sistema internacional 10-20 tanto registro de crises epiléticas (monitorizadas também por vídeo) quanto para a análise do padrão eletroencefalográfico interictal (na internação e nos controles de 3 e 6 meses). A análise permitiu a localização do foco epilético (temporal esquerdo ou direito). Foram selecionadas amostras de 5 minutos de EEG em vigília tanto da monitorização por Vídeo EEG, quanto dos EEGs de controle. Dessas amostras foram selecionados períodos aleatórios de registro em vigília para cada paciente nos quais quantificou-se a quantidade de segundos em que aparecem ondas theta (Densidade de Theta) e a quantidade de ondas agudas e pontas (Densidade de Pontas)

4-Ressonância Magnética do cérebro com estudo hipocampal

4.1 Sequências de aquisição

Todos os pacientes foram examinados em um aparelho Siemens Magnéton Vision Plus de 1,5 T com bobinas de gradiente de 25mT/m (amplitude máxima de gradiente). As seqüências utilizadas, bem como os valores de referência para os volumes hipocampais foram determinadas por um protocolo previamente utilizado no serviço (Paglioli et al. 2004). (Hoefel Filho 2009). O volume hipocampal foi calculado com o auxílio do software Image Pro Plus, versão 4.5.1.

1. Aquisição T1: Obtida com aquisição volumétrica no plano sagital com uma seqüência Echo Gradiente 3D com 160 partições e espessura de corte de 0,9mm. Estes parâmetros permitiram um voxel isotrópico.
2. Aquisição T2: Realizada nos planos axiais e coronais com espessura de corte de 5 mm e espaçamento de 3,5. As aquisições foram feitas com e sem supressão de gordura para identificação de alterações de sinal nas estruturas encefálicas e aumento de sinal nos hipocampos
3. Aquisição Flair: Seqüência desenvolvida a partir o T2 com supressão do sinal da água. Realizada com espessura de corte 5 mm e espaçamento de 1,5. Nessa aquisição as alterações de sinal são

consideradas como decorrentes à lesão atual ou à seqüela de lesão (gliose). Obtida nos planos axial com a mesma orientação do T2.

4. Aquisição IR ou Inversion Recovery ponderada em T1: Realizada com espessura de corte 3mm e espaçamento de 0,9 mm. Avalia forma e espessura da camada cortical e a interdigitação da substância branca. Utilizada também para avaliação volumétrica quantitativa do hipocampo através do pós processamento dos dados.
5. Aquisição STIR ou Supression T2 Inversion Recovery: Espessura de corte de 3 mm de espaçamento 0,9mm. Obtida no plano coronal desde o pólo temporal até a cruz dos fórnices. Identifica a alteração de sinal T2 dos hipocampos e estruturas para-hipocampais.

3.5 Coleta de Medula Óssea

As células-tronco foram coletadas diretamente por punção única da crista ilíaca posterior, sob anestesia local, após antissepsia. O material foi coletado através de repetidas aspirações através do redirecionamento/reposicionamento da agulha própria para coleta de medula óssea em outras angulações, não sendo de forma alguma necessárias outras incisões de pele e punções do osso do quadril. Foram utilizadas 10 seringas (contendo 0,5 ml de heparina cada a fim de evitar a coagulação das amostras) de 20 ml para a coleta de um volume total almejado de pelo menos 50 ml.

3.6 Processamento das Células Mononucleares

As células mononucleares foram separadas por gradiente de densidade com Ficoll-Paque. A meta mínima foi a coleta de ao menos 4×10^7 células mononucleares.

As células foram lavadas com soro fisiológico heparinizado contendo 5% de albumina humana e passadas em filtro de nylon de 100 μm . As células são finalmente ressuspensas em

soro fisiológico 0,9% com 5% de albumina para infusão em uma solução final contendo cerca de 5 ml. Cerca de 500µl da solução foram separados citometria de fluxo (técnica utilizada para contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo) imunofenotipagem (processo de classificação de células do sistema imune – linfócitos T- em subgrupos baseados em antígenos CD) As células em questão são as seguintes: CD 34 que são células precursoras hematopoiéticas, células do endotélio vascular; CD 45 que são células hematopoiéticas; CD 105 que são células endoteliais da medula óssea; CD 117 que são células progenitoras hematopoiéticas Outros 500 µl foram separados para congelamento em nitrogênio líquido, visando eventual necessidade de nova fenotipagem ou reavaliação de viabilidade celular.

3.7 Transplante de Células Tronco de Medula Óssea via Cateterismo Seletivo da Artéria Cerebral Posterior

Entre $1,51$ e $5,59 \times 10^8$ células foram injetadas na artéria cerebral posterior, no mesmo dia do isolamento das células, através de cateter, após arteriografia, utilizando técnica semelhante à utilizada para realização do amital sódico (Teste de Wada) e habitualmente realizada no nosso Serviço (Paglioli, et al. 2004). Inicialmente foi realizada uma arteriografia dos 4 principais vasos cerebrais via punção femoral, utilizando um cateter 5F. Posteriormente, foi escolhida a artéria vertebral menos tortuosa e mais calibrosa para a colocação de um cateter guia 6F e a seguir foi introduzido um microcateter tipo Tracker 18. Com o paciente sob heparinização de pelo menos 5000 UI o cateter foi conduzido com a ajuda de um fio guia até a porção peduncular da artéria cerebral posterior do lado a ser injetado. Esta porção arterial é a principal responsável pela vascularização das estruturas mesiais temporais (Raupp 1998)

O volume de infusão foi de aproximadamente 30 mililitros em infusão contínua durante 30 minutos. A solução consiste de células dissolvidas em plasma. Durante a infusão de CTMMO os pacientes foram monitorizados clinicamente e com eletroencefalograma durante todo o procedimento, para observação imediata de possíveis efeitos adversos.

3.8 Sequência do Protocolo de Pesquisa

Seleção de pacientes segundo os critérios mencionados anteriormente: utilizando o diário de crises dos pacientes (os quais já traziam consigo agendas, cadernos ou folhas avulsas contendo a marcação dos dias em que apresentavam crises) como parâmetro para definir a frequência de crises (no seguimento foi utilizada também a classificação de crises de Engel (Engel 1993)), RM prévias ao estudo para análise visual das estruturas visuais temporais (o estudo volumétrico do hipocampo é realizado somente após a internação), história clínica e exame neurológico

Internação dos pacientes durante um período de 7 dias seguindo o seguinte protocolo:

1º dia: assinatura do termo de consentimento informado, internação, Ressonância Magnética, realização de exames laboratoriais, avaliação neurológica e neuropsicológica (dados que serão apresentados em outro trabalho de pós-graduação), eletrocardiograma, retirada das medicações anticonvulsivantes, início da monitorização videoeletrencefalográfica.

2º dia: vídeo EEG

3º dia: vídeo EEG

4º dia: reintrodução das drogas anticonvulsivantes;

5º dia: coleta de medula óssea, processamento das células mononucleares de medula, transplante de células tronco por arteriografia, monitorização por vídeo EEG. O transplante é realizado no lado onde se observou menor volume hipocamapal, predomínio de atividade epileptogênica interictal e início ictal registrados pelo vídeo EEG

6º dia: termino da monitorização por vídeo EEG,

7º dia: alta hospitalar mantendo FAEs em dose plena

3º mês: reavaliação neurológica e neuropsicológica, avaliação dos diários de crises, EEG de 30 minutos; manutenção dos FAEs

6º mês: reavaliação neurológica e neuropsicológica, EEG de 30 minutos, avaliação dos diários de crises, realização de RM

3.9 Considerações Éticas

Esse estudo integra o projeto “Transplante Autólogo de Células-Tronco da Medula Óssea em Pacientes com Epilepsia” foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS (CEP) em 12 de junho de 2007 (Ofício 0931/07) e pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (parecer nº947/2007, CAAE 0194.0.002.000-07) em 11 de dezembro de 2007.

Todos os pacientes que preencheram os critérios de inclusão, sem ter critérios que os excluam de participar neste protocolo receberam informações sobre o estudo, esclarecendo riscos e benefícios. Além de receberem informações verbais, eles receberam duas vias de Termo de Consentimento Informado (TCI), onde devem consentir na participação do estudo. Uma das vias do TCI permanece com o paciente e a outra com o investigador.

Este estudo foi totalmente financiado pelo FINEP – Projeto número 146 – UBEA – PUCRS –CTEP Ref. 5244/06.

3.10 Análise Estatística

As variáveis foram analisadas com o auxílio do software SPSS 18.9 através de análise tabular simples, e teste t..

4 Resultados

4.1 Perfil e Variáveis Demográficas

Após uma seleção entre 120 candidatos, selecionamos 12 pacientes. Três deles foram excluídos do estudo por quebra de protocolo (Tabela 1). Foram estudados então 9 pacientes sendo 5 deles mulheres e 4 homens (Tabela 2)

Tabela 1- Pacientes excluídos do estudo

Pacientes	Motivo de Exclusão no Estudo
10	Sem comprovação de atrofia hipocampal à volumetria
11	Crises originadas na região rolândica
12	Presença de Disgenesia Hipocampal

Tabela 2 - Perfil dos pacientes submetidos ao transplante autólogo de células tronco de medula óssea

Paciente	Escolaridade	SEXO	Idade da 1ª Crise Convulsiva	Crise Febril Na infância	Tempo de Evolução Da Doença (em anos)	História Familiar de Epilepsia
1	3º grau	Feminino	35	Não	5	Não
2	3º grau	Feminino	43	Não	15	Sim
3	1º grau incompleto	Masculino	8	Não	6	Não
4	1º grau incompleto	Masculino	2	Não	40	Não
5	3º grau	Masculino	10	Não	30	Sim
6	1º grau incompleto	Feminino	18	Sim	30	Sim
7	2º grau	Feminino	19	Não	30	Não
8	1º grau incompleto	Masculino	1	Sim	26	Não
9	2º grau	Feminino	2	Não	37	Não

4.2 Intercorrências durante o procedimento de cateterismo e durante o seguimento

Quatro pacientes (pacientes 1, 2,6 e 8) referiram cefaléia leve no dia que sucedeu o procedimento. A paciente 2 permaneceu com cefaléia moderada durante 45 dias após o procedimento, sendo que já tinha histórico de migrânea crônica.

Nenhum paciente desenvolveu hematomas no local de punção da arteriografia, também nenhum paciente queixou-se de dor no local de punção para coleta de medula óssea.

Durante o procedimento de arteriografia, todos os pacientes foram acompanhados pela equipe de pesquisa e monitorizados por Video EEG. Nenhum paciente apresentou qualquer intercorrência durante todo o procedimento. Nenhuma crise epilética foi registrada, bem como alteração adicional no traçado de base eletroencefalográfico.

Um paciente (paciente 3) apresentou quadro de psicose pós-ictal durante a monitorização por Video EEG rapidamente revertido com uso de clobazan 20 mg. Este paciente também apresentava histórico de depressão (além das drogas antiepiléticas usava também fluoxetina. Este paciente também passou por um período de luto devido ao falecimento do avô no 4º mês de seguimento.

A paciente 6 por conta própria parou de usar as medicações antiepiléticas no segundo mês de seguimento, reiniciando o uso regular após o 3º mês.

4.3 Volume de medula coletado e Fenotipagem

Foram coletados entre 55 e 80 ml de medula óssea com média de 66,6 ml , o que propiciou a obtenção de 1,9 a 5, 59 x 10⁸ com média de 3,53 x 10⁸ células mononucleares, (Tabela 3)

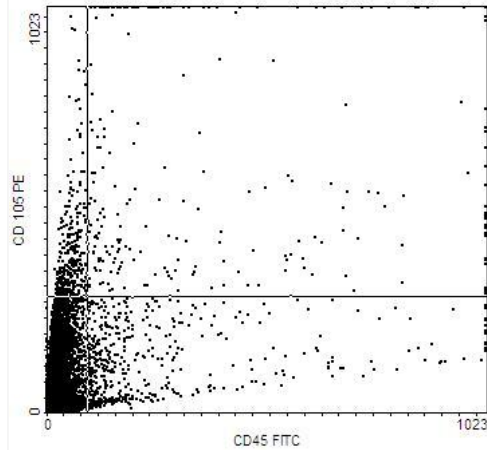
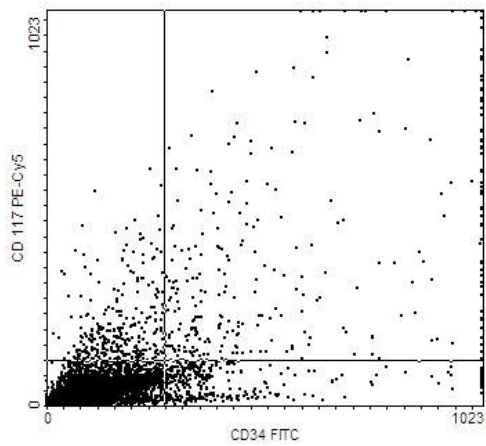
Tabela 3- Volume de medula óssea coletado, número de células mononucleares obtidas

Paciente	Volume coletado(ml)	Número de células x 10⁸ células (x 10⁸)
1	55	3,6
2	65	1,9
3	70	3,59
4	60	3,12
5	80	3,9
6	70	4,41
7	60	5,59
8	70	4,2
9	70	1,51

