

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEUROCIÊNCIAS

GABRIELE GOULART ZANIRATI

TERAPIA CELULAR EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE EPILEPSIA DO LOBO
TEMPORAL: CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA E CÉLULAS-
TRONCO NEURAIS

PORTO ALEGRE

2017

GABRIELE GOULART ZANIRATI

TERAPIA CELULAR EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE EPILEPSIA DO LOBO
TEMPORAL: CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA E CÉLULAS-
TRONCO NEURAIAS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

ORIENTADOR: PROF. DR. JADERSON COSTA DA COSTA

PORTO ALEGRE

2017

Ficha Catalográfica

Z31 t Zanirati, Gabriele Goulart

Terapia Celular em Modelos Experimentais de Epilepsia do Lobo Temporal : Células Mononucleares da Medula Óssea e Células-Tronco Neurais / Gabriele Goulart Zanirati . – 2017. 289 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa.

1. Epilepsia. 2. Terapia celular. 3. Modelos experimentais. 4. Células-tronco. I. da Costa, Jaderson Costa. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

*Aos meus queridos pais, por todo o
amor e apoio que sempre me dedicaram.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Jaderson Costa da Costa, pelo acolhimento no Laboratório de Neurociências, e por todo o apoio e confiança desde a minha iniciação científica. Foram através do seu exemplo, dedicação à pesquisa e valiosos ensinamentos que aprendi a fazer ciência e percebi a importância da pesquisa em minha vida. Muito obrigada por todas as oportunidades e incentivos, os quais foram fundamentais para o meu desenvolvimento profissional e pessoal ao longo destes anos.

Ao Dr. Ashok K. Shetty, pela confiança e acolhida em seu laboratório no Institute of Regenerative Medicine da Texas A&M University Health Science Center. Muito obrigada à toda a equipe do Shetty Lab, pesquisadores, alunos e técnicos, pela amizade e por toda a ajuda na realização deste trabalho durante o período em que estive com vocês. Foi um ano de muito aprendizado e desafios, e vocês o tornaram muito especial.

Ao Prof. Dr. Iván Izquierdo, e às professoras Dra. Cristiane Furini e Dra. Jociane Miskyw, e todas as alunas do Centro de Memória, obrigada por permitirem a realização de parte deste trabalho.

À Prof. Dra. Denise Cantarelli, aos técnicos e alunos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, obrigada pela parceria constante e ajuda no processo de separação das células, em especial à Rafaela Radomski e ao Ricardo Zalewski.

Aos meus queridos colegas e amigos do Laboratório de Neurociências e Sinalização Celular, obrigada a todos pela amizade e por proporcionarem um excelente ambiente de trabalho em todos estes anos. Simone Salamoni, obrigada pelo acolhimento e carinho sempre. Daniela Abreu e Ricardo Breda, obrigada pela disponibilidade em ajudar sempre que precisei. Pâmella Azevedo, obrigada pela amizade, e por todo o apoio e dedicação ao longo desta jornada que caminhamos juntas desde a graduação, tua amizade é essencial para mim. Daniel Marinowic, obrigada pela amizade, companheirismo diário, e pela incansável disposição em ajudar sempre. Alessandra Sebben, Caroline Calice e Gabriela Laguna, obrigada pela parceria e amizade. Zaquer Costa-Ferro e Daniele Vieira, obrigada pela companhia sempre agradável e pronto apoio que sempre apresentaram. Agradeço a todos os bolsistas de iniciação científica pela disposição, entusiasmo e ajudas diversas, em especial, ao Allan Alcará pela dedicação e risadas. Muito obrigada a todos pela contribuição direta ou indireta na realização deste trabalho, é um prazer conviver diariamente com todos vocês.

À Gianina Venturin e ao Samuel Greggio, obrigada pela amizade, apoio constante e pelas diversas consultorias científicas desde a minha iniciação científica. Muito obrigada pela

inspiração e por toda a ajuda na realização deste trabalho, principalmente com os exames de imagem no microPET do Centro de Pesquisa Pré-Clínica. A amizade e dedicação de vocês foram fundamentais ao longo destes anos. Agradeço também, a disponibilidade e importante colaboração da Paula Feltes na estatística e análise das imagens por SPM.