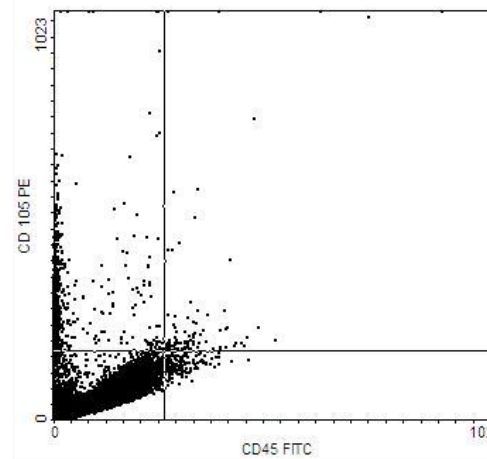
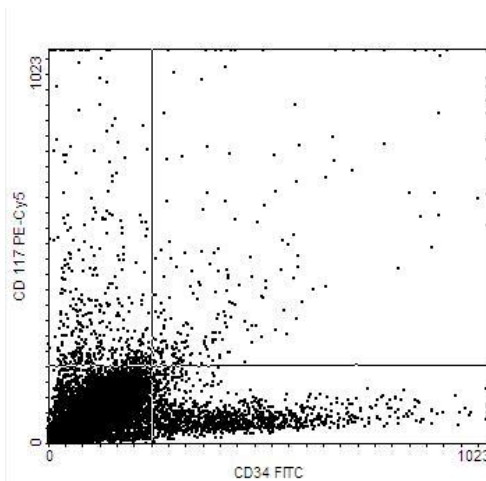
A fenotipagem das células tronco obtidas pode ser observada nos gráficos de dispersão abaixo, os quais são organizados em quadrantes (inferior direito, inferior esquerdo, superior direito e superior esquerdo) a fim de verificar possível predomínio de um subtipo celular específico (CD 45/CD 105, CD 117/CD34). Nos gráficos a seguir observamos que em sua maioria as células caem no quadrante inferior esquerdo, no qual não é possível especificar qual grupo celular predominante

Gráficos de Dispersão das células tronco CD 117/CD 34 e CD 105/CD 45 à citometria de fluxo e seus percentuais em cada quadrante

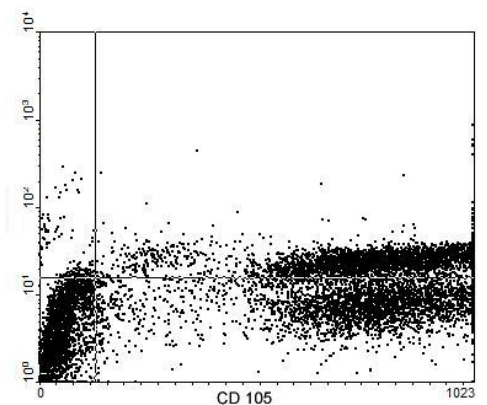
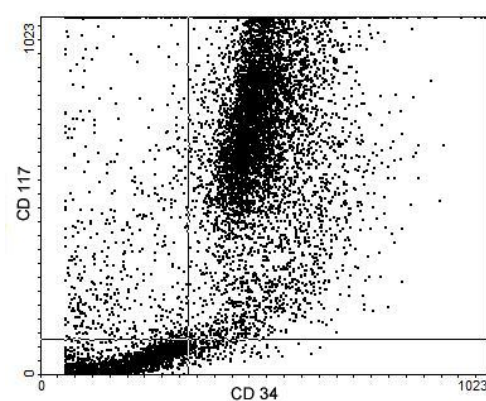
Paciente 1



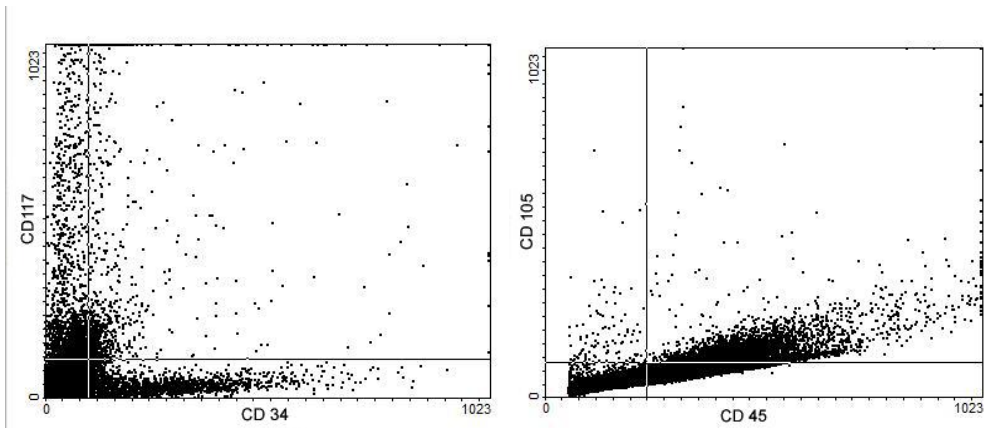
Paciente 2-



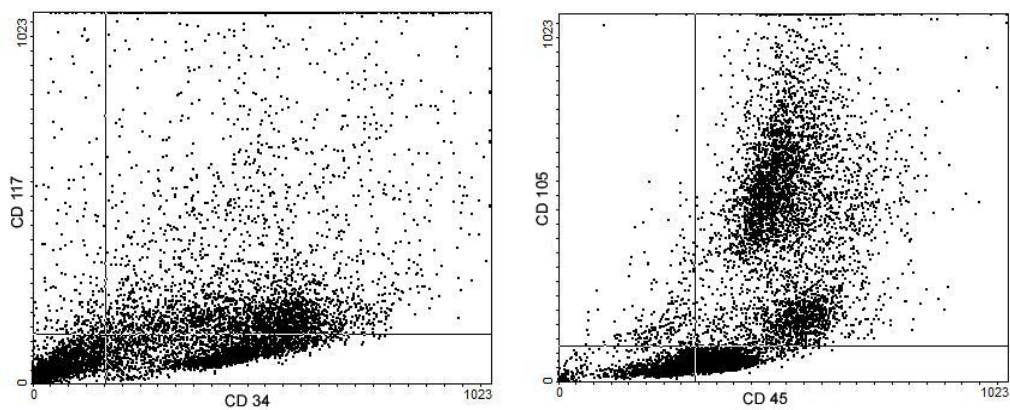
Paciente 3 –



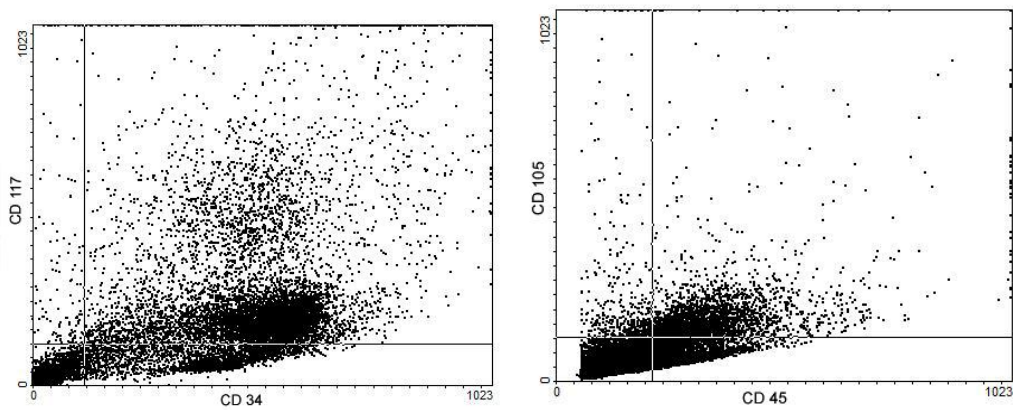
Paciente 4 –



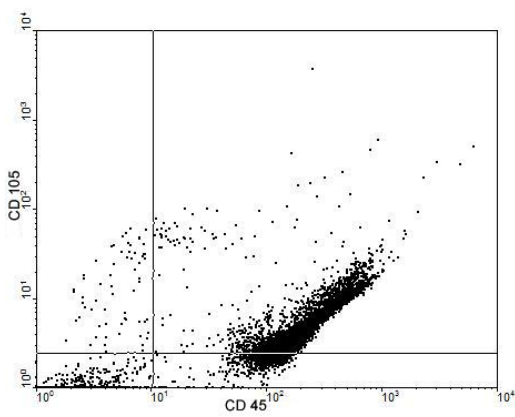
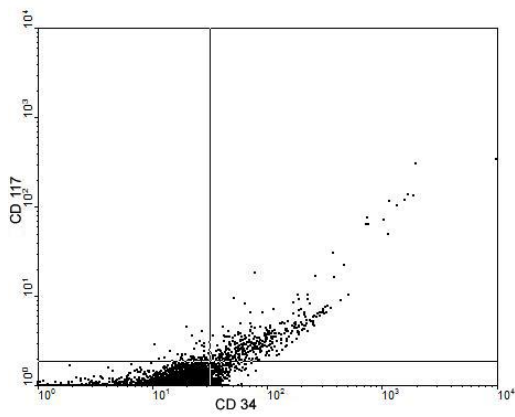
Paciente 5 –



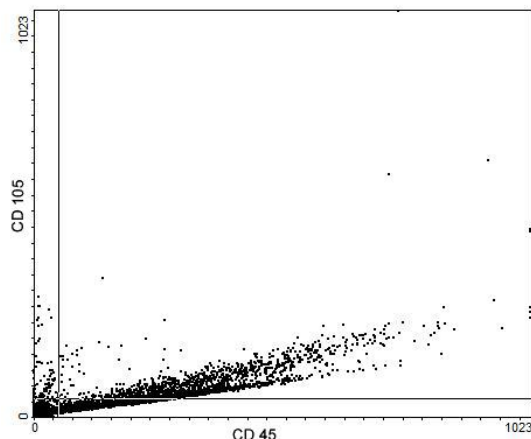
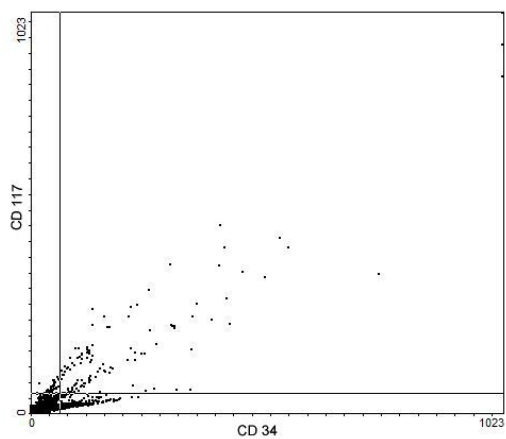
Paciente 6



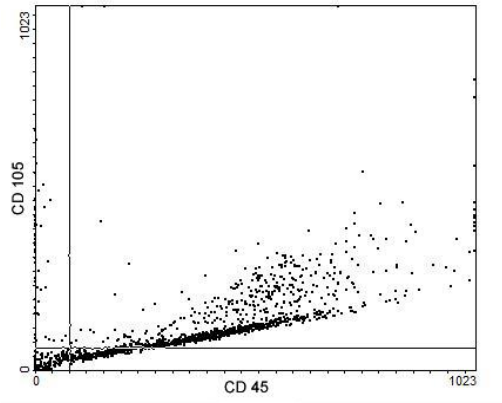
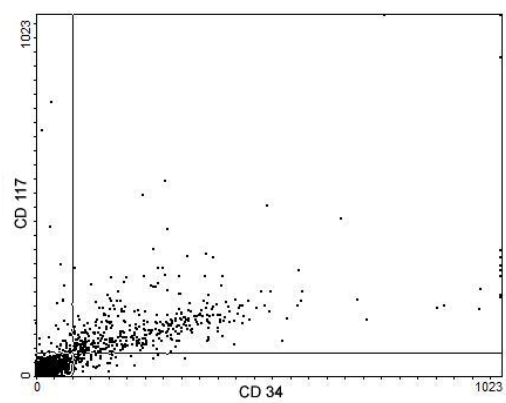
Paciente 7



Paciente 8 –



Paciente 9



4.4 Análise da Video monitorização Eletroencefalográfica

Foram registradas entre 2 a 6 crises, sendo que 6 pacientes têm a origem de suas crises no lobo temporal esquerdo (Tabela 4).

Tabela 4- Análise do Registro de Crises Epiléticas

Paciente	CRISES REGISTRADAS	Início Ictal
1	2	Temporal anterior e médio esquerdo
2	2	Temporal anterior e médio esquerdo
3	2	Temporal anterior e médio esquerdo
4	6	Temporal anterior e médio esquerdo
5	2	Temporal anterior e médio esquerdo
6	2	Temporal anterior e médio esquerdo
7	2	Temporal anterior e médio direito
8	2	Temporal anterior e médio direito*
9	5	Temporal anterior e médio direito

A semiologia das crises observadas nos pacientes do estudo é exibida na tabela abaixo (Tabela 5)

Tabela 5 – Semiologia Ictal dos Pacientes Submetidos ao Transplante de CTMMO

Paciente	Semiologia Ictal
1	Comprometimento de consciência, fixação do olhar, distonia de membro superior direito
2	Sensação inespecífica, comprometimento de consciência, fixação do olhar, automatismos gestuais
3	Sensação Epigástrica, comprometimento de consciência, fixação do olhar, automatismos oroalimentares
4	Sensação epigástrica, comprometimento de consciência, automatismos de membro superior, distonia membro superior direito
5	Déjà vu, comprometimento de consciência, automatismos gestuais
6	Comprometimento de consciência, fixação do olhar, distonia de membro superior direito, automatismo de membro superior esquerdo
7	Comprometimento de consciência, automatismos oroalimentares, automatismos gestuais (“esfregando” o tórax)
8	Sensação epigástrica, comprometimento de consciência, fixação do olhar, poucos automatismos gestuais
9	Sensação indefinida, comprometimento de consciência, fixação do olhar, automatismos oroalimentares e gestuais

Abaixo se encontram as amostras dos 10 primeiros segundos de crise epilética de cada um dos pacientes ocorridas antes do procedimento de transplante de CTMMO.

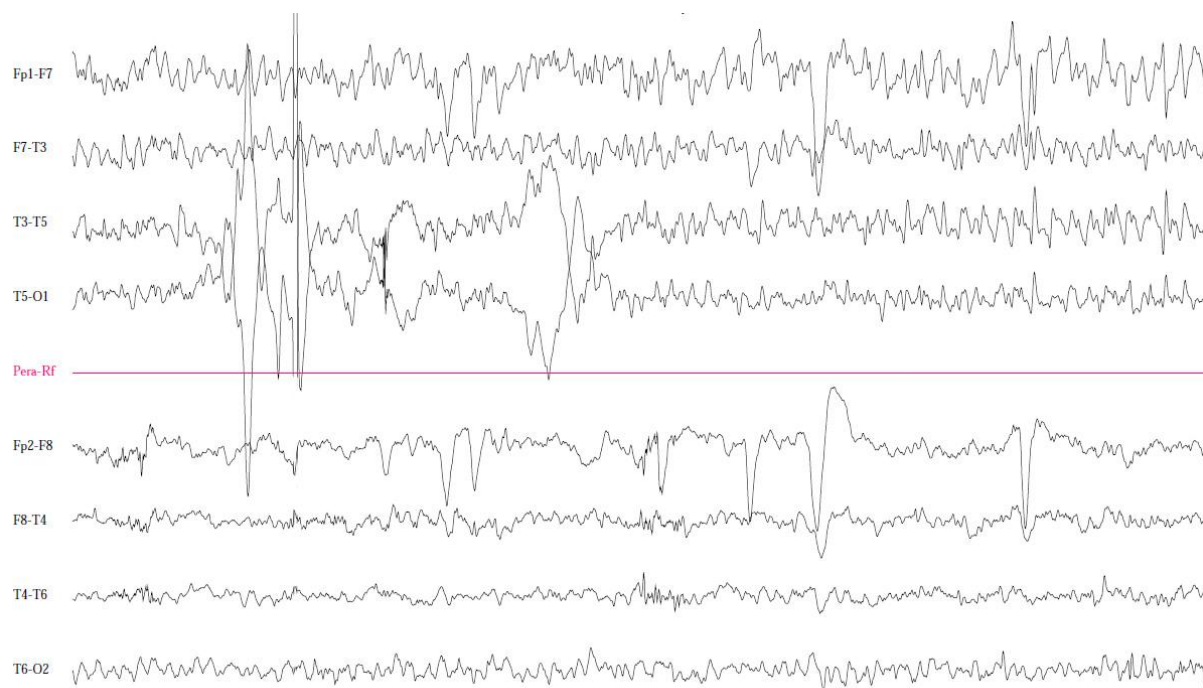


Figura 1- EEG do paciente 1, montagem longitudinal temporal mostrando início ictal (atividade recrutante) na região temporal anterior e médio esquerdo, presença de alguns artefatos de movimentação nos eletrodos T3 e T5

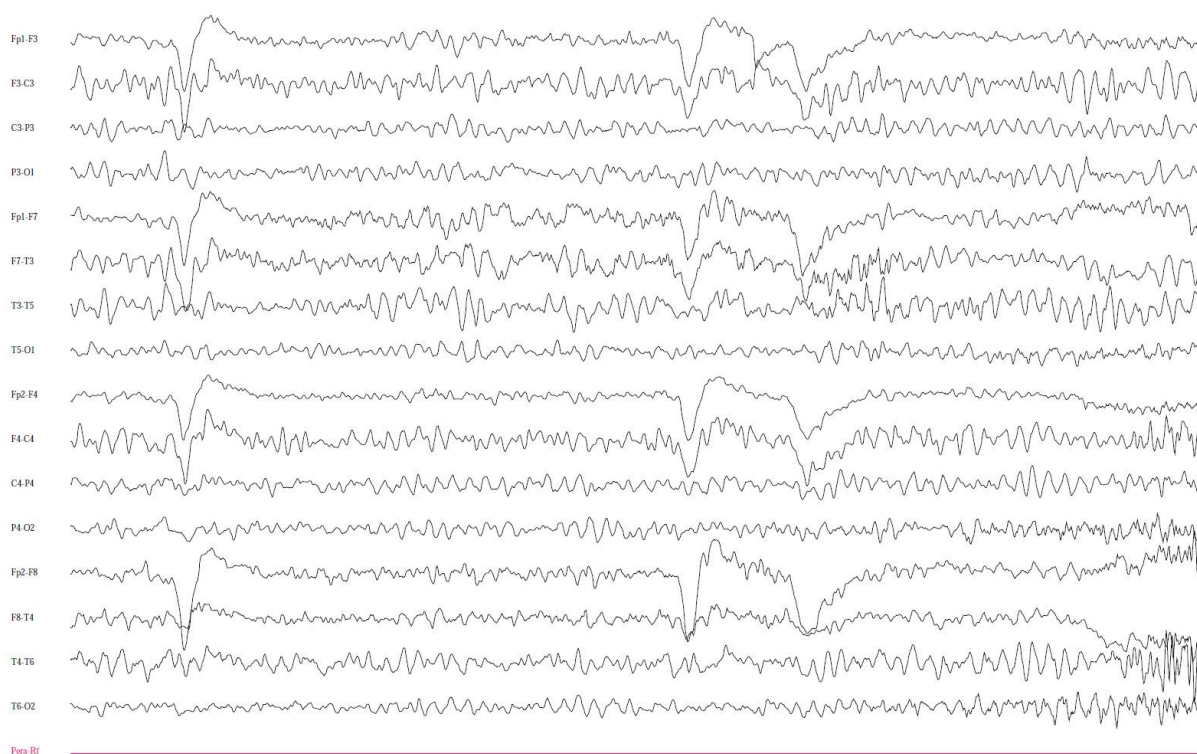


Figura 2 – EEG do paciente 2, montagem longitudinal para sagital e temporal obtido em vigília, mostrando artefatos de movimento palpebral e início ictal temporal anterior e média esquerda

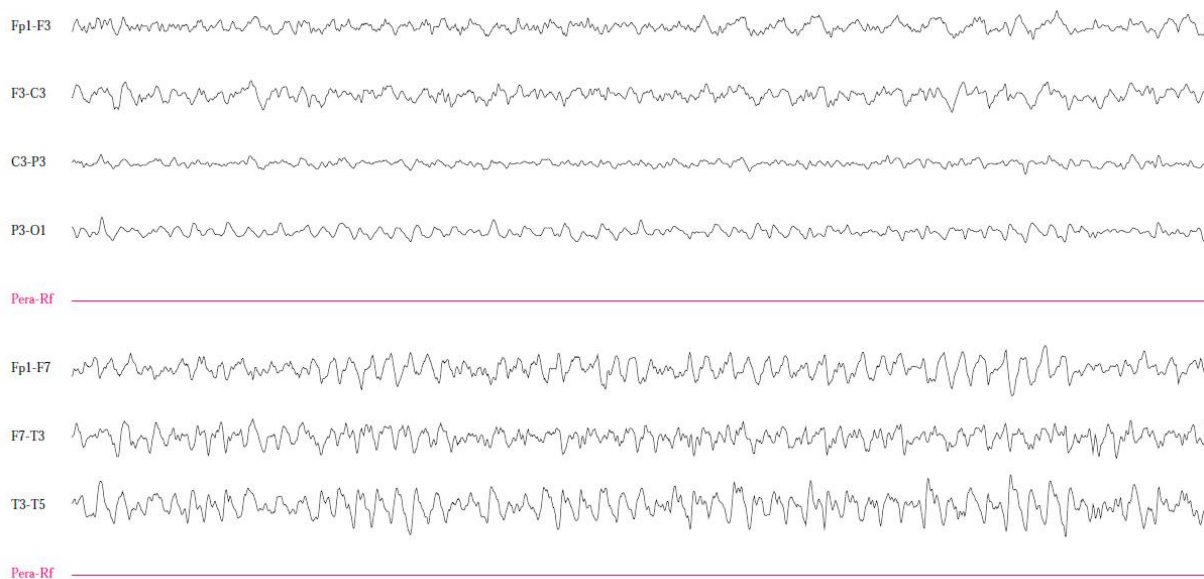


Figura 3 – EEG do **paciente 3** – montagem longitudinal temporal mostrando atividade theta rítmica em amplitude crescente no região temporal esquerda

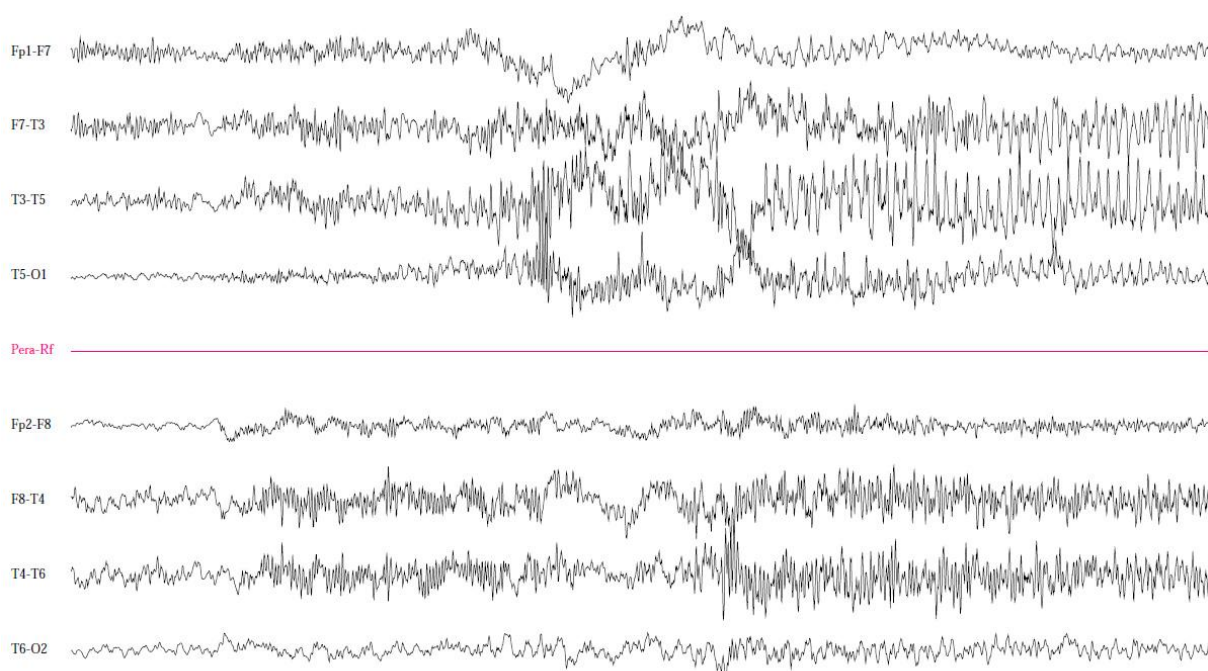


Figura 4 – EEG do **paciente 4**, montagem longitudinal temporal, observa-se atividade de pontas de alta freqüência com início na região temporal anterior e média esquerda e propagação contralateral

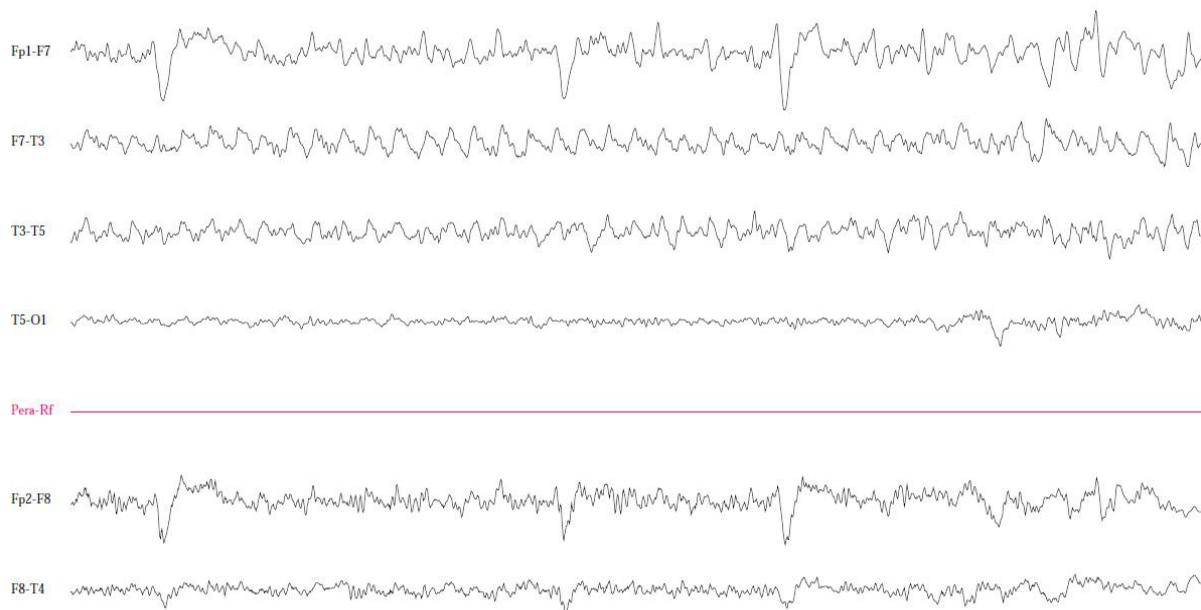


Figura 5 – EEG do **paciente 5**, montagem longitudinal temporal , mostrando atividade ictal theta rítmica na região temporal anterior e média esquerda

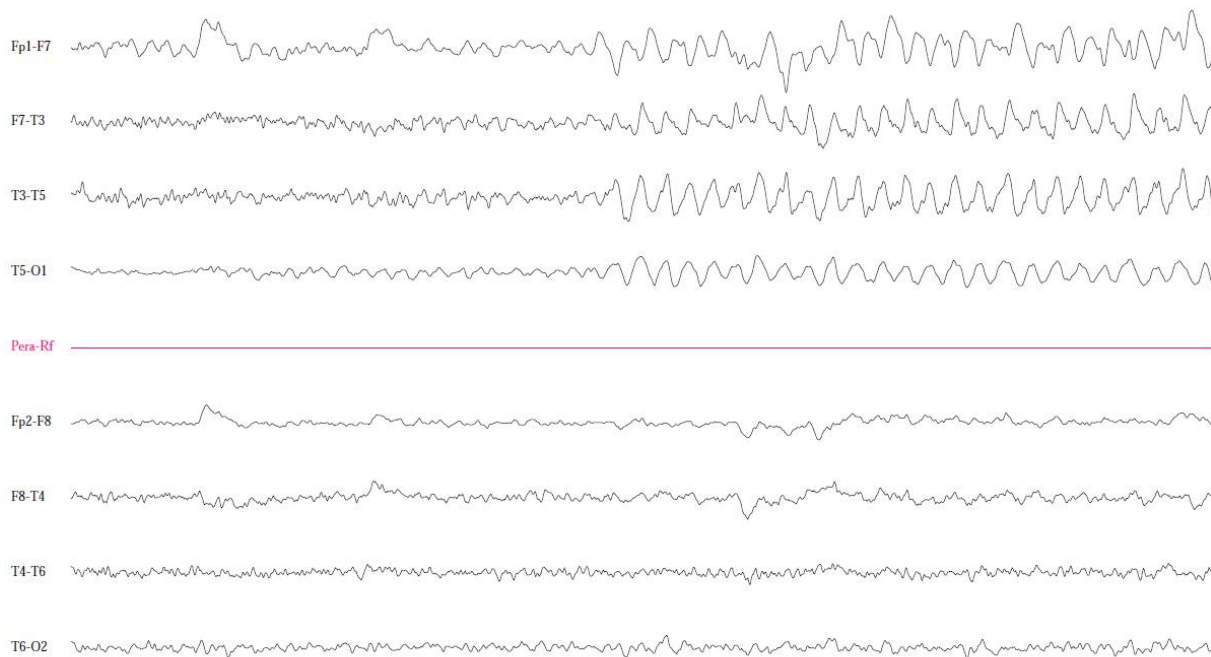


Figura 6 – EEG do **paciente 6**, montagem longitudinal temporal mostrando atividade theta rítmica temporal esquerda I,

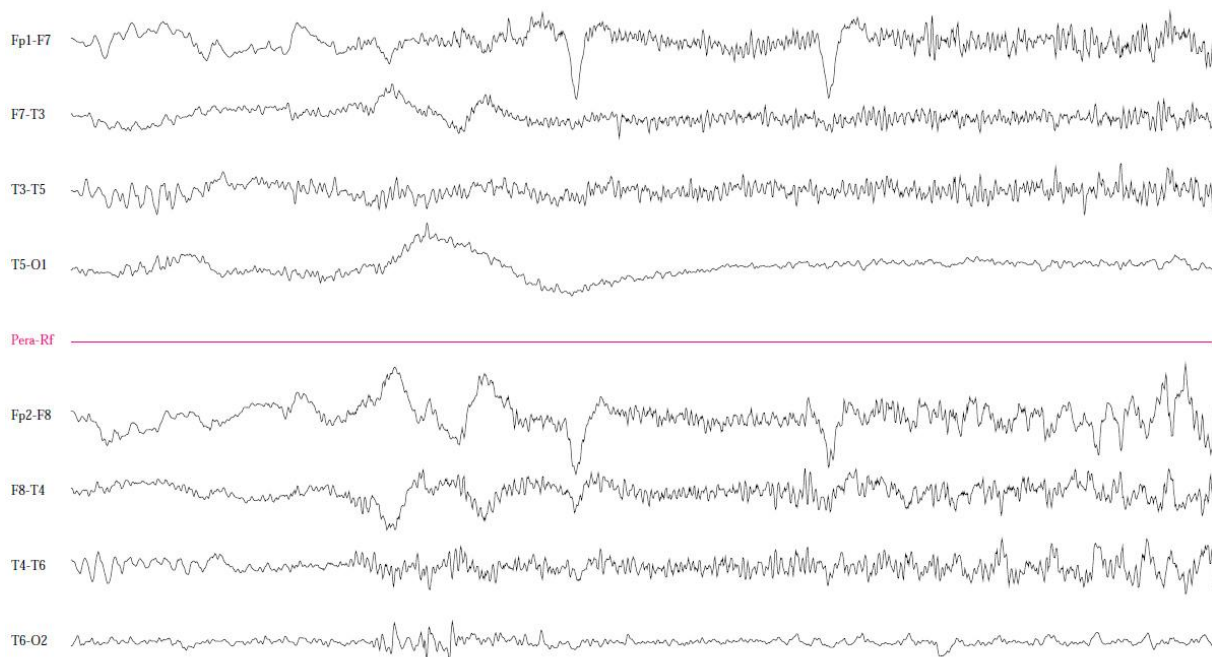


Figura 7 – EEG do **paciente 7**, montagem longitudinal temporal, mostrando dessincronização temporal anterior e média direita e atividade rápida na frequência beta.

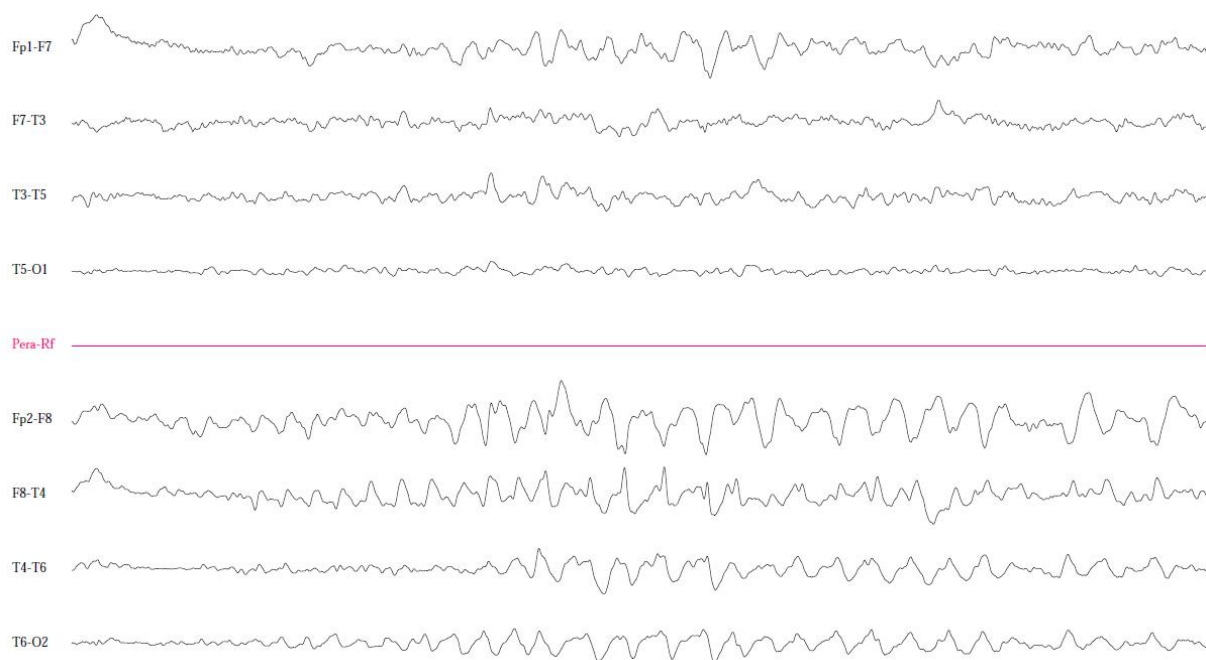


Figura 8 – EEG do **paciente 8**, montagem longitudinal temporal, mostrando atividade theta rítmica temporal direita.

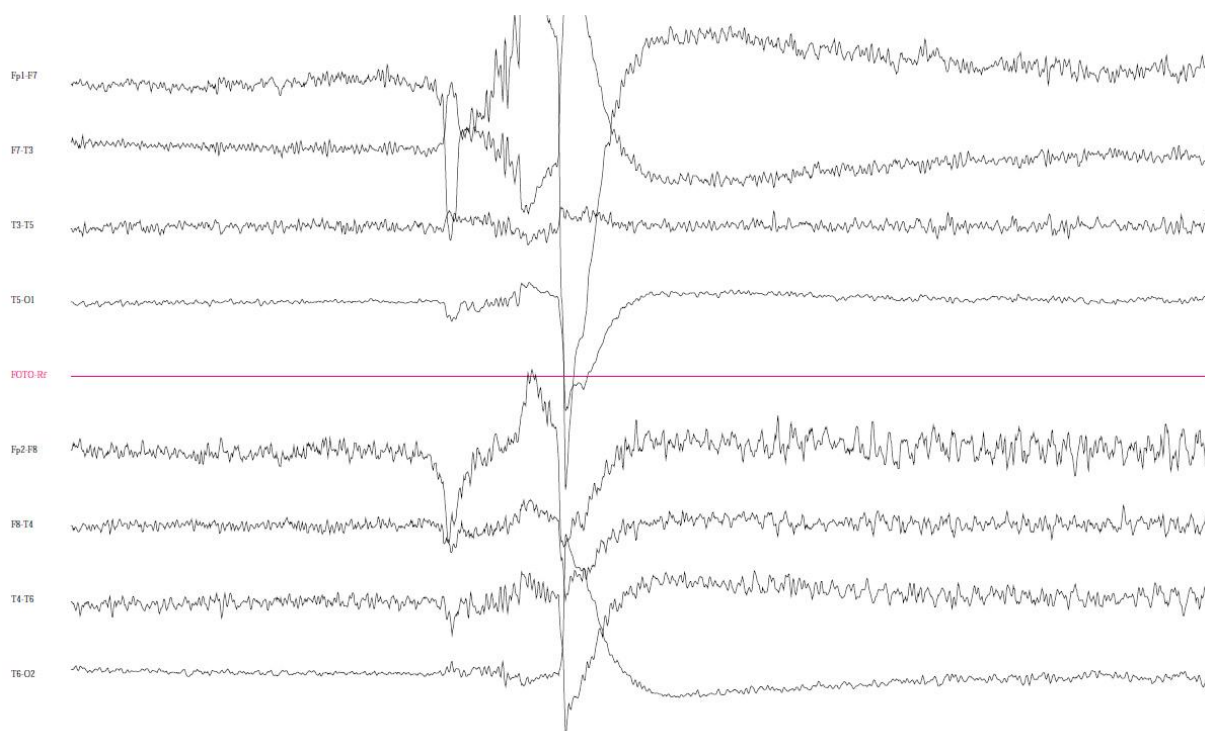


Figura 9 – EEG do **paciente 9**, montagem longitudinal temporal.,mostrando atividade de pontas sobrepostas à atividade theta rítmica máxima na região temporal anterior e média direita.

4.5 Análise do EEG durante o seguimento

Tanto a média de tempo em ritmo theta como a quantidade de pontas apresentaram diminuição no decorrer do seguimento. Essa diminuição foi estatisticamente significativa entre o pré-procedimento e 3º mês e entre pré-procedimento e 6º mês.(tabela 6).

Tabela 6 – Densidade de Ritmo Theta e de Pontas

	Pré-Procedimento	3º mês	6º mês
Densidade de Ritmo Theta (média de segundos)	13,3	0,44*	2,67**
Densidade de Pontas (média)	26,1	1,11'	“2,67”

*p=0,001, **p=0,024, 'p=0,002, “p=0,003, teste t de Student

4.6 Avaliação por neuroimagem do hipocampo

A análise visual das imagens por ressonância magnética não mostraram outras alterações (tanto morfológicas como em intensidade de sinal) senão a redução volumétrica hipocampal e hipersinal hipocampal em T2.

As imagens na seqüência STIR utilizadas para a volumetria hipocampal (pré e pós procedimento) são demonstradas a seguir (utilizamos como base os valores de referência de $2,83 \pm 0,28 \text{ cm}^3$ para o hipocampo direito e $2,89 \pm 0,33 \text{ cm}^3$ para o hipocampo esquerdo).

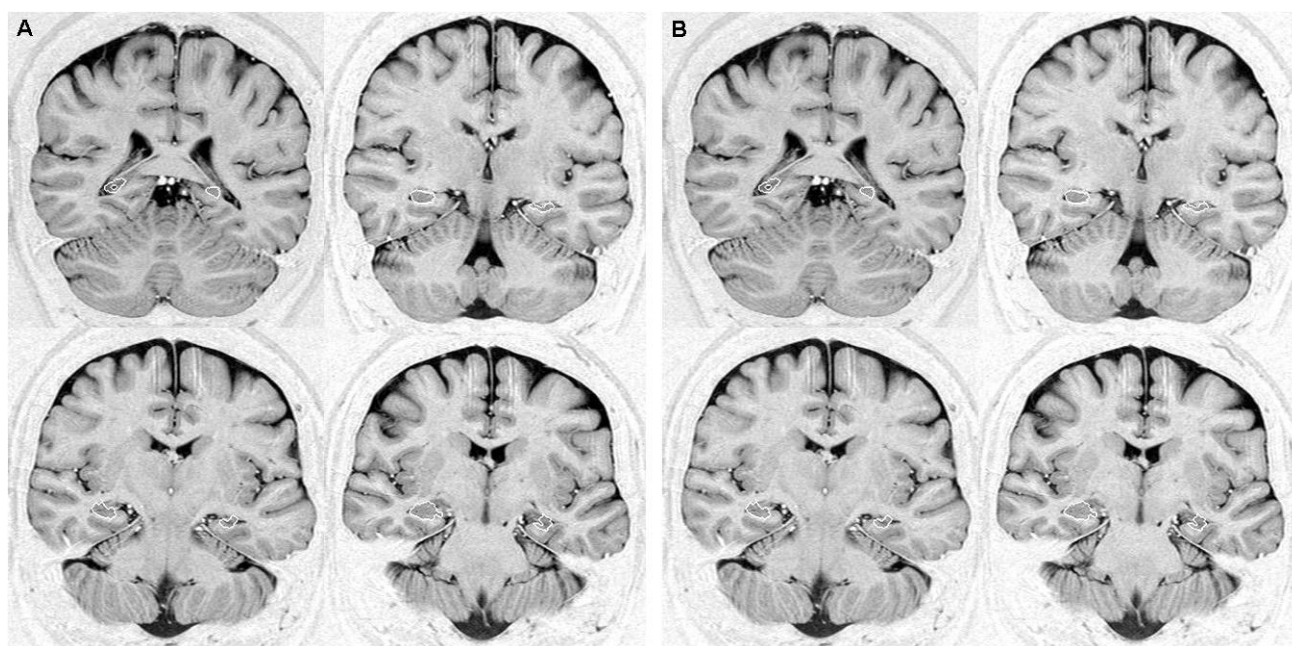


Figura 10 - Valores de volumetria hipocampal do Paciente 1

A) Pré-transplante (Volumes do Hipocampo: Direito = $2,06 \text{ cm}^3$; Esquerdo = $1,15 \text{ cm}^3$)

B) Pós-transplante (Volumes do Hipocampo: Direito = $1,68 \text{ cm}^3$; Esquerdo = $1,01 \text{ cm}^3$)

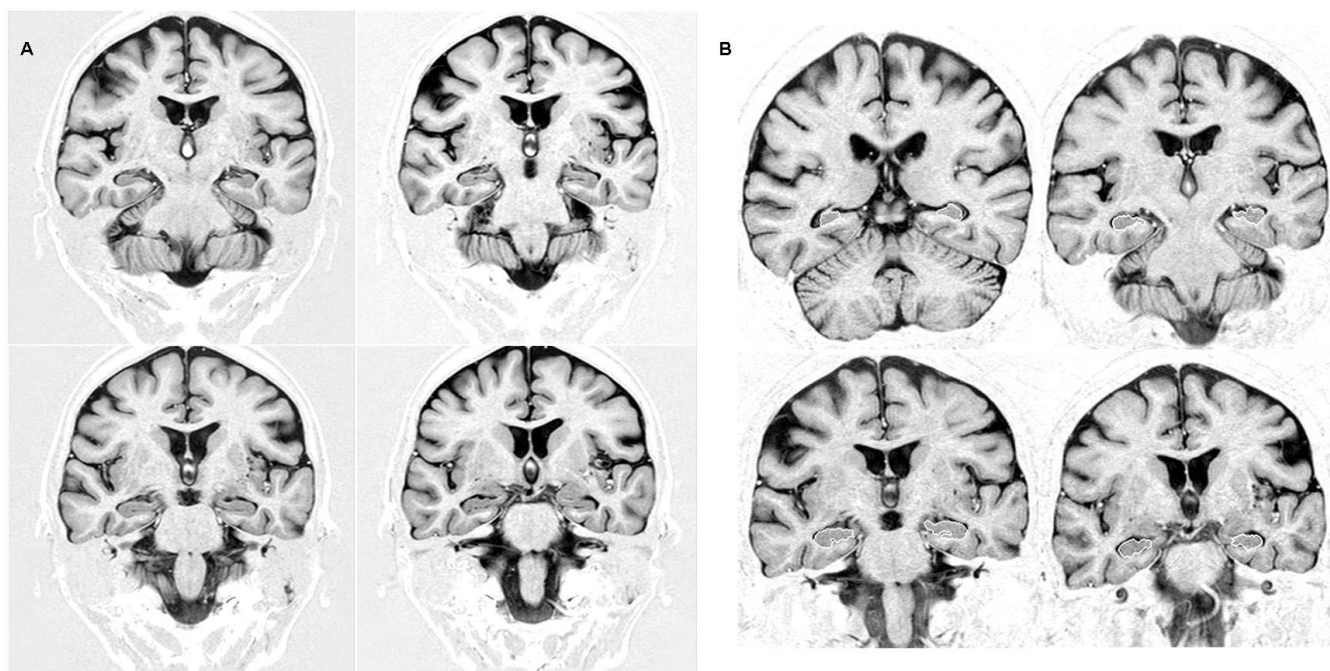


Figura 11 - Valores de volumetria hipocampal do Paciente 2

A) Pré-transplante (Volumes do Hipocampo: Direito = 2,69 cm³; Esquerdo = 2,46 cm³)

B) Pós-transplante (Volumes do Hipocampo: Direito = 2,23 cm³; Esquerdo = 2,44 cm³)

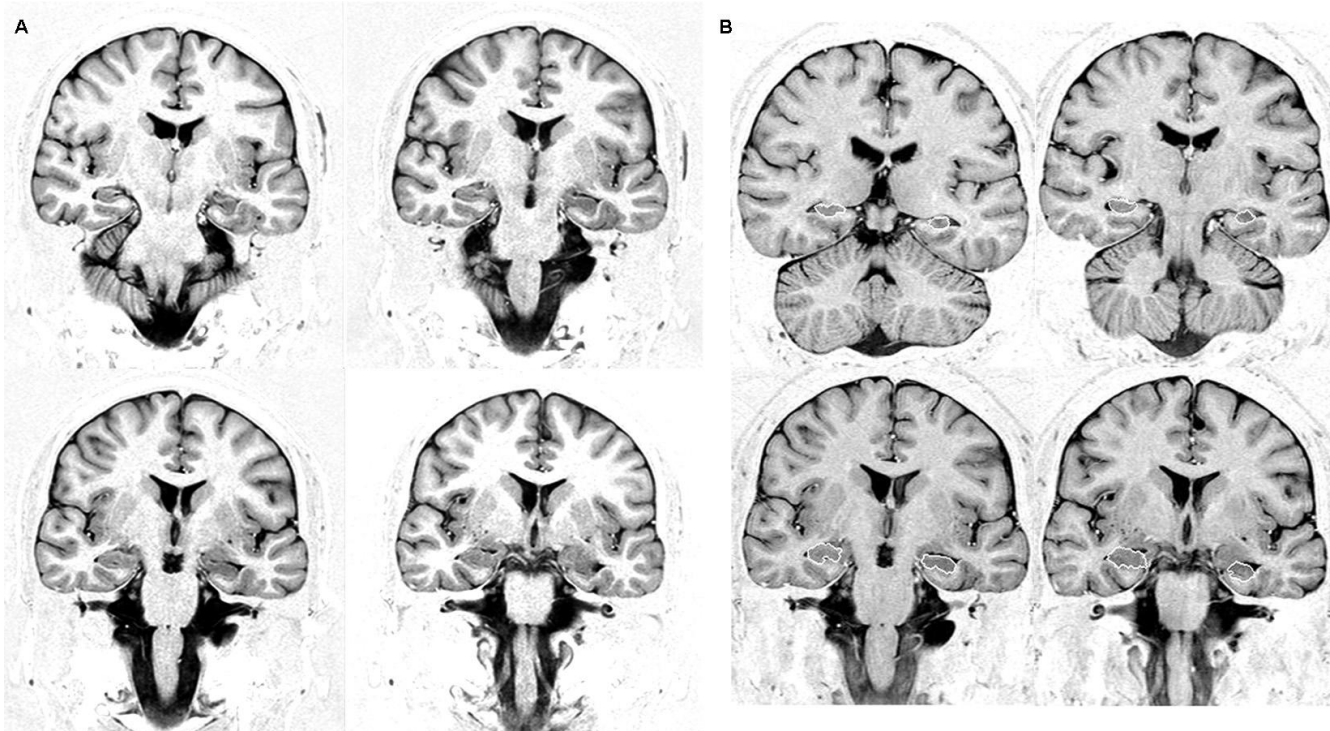


Figura 12 - Valores de volumetria hipocampal do Paciente 3

A) Pré-transplante (Volumes do Hipocampo: Direito = 2,71 cm³; Esquerdo = 2,56 cm³)

B) Pós-transplante (Volumes do Hipocampo: Direito = 2,92 cm³; Esquerdo = 2,26 cm³)

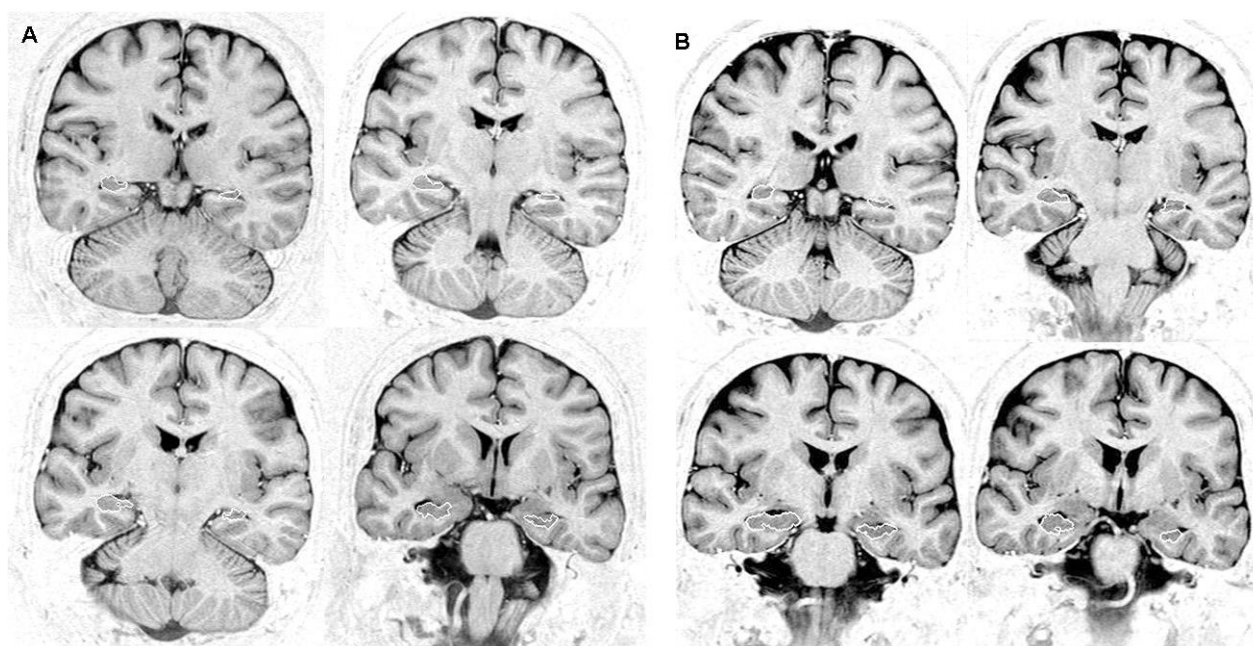


Figura 13 - Valores de volumetria hipocampal do Paciente 4

A) Pré-transplante (Volumes do Hipocampo: Direito = 3,17 cm³; Esquerdo = 1,86 cm³)

B) Pós-transplante (Volumes do Hipocampo: Direito = 3,08 cm³; Esquerdo = 1,73 cm³)

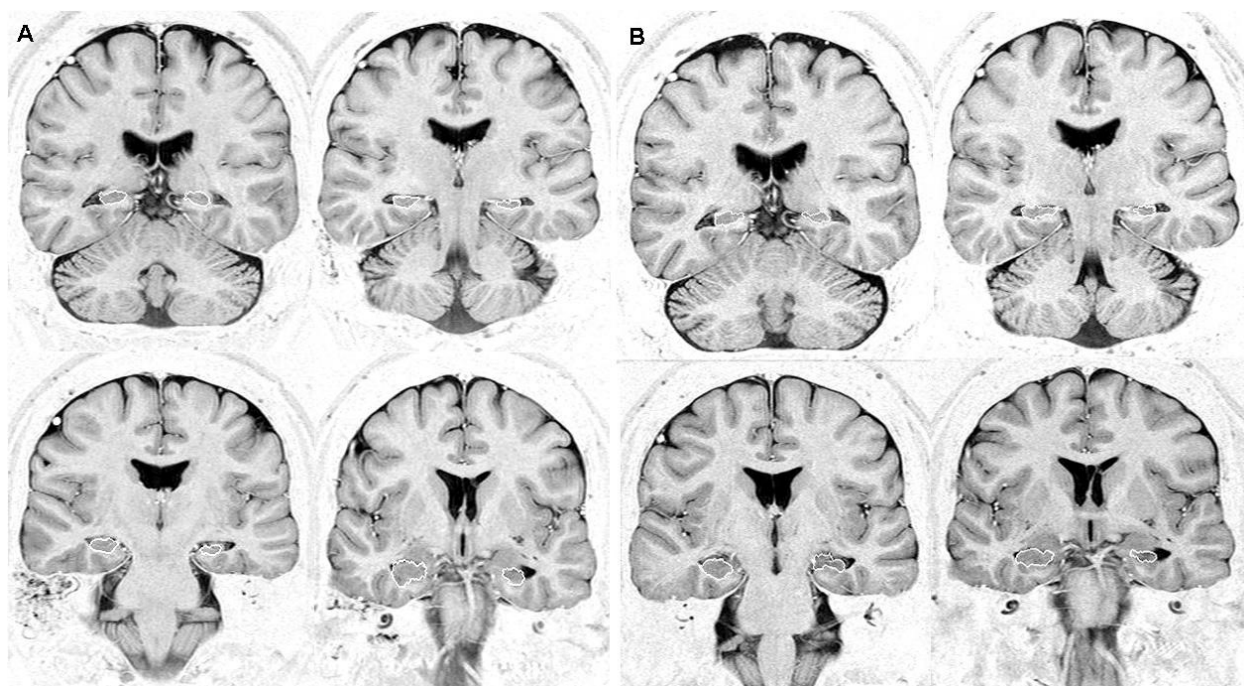


Figura 14 - Valores de volumetria hipocampal do Paciente 5

A) Pré-transplante (Volumes do Hipocampo: Direito = 3,11 cm³; Esquerdo = 2,01 cm³)

B) Pós-transplante (Volumes do Hipocampo: Direito = 2,87 cm³; Esquerdo = 1,85 cm³)

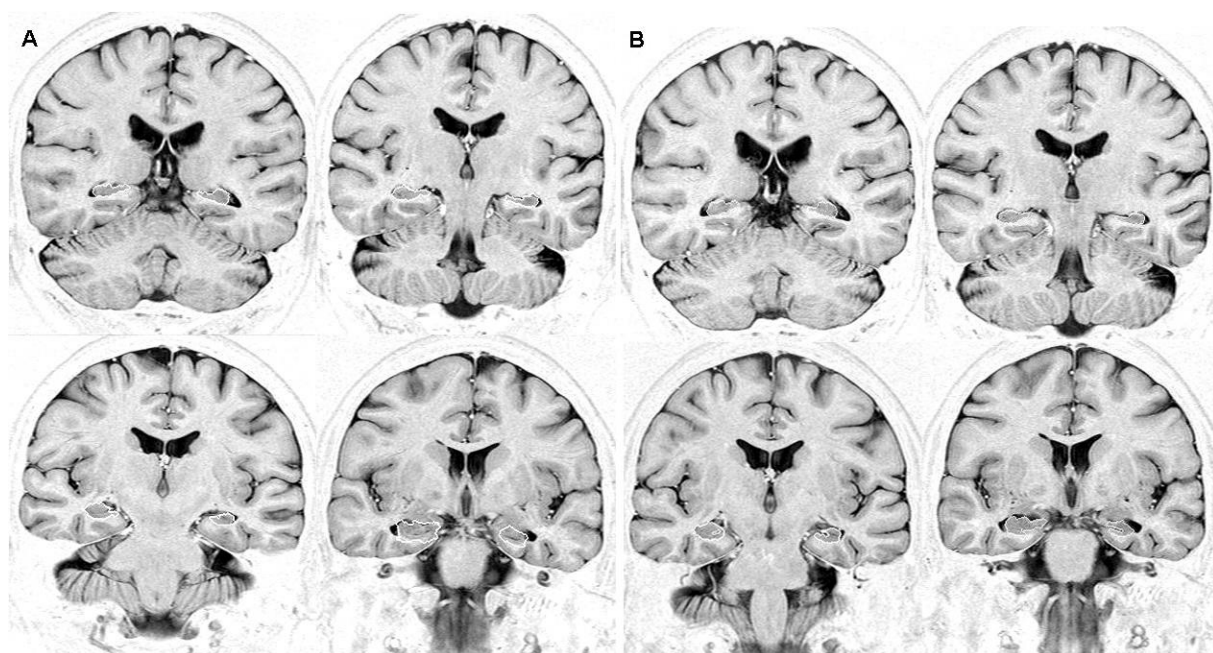


Figura 15 - Valores de volumetria hipocampal do Paciente 6

A) Pré-transplante (Volumes do Hipocampo: Direito = 3,49 cm³; Esquerdo = 2,42 cm³)

B) Pós-transplante (Volumes do Hipocampo: Direito = 3,26 cm³; Esquerdo = 2,07 cm³)

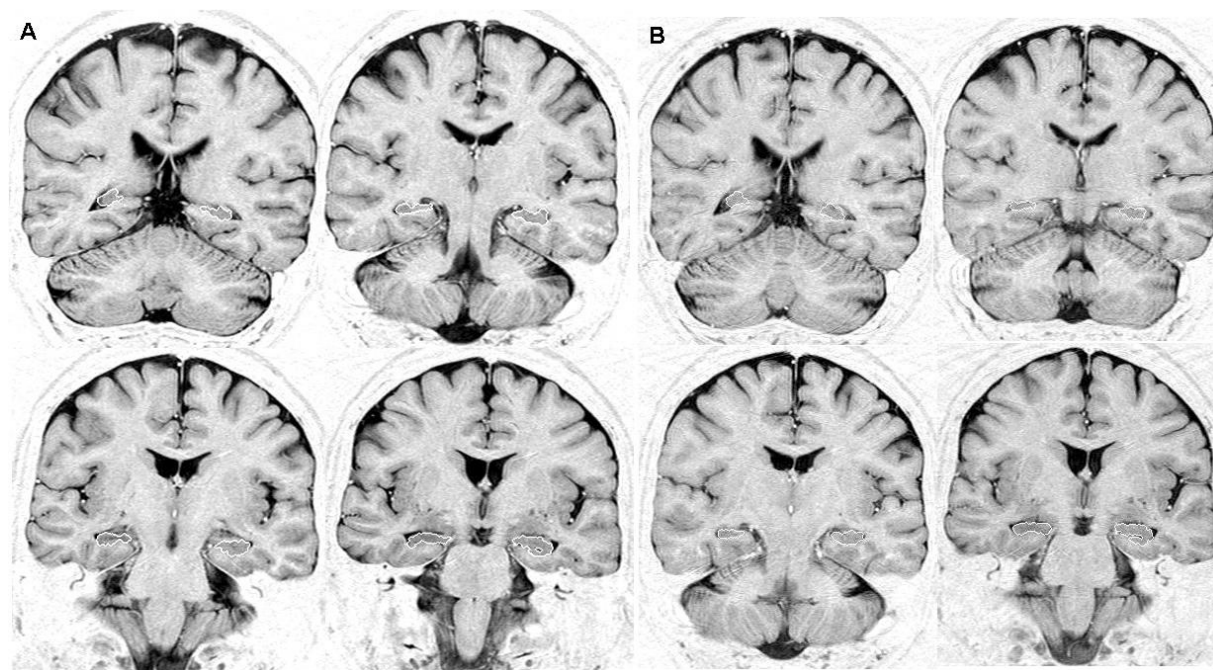


Figura 15 - Valores de volumetria hipocampal do Paciente 7

A) Pré-transplante (Volumes do Hipocampo: Direito = 1,76 cm³; Esquerdo = 2,32 cm³)

B) Pós-transplante (Volumes do Hipocampo: Direito = 1,55 cm³; Esquerdo = 2,21 cm³)

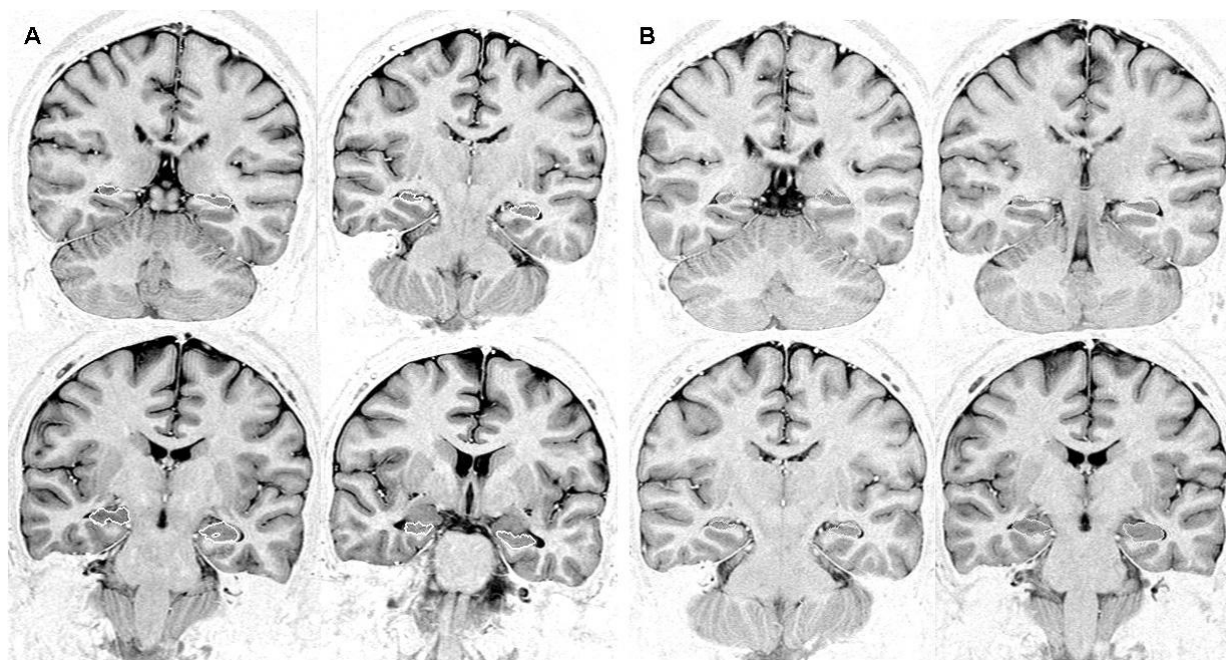


Figura 16 - Valores de volumetria hipocampal do Paciente 8

A) Pré-transplante (Volumes do Hipocampo: Direito = 2,19 cm³; Esquerdo = 2,79 cm³)

B) Pós-transplante (Volumes do Hipocampo: Direito = 2,29 cm³; Esquerdo = 2,88 cm³)

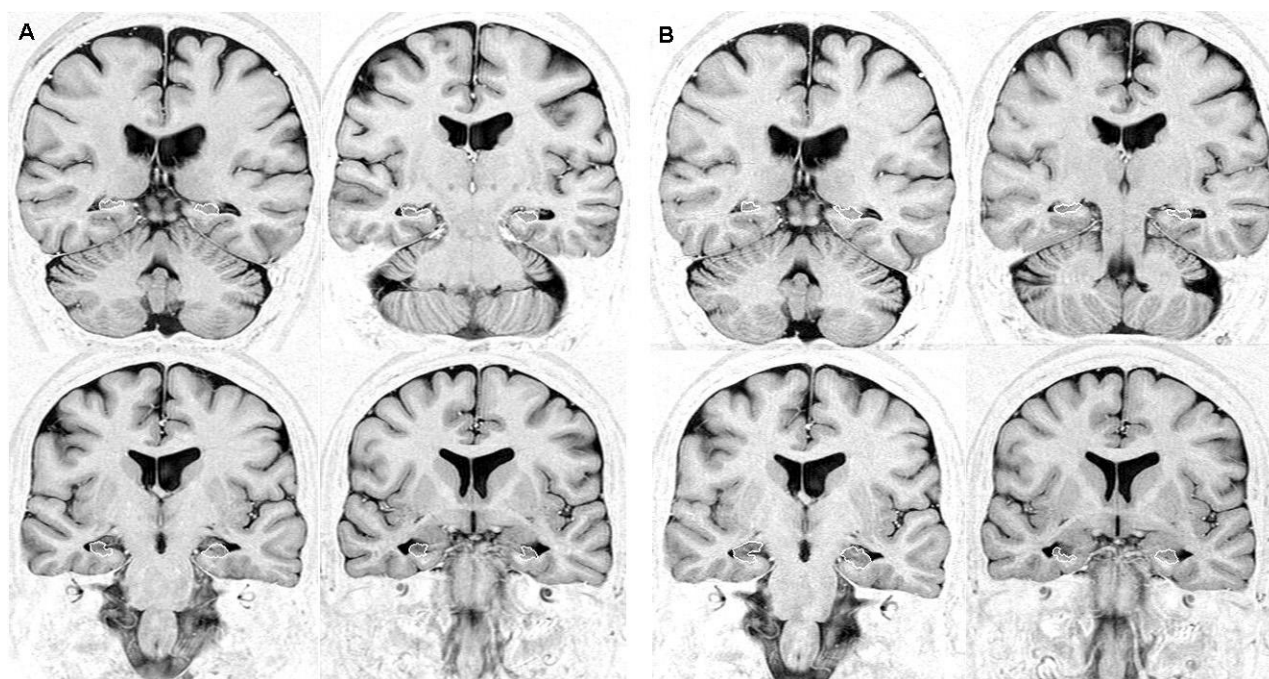


Figura 17 - Valores de volumetria hipocampal do Paciente 9

A) Pré-transplante (Volumes do Hipocampo: Direito = 1,35 cm³; Esquerdo = 1,52 cm³)

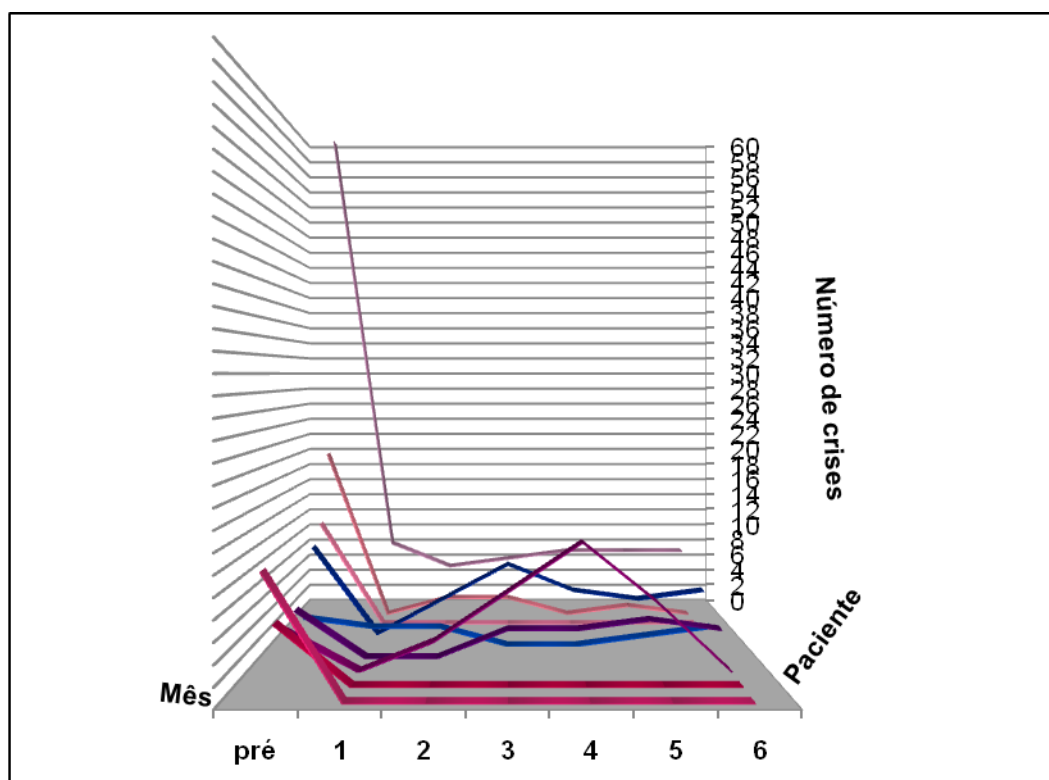
B) Pós-transplante (Volumes do Hipocampo: Direito = 1,63 cm³; Esquerdo = 1,79 cm³)

A comparação das volumetrias hipocampais pré-procedimento e após seis meses de procedimento não mostrou alteração significativa tanto nos hipocampus que foram infundidos com células tronco ($p=0,25$) como os hipocampus contralaterais ($p=0,18$).

4.7 Análise das crises convulsivas durante o seguimento

Os pacientes apresentavam em média $14,67 \pm 5,9$ crises no período pré-procedimento e $2,25 \pm 0,83$ no período de seguimento até 6º mês, ($p=0,55$). Os pacientes 1,2, 6,7,8 e 9 foram os que apresentaram modificação na frequência e padrão de crises. Aqueles que ainda apresentavam algumas crises no final do seguimento referiram espontaneamente que tinham uma percepção quanto à incapacidade e intensidade das crises mais leve e que sentiam-se melhor após as crises do que previamente ao procedimento. O comportamento individualizado mês a mês de cada paciente pode ser observado no gráfico 1.

Gráfico 1- Evolução mensal de crises convulsivas



Analisando o percentual de redução de crises observamos em média 67%, variando de 0 a 100%. (Tabela 6) No seguimento de 6 meses 7 paciente foram incluídos na classe I, 3 pacientes ficaram completamente livres de crises desde o procedimento (classe IA, pacientes 1,2 e 7), 4 pacientes foram incluídos na classe IB (pacientes 5,6, 8 e 9).

Tabela 6 – Percentual de redução de crises epiléticas em cada paciente

Paciente	Nº de Crises Mensais no Pré-procedimento	Nº de Crises com 3 meses (percentual de redução)	Nº de Crises com 6 meses (percentual de redução)	Classificação de Engel
1	12	0 (100%)	0 (100%)	IA
2	6	0 (100%)	0 (100%)	IA
3	4	8 (0)	0 (0)	*
4	5	3(40%)	3 (40%)	II
5	3	0 (100%)	2 (33%)	IB
6	10	8 (20%)	5 (50%)	IB
7	12	0 (100%)	0 (100%)	IA
8	20	2 (90%)**	0 (100%)	IB
9	60	6 (90%)**	10 (80%)	IB

*não classificado em função do padrão variável de frecuencia de crises

5 Discussão

Desde a demonstração da capacidade das células da medula óssea diferenciarem-se em células neurais (Mezey et al. 2000) e gliais (Mezey et al. 2000; Sanchez-Ramos et al. 2000; Woodbury et al. 2000; Bossolasco et al. 2005) *in vitro* e *in vivo* (Akiyama et al. 2002; Mahmood et al. 2004), as pesquisas subseqüentes na última década levaram ao desenvolvimento de terapias autólogas em humanos tendo a medula como fonte de células tronco (Mimeault e Batra 2006). Este é o primeiro estudo, que temos conhecimento, a avaliar o transplante autólogo de células tronco mononucleares de medula óssea em pacientes com epilepsia refratária ao tratamento medicamentoso.

O nosso objetivo principal que era o de demonstrar a factibilidade do método em um grupo de pacientes bem selecionados foi alcançado com segurança. De fato, como observamos anteriormente, nenhuma intercorrência grave ocorreu durante o procedimento e tempo de seguimento.

A arteriografia seletiva de artéria cerebral posterior mostrou-se uma via de acesso adequada à área desejada para o implante células. O procedimento transcorreu com tranqüilidade e segurança em todos os pacientes; nenhum paciente apresentou alterações no traçado de base do EEG (durante o cateterismo e nas 24 horas subseqüentes), também não registraram crises convulsivas nesse período. Possíveis efeitos adversos associados ao cateterismo, sem relação com as CTMMO em si, tais como hematoma ou dor no local de punção, acidente isquêmico transitório, não foram observados. Alguns pacientes queixaram-se de cefaléia após nas horas seguintes ao procedimento. Este é um evento que pode ocorrer e não costuma ser grave. Todos os pacientes apresentavam exame neurológico normal após a arteriografia. Esses dados são semelhantes aos de outros grupos que também utilizaram arteriografia como via de infusão de CTMMO (Brazzini et al. ; Araújo 2008) Por ser um procedimento pouco invasivo, sem intercorrências significativas como já visto, também propicia a brevidade da internação hospitalar e retorno do paciente à suas atividades diárias. Sem dúvida devemos considerar como fator contribuinte para o bom resultado, a habilidade técnica do neuroradiologista. Certamente a experiência com esse procedimento (Araújo 2008) também contribui para melhores resultados no quesito segurança.

“Primum non nocere”, ou “antes não prejudicar”, regra máxima da medicina, certamente foi o que norteou o protocolo. A escolha da fonte de células tronco - a medula óssea, em detrimento das células tronco embrionárias evita duas grandes controvérsias: a questão ética envolvendo o uso das células derivadas de embrião e o potencial tumorigênico das mesmas (Gruen and Grabel 2006). Sendo o transplante autólogo, também não há risco de rejeição do mesmo.

O manejo das CTMO, realizado da forma mais natural, as quais foram somente quantificadas através de citometria de fluxo, não sendo submetidas a qualquer outro método de estimulação ou diferenciação, permitiu uma observação clínica que reflete os efeitos da plasticidade normal dessas células no ambiente alvo. A aplicação via arteriografia seletiva da artéria cerebral posterior assegura a maior concentração possível de CTMMO no local alvo. As células tronco mesenquimais circulam fisiologicamente na circulação periférica (Mezey et al. 2003), uma injeção sistêmica levaria a uma significativa perda de concentração celular na região hipocampal. Por outro lado, o fato das CTMO não permanecerem viáveis por mais de uma hora, diminui a possibilidade de efeitos adversos decorrentes do implante de células em outros locais.

Um tipo celular predominante dentre os subgrupos CD 45/CD 105 e CD 34/CD117 nas amostras infundidas não foi possível identificar através da fenotipagem. Tal distinção possibilitaria estabelecer relação de causa e efeito e dessa forma, esclarecer melhor o mecanismo de ação das células.

No que se refere às crises epiléticas, foram observadas não somente a diminuição na frequência de crises, mas também na percepção de intensidade das mesmas (referida pelos pacientes). Dos 9 pacientes, 6 apresentaram diminuição na frequência de crises epiléticas no período referido; 3 pacientes não mostraram modificação nesse quesito. A análise da média de crises (de todos os pacientes) pós-procedimento em relação à pré-procedimento mostrou que realmente a tendência é o decréscimo de crises. A diminuição de crises epiléticas em estudos experimentais já foi demonstrada por outros autores (Costa-Ferro et al. ; Chu et al. 2004) Vale ressaltar que nos pacientes em que houve diminuição na frequência de crises, houve também uma atenuação na intensidade das mesmas. Os pacientes e/ou seus acompanhantes referiram menor tempo de duração dos eventos; menor duração do período pós-ictal e menor intensidade de manifestações motoras. Não há outro estudo semelhante na literatura, porém no estudo experimental Costa Ferro (Costa-Ferro et al 2010) já foi observado comportamento semelhante quando comparado um grupo controle

É interessante observar também a distribuição de crises segundo a classificação de Engel pós-operatória (Engel 1993). Essa é uma classificação comumente utilizada em pacientes submetidos à cirurgia de epilepsia. Não é o caso aqui, porém é uma classificação que julgamos apropriada aplicar já que trata-se de um procedimento, ainda que minimamente invasivo. Observamos que 77% permaneceram livres de crises incapacitantes desde o procedimento (Engel Classe I). Em casos cirúrgicos com critérios de seleção semelhantes aos aqui expostos é possível obter 89% de pacientes na classe IA no primeiro ano de seguimento (Paglioli et al 2004). É uma comparação pertinente ainda que entre dois métodos em estágios diferentes de desenvolvimento. A cirurgia de epilepsia é o padrão ouro de tratamento para pacientes com ELT com atrofia hipocampal unilateral refratária ao tratamento farmacológico. É um método tecnicamente já bastante desenvolvido e avançado. O transplante de CTMMO nesses casos está sendo realizado pela primeira vez. Certamente questões referentes à técnica, ao volume celular injetado, tipo celular e número de procedimentos necessários para atingir resultados ainda melhores deverão ser respondidas nos próximos anos.

Esse é um procedimento de impacto na vida de cada paciente, apesar de pouco invasivo. Para os selecionados representou uma grande oportunidade de mudança significativa na rotina dos mesmos, já que a expectativa era a de haver diminuição de crises epiléticas. Sabe-se que procedimentos de grande impacto podem exercer um efeito placebo por si só (Tjomsland et al. 2001); no caso em discussão, o benefício verificado poderia ser decorrente desse efeito, e não da terapêutica. Alguns aspectos observados nesse estudo falam contra esse fator. A distribuição do perfil de resposta ao tratamento instituído, na qual todos os pacientes que apresentaram resposta favorável ao tratamento mantiveram esse padrão ao longo de todo o seguimento; naqueles em que não houve modificação tão expressiva de frequência, o padrão permaneceu equilibrado durante o acompanhamento. No caso de efeito placebo poderíamos ter observado alguma queda inicial na frequência com posterior incremento. Possivelmente com o desenvolvimento de estudos fase II e III observaremos melhor o padrão já verificado.

A análise eletroencefalográfica nas avaliações de controle trimestral e semestral em comparação ao EEG pré-procedimento mostrou-se bastante favorável. Foi calculada a densidade pontas e de ritmo theta. A avaliação geral mostrou diminuição de ambas que representa uma melhora funcional significativa, sem haver incremento de atividade epileptogênica mesmo nos pacientes em que não ocorreu melhora clínica,

Certamente o não surgimento de anormalidade no exame neurológico e alterações morfológicas indesejadas (visualizadas à RM) comprova a segurança do método. Contudo, era de fato esperada alguma modificação (incremento) na volumetria hipocampal, pelo menos nos pacientes em que foi observada melhora clínica (em alguns pacientes observou-se redução do número absoluto do volume hipocampal, o que atribuímos à variação da técnica de mensuração já que nenhuma modificação estatisticamente significativa foi verificada). É possível que o tempo de observação não tenha sido suficiente para que detectássemos modificações no volume hipocampal, também é possível que realização de um novo exame de RM mais adiante possa demonstrar potencial recuperação hipocampal pós-transplante. No entanto, outra constatação interessante chama a atenção nesse grupo de pacientes: a melhora funcional (clínica e eletroencefalográfica) não diretamente relacionada à melhora imaginológica

Essa dissociação clínico-radiológica evoca algumas questões referentes ao mecanismo de ação das CTMMO à sua plasticidade e a do microambiente alvo: quem é o responsável pelo efeito observado? O que é mais importante: a morfológica ou o a fisiologia?

Sugere-se que as células mononucleares da medula óssea têm efeito neuroprotetor. Estudos prévios sugeriram que as células da medula óssea induzem modificações no tecido danificado através de diferentes mecanismos, como a produção de fatores neurotróficos (Eaton and Whitemore 1996), através da estimulação de proliferação endógena, ou através de interação de células-tronco, exógenas e endógenas, idealizadas para propiciar neuroproteção por suporte trófico(Nomura et al. 2005).

A epileptogênese é um processo dinâmico com repercussão clínica que, além das crises convulsivas inclui deterioração cognitiva (Engel 2002). O uso da tecnologia com CTMMO nesse contexto é mais um fator em estudo. Nessa conjuntura torna-se imprescindível a translação clínico-experimental, uma vez que no âmbito experimental o momento atual é de responder questões referentes a mecanismos ainda desconhecidos sobre uma terapêutica que se mostrou segura e com potencial efeito na redução das crises..

Ademais, foi possível avançar em conhecimento a respeito de uma terapêutica inovadora: demonstrou-se também melhora neurofisiológica. Algumas questões, no entanto permanecem em haver e podem ser respondidas com a realização de estudos subseqüentes. A inclusão de mais pacientes no estudo permitiria a determinação de um perfil de pacientes com melhor resposta ao tratamento, através de análise de subgrupos. Maior tempo de seguimento certamente permite observar melhor a resposta terapêutica a longo prazo e a resolução da questão referente

à permanência ou não da dissociação clínico-radiológica.

CONCLUSÕES

O presente estudo que avaliou a factibilidade e segurança do transplante de CTMMO em pacientes com ELT permitiu concluir que:

- 1- A obtenção e transplante de CTMMO por injeção seletiva na artéria cerebral posterior é factível.
- 2- Não foram encontradas anormalidade no exame neurológico, EEG e RM induzidas pelo procedimento.
- 3- Houve redução significativa na frequência das crises epiléticas.
- 4- Houve redução significativa da atividade epileptogênica quando avaliada pelo EEG interictal e não houve mudança no padrão de EEG durante a infusão
- 5- Não houve alteração significativa no volume hipocampal pós-transplante de CTMMO

PERSPECTIVAS

Nesse estudo apresentamos os resultados referentes aos critérios de segurança e factibilidade do método de transplante autólogo de células tronco mononucleares de medula óssea em pacientes com ELT e atrofia hipocampal , o qual deverá ser complementado em investigação de nível II e III, ampliando o estudo a outros 11 pacientes e avaliando também os dados de investigação neuropsicológica.

REFERÊNCIAS

- Akiyama, Y. et al.. Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow stromal cells. *J Neurosci* 2002, 22(15): 6623-6630.
- Almeida AG, Nunes ML, Palmirini ALF, Da Costa J. Incidence of SUDEP in a cohort of patients with refractory epilepsy: the role of surgery and lesion localization. *Arq Neuropsiq* 2010 *in press*
- Alvarez-Dolado et al.. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 2003; 425(6961): 968-973.
- Araújo MD. Transplante Autólogo de Células Tronco de Medula Óssea em Pacientes com Acidente Vascular Cerebral Extenso. 2008Dissertação de Mestrado, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Orientador: Da Costa JC, Co-Orientador : Friedrich MAG.
- Azizi, S. A. et al. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(7): 3908-3913.
- Berkovic, et al.. Hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy demonstrated by magnetic resonance imaging. *Ann Neurol* 1991; 29(2): 175-82.
- Bjorklund, A. e O. Lindvall. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat Neurosci* 2000;3(6): 537-544.
- Bjornson, C. et al.. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 1999;283(5401): 534-537.
- Blumcke, I., et al.. Altered distribution of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptor subunit GluR2(4) and the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NMDAR1 in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *Acta Neuropathol* 1996;92(6): 576-587.

- Bonilla, S et al. Haematopoietic progenitor cells from adult bone marrow differentiate into cells that express oligodendroglial antigens in the neonatal mouse brain. *Eur J Neurosci* 2002;15(3): 575-582.
- Bossolasco, P. et al.. Neuro-glial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro. *Exp Neurol* 2005;193(2): 312-325.
- Brazelton, T. et al.. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000;290(5497): 1775-1779.
- Brazzini, A. et al. Intraarterial autologous implantation of adult stem cells for patients with Parkinson disease. *J Vasc Interv Radiol* 21(4): 443-451.
- Butovsky, O et al.. "Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells." *Mol Cell Neurosci* (2006)31(1): 149-160.
- Cendes, F. et al.. Atrophy of mesial structures in patients with temporal lobe epilepsy: cause or consequence of repeated seizures? *Ann Neurol* 1993; 34(6): 795-801
- Cendes F, Brodie M, Andermann F. The mesio-temporal lobe epilepsy syndrome. *Epileptic Syndrome in infancy, childhood and adolescence*. M. B. J Roger, C Dravet, P Genton, CA Tassinari e P Wolf. Montrouge, 2005; John Libbey Eurotext.
- Chen, J., et al.. Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *J Neurol Sci* 2001;189(1-2): 49-57.
- Chu, K. et al.. Human neural stem cell transplantation reduces spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus in adult rats. *Brain Res* 2004;1023(2): 213-221.
- Cogle, C. et al. Adult human hematopoietic cells provide functional hemangioblast activity. *Blood* 2004;.103(1): 133-135.
- Corti S, et al . .Somatic stem cell research for neural repair: current evidence and emerging perspectives..*J Cell Mol Med*. 2004;8(3): 329-337.
- Corti, S. et al. Somatic stem cell research for neural repair: current evidence and emerging perspectives." *J Cell Mol Med* 2004;8(3): 329-337.

- Costa-Ferro, Z. et al. Prevention of seizures and reorganization of hippocampal functions by transplantation of bone marrow cells in the acute phase of experimental epilepsy. *Seizure* 2010;19(2): 84-92.
- Costa, Z. et al . GFP+ mice stem cells reduces the number of recurrent seizures, migrate and prevent neuronal loss in rats with chronic epilepsy induced by lithium-pilocarpine model. 2006; ISSCR Annual Meeting, Toronto, Canada.
- De Paola, et al . Criterios Minimos para a realizacao do tratamento Cirurgico de Epilepsia. Indicaçao para admissao de pacientes em protocolos de investigaçao para o tratamento cirurgico das epilepsias. *Brazilian J Epilepsy Clin Neurophysol* 2001;76-79.
- Dezawa, M. et al.. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest* 2004;113(12): 1701-1710.
- Eaton, M. e S. R. Whittemore. Autocrine BDNF secretion enhances the survival and serotonergic differentiation of raphe neuronal precursor cells grafted into the adult rat CNS. *Exp Neurol* 1996;140(2): 105-114.
- Eglitis, M. A., et al.. Targeting of marrow-derived astrocytes to the ischemic brain. *Neuroreport* 1999;10(6): 1289-1292.
- Engel J, V. N. P., Rasmussen TB, Ojenemann LM. Outcome with respect to epileptic seizures.:*Surgical Treatment of the Epilepsies*. E. J. 1993
- Engel, J., Jr.. So what can we conclude--do seizures damage the brain? *Prog Brain Res* 2002; 135: 509-512.
- Falconer, M. A.. Mesial temporal (Ammon's horn) sclerosis as a common cause of epilepsy. Aetiology, treatment, and prevention. *Lancet* 1974;2(7883): 767-70.
- Fuchs, E. e J. A. Segre. Stem cells: a new lease on life. *Cell* 2000;100(1): 143-155.
- Gastaut, H.. Letter: 'Epileptic seizures'. *Dev Med Child Neurol* 1973; 15(5): 688-689.
- Goh, E. L., et al.. Adult neural stem cells and repair of the adult central nervous system. *J Hematother Stem Cell Res* 2003;12(6): 671-679.

- Gross, C. G.. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat Rev Neurosci* 2000;1(1): 67-73.
- Gruen, L. e L. Grabel 2006). "Concise review: scientific and ethical roadblocks to human embryonic stem cell therapy." *Stem Cells* 24(10): 2162-2169.
- Hellsten, J., et al.. Electroconvulsive seizures induce angiogenesis in adult rat hippocampus. *Biol Psychiatry* 2005; 58(11): 871-878.
- Helmstaedter, C. e M. Kurthen. Memory and epilepsy: characteristics, course, and influence of drugs and surgery. *Curr Opin Neurol* 2001;14(2): 211-216.
- Helmstaedter, C., et al.. Chronic epilepsy and cognition: a longitudinal study in temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 2003;54(4): 425-432.
- Hoefel Filho, A. P., Jaderson Costa da Costa ;2009. Indicadores de Prognóstico Cirúrgico pela Ressonância Magnética do Encéfalo em Pacientes Portadores de Epilepsia do Lobo Temporal com Esclerose Hipocampal Submetido a Amigdalohipocampectomia. PortoAlegre, Pontifícia Univesidade Católica do Rio Grande do Sul. H693i.
- Jackson, G. D.. The diagnosis of hippocampal sclerosis: other techniques. *Magn Reson Imaging* 1995; 13(8): 1081-93.
- Jin, H. K. et al. Intracerebral transplantation of mesenchymal stem cells into acid sphingomyelinase-deficient mice delays the onset of neurological abnormalities and extends their life span. *J Clin Invest* 2002;109(9): 1183-1191.
- Kennedy, D. W. e J. L. Abkowitz. "Kinetics of central nervous system microglial and macrophage engraftment: analysis using a transgenic bone marrow transplantation model." *Blood* 1997; 90(3): 986-993.
- Kokaia, M. et al.. Seizure development and noradrenaline release in kindling epilepsy after noradrenergic reinnervation of the subcortically deafferented hippocampus by superior cervical ganglion or fetal locus coeruleus grafts. *Exp Neurol* 1994;130(2): 351-361.
- Kopen, G. et al. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(19): 10711-10716.

- Korbling, M. e Z. Estrov. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med* 2003; 349(6): 570-582.
- Kotagal, P. et al. . Dystonic posturing in complex partial seizures of temporal lobe onset: a new lateralizing sign. *Neurology* 1989; 39(2 Pt 1): 196-201.
- Krause, D. et al.. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001; 105(3): 369-377.
- Kuzniecky, R. et al.. Magnetic resonance imaging in temporal lobe epilepsy: pathological correlations. *Ann Neurol* 1987;22(3): 341-7.
- Lee, J.,et al. Migration and differentiation of nuclear fluorescence-labeled bone marrow stromal cells after transplantation into cerebral infarct and spinal cord injury in mice. *Neuropathology* 2003;23(3): 169-180.
- Li, Y. et al.. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology* 2002; 59(4): 514-523.
- Li, Y et al.. Adult bone marrow transplantation after stroke in adult rats. *Cell Transplant* 2001;10(1): 31-40.
- Loddenkemper, H. L. History of epilepsy and seizure classification. *Textbook of epilepsy surgery*. HOLüders, Informa Healthcare 2008; 160-173
- Loscher, W. et al.. Seizure suppression in kindling epilepsy by grafts of fetal GABAergic neurons in rat substantia nigra. *J Neurosci Res* 1998; 51(2): 196-209.
- Loscher, W et al.. Cell and gene therapies in epilepsy--promising avenues or blind alleys? *Trends Neurosci* 2008; 31(2): 62-73.
- Lu, D. et al. 1. Adult bone marrow stromal cells administered intravenously to rats after traumatic brain injury migrate into brain and improve neurological outcome. *Neuroreport* 2001; 2(3): 559-563.

- Lüders Mesial Temporal Sclerosis. Textbook of epilepsy surgery. Lüders. Informa Healthcare 2008.: 249-251.
- Madsen, T. M. et al.. Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy. *Biol Psychiatry* 2000; 47(12): 1043-1049.
- Mahmood, A. et al.. Marrow stromal cell transplantation after traumatic brain injury promotes cellular proliferation within the brain. *Neurosurgery* 2004; 55(5): 1185-1193.
- McNamara, J. O.. Cellular and molecular basis of epilepsy. *J Neurosci* 1994;14(6): 3413-3425.
- Mezey, E.. Bone marrow and brain: unexpected allies or accidental acquaintances?" *Stem Cell Rev* 2005;1(1): 15-19.
- Mezey, E et al.. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000; 290(5497): 1779-1782.
- Mezey, E. et al.. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(3): 1364-1369.
- Mimeault, M. e S. K. Batra. Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. *Stem Cells* 2006;24(11): 2319-2345.
- Ming, G. L. e H. Song. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Ann Rev Neurosci* 2005; 28: 223-250.
- Morimoto, K. et al.. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog Neurobiol* 2004; 73(1): 1-60.
- Morrison, S. J. et al.. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 1997; 88(3): 287-298.
- Nakano, H. et al.. CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2001; 194(8): 1171-1178.
- Nomura, T. et al.. I.V. infusion of brain-derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. *Neuroscience* 2005; 136(1): 161-169.

- Paglioli et al. Survival analysis of the surgical outcome of temporal lobe epilepsy due to hippocampal sclerosis. *Epilepsia* 2004; 45(11): 1383-1391.
- Paglioli, E. et al. Seizure and memory outcome following temporal lobe surgery: selective compared with nonselective approaches for hippocampal sclerosis. *J Neurosurg* 2006; 104(1): 70-78.
- Palmini, A., Da Costa, JC. Seleção de Candidatos à Cirurgia da Epilepsia: A Inseparável Parceria entre Conhecimento e Bom Senso. . Fundamentos neurobiológicos das Epilepsias: aspectos clínicos e cirúrgicos. J. Da Costa, Palmini, A., Yacubian, EMT, Cavalheiro, EA. . Sao Paulo 1998. 2: 833-856.
- Palmini, A., Da Costa, JC, Paglioli-Neto, E.. How to Select the Best Surgical Procedure for Patients with Temporal Lobe Epilepsy. . *Epilepsy Surgery*. H. Lüders, Comair, YG., 2001 Lippincott Williams & Wilkins: 675-684, .
- Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci*. 1997 May 15;17(10):3727-38
- Parent JM. Injury-induced neurogenesis in the adult mammalian brain. *Neuroscientist*. 2003 Aug;9(4):261-72. Review
- Perin, E. C., H. F. Dohmann, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 2003; 107(18): 2294-2302.
- Petersen, B. E. et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284(5417): 1168-1170.
- Priller, J. et al. Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. *J Cell Biol* 2001;155(5): 733-738.
- Rogawski, M. A. e R. J. Porter. Antiepileptic drugs: pharmacological mechanisms and clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds. *Pharmacol.Rev* 1990;. 42(3): 223.

- Sakurai, K. et al. Brain transplantation of genetically modified bone marrow stromal cells corrects CNS pathology and cognitive function in MPS VII mice. *Gene Ther* 2004;11(19): 1475-1481.
- Sanchez-Ramos, J. et al.. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 2000; 164(2): 247-256.
- Sander , H.. A Epidemiologia da Epilepsia. *Epilepsia: Um Guia Pratico*, 1999Merit- Publishing International.
- Semah, F. et al.. Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence? *Neurology* 1998;51(5): 1256-62.
- Shetty, A. K. e B. Hattiangady. Concise review: prospects of stem cell therapy for temporal lobe epilepsy. *Stem Cells* 2007; 25(10): 2396-2407.
- Shi, Q. et al.. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998;92(2): 362-367.
- Silani, V. e M. Corbo. Cell-replacement therapy with stem cells in neurodegenerative diseases. *Curr Neurovasc Res* 2004;1(3): 283-289.
- Terada, N. et al.. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002; 416(6880): 542-545.
- Tjomsland et al.. Placebo effect in research related to surgery and technical procedures." *Tidsskr Nor Laegeforen* 2001; 121(19): 2290-2293.
- Valerio, Y., Rosenmberg Anatomia Patológica em 33 Pacientes com Epilepsia do Lobo Temporal. *Brazilian Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*; 67-74.
- Venturini G ,2008. Efeito do Transplante de Células Mononucleares da medula óssea na frequência e crises e no desempenho cognitivo de ratos com Epilepsia induzida por Lítio Pilocarpina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

- Vilas-Boas, F. et al.. Early results of bone marrow cell transplantation to the myocardium of patients with heart failure due to Chagas disease. *Arq Bras Cardiol* 2006;87(2): 159-166.
- Walczak, T. S et al.. Incidence and risk factors in sudden unexpected death in epilepsy: a prospective cohort study. *Neurology* 2001; 56(4): 519-525.
- Watson, C., Cendes, F.. Estudos volumétricos por Ressonância Nuclear Magnética: Aplicações clínicas e Contribuições para a Compreensão da Epilepsia do Lobo Temporal. . Fundamentos neurobiológicos das Epilepsias: aspectos clínicos e cirúrgicos. . J. Da Costa, Palmira, A., Yacubian, EMT, Cavalheiro, EA. Sao Paulo 1998. 1: 609-630.
- Weimann, J. M. et al.. Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(4): 2088-2093.
- Woodbury, D. et al.. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000; 61(4): 364-370.
- Zhao, L. R. et al.. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol* 2002; 174(1): 11-20.