À Nelcy Arndt, pela enorme paciência e solicitude em ajudar sempre. Da mesma forma, obrigada à secretária do IPB, Elisângela Mello e aos secretários da Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, em especial à Bruna, pela atenção e disponibilidade em ajudar sempre que eu precisei. Aos professores, agradeço pelo convívio, ensinamentos e atendimento sempre atencioso.

Aos meus pais, Eledina e Raymundo, pelo amor incondicional, por todo o apoio e ensinamentos. Vocês são a minha base e a minha inspiração para que eu continue sempre em busca dos meus objetivos. Muito obrigada por todos os incentivos e por estarem sempre ao meu lado, sem vocês nada disso seria possível. Obrigada por tudo, amo vocês! Agradeço também, ao meu irmão Éverton, por todo o amor e dedicação, juntamente à minha cunhada Karen e sobrinha Marcelli.

Ao Luciano, obrigada pelo amor e companheirismo, e também por toda a paciência ao longo destes anos. O teu apoio foi muito importante para que eu concluísse este trabalho.

À PUCRS, e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde pela oportunidade de desenvolver o doutorado.

À CAPES pela bolsa concedida ao longo destes anos, bem como, pela bolsa concedida durante o período de doutorado sanduíche através do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE). Da mesma forma, obrigada ao CNPq, Pandurata e PUCRS pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

| | |
|---|----|
| Figura 1. Figura comparativa entre hipocampo humano normal e esclerótico. | 4 |
| Figura 2. Modelo da diferenciação das células-tronco. | 11 |
| Figura 3. Aplicação de células tronco no SNC. | 12 |
| Figura 4. Reprogramação, diferenciação e aplicação das iPSC. | 16 |

Capítulo II

| | |
|--|----|
| Figura 1. Delineamento do estudo. | 39 |
| Figura 2. Representação esquemática para o princípio do microPET. | 44 |
| Figura 3. Frequência de crises espontâneas e recorrentes pré e pós-transplante. | 52 |
| Figura 4. Frequência de crises entre os períodos pré e pós-transplante. | 53 |
| Figura 5. Alterações do metabolismo cerebral da glicose. | 60 |
| Figura 6. Efeito da Pilo e do transplante de CMMO no metabolismo cerebral de FDG. ... | 61 |
| Figura 7. Representação das alterações do metabolismo por SPM. | 65 |
| Figura 8. Representação da matriz de correlação dos grupos Controle, Pilo e Pilo+CMMO no período de 24 dias pós-transplante de salina ou CMMO. | 68 |
| Figura 9. Transplante de CMMO previne disfunção de memória de reconhecimento de objeto em NORT. (A-C). | 69 |
| Figura 10. Transplante de CMMO previne disfunção de memória de separação de padrão em animais com epilepsia crônica. | 71 |
| Figura 11. O tratamento com as CMMO diminui o comportamento depressivo em animais epiléticos no teste do nado forçado (FST) e teste de alimentação relacionado à depressão (ERDT). | 72 |
| Figura 12. O tratamento com as CMMO diminui o comportamento depressivo em animais epiléticos no teste de preferência por sacarose (SPT). | 73 |

Capítulo III

| | |
|---|-----|
| Figura 1. Delineamento experimental. | 159 |
| Figura 2. Diferenciação durante 15 dias das hNSCs derivadas de hiPSC in vitro. | 172 |
| Figura 3. Transplante de hNSCs derivadas de hiPSC reduz o comportamento de crises espontâneas recorrentes (CER) em ratos epiléticos. | 174 |
| Figura 4. Transplante de hNSCs derivadas de hiPSC reduz crises espontâneas recorrentes (CER) em ratos epiléticos analisados por vídeo-EEG. | 175 |
| Figura 5. Transplante de hNSCs derivadas de hiPSC previne a disfunção da memória de localização em OLT. | 176 |
| Figura 6. Transplante de NSCs derivadas de hiPSC previne disfunção de memória de reconhecimento de objeto em NORT. | 177 |
| Figura 7. Transplante de hNSCs derivadas de hiPSC previne disfunção de memória de separação de padrão em PST. | 178 |
| Figura 8. Transplante de hNSCs derivadas de hiPSC previne disfunção de memória de localização de objeto em OIPT. | 180 |
| Figura 9. Transplante de hNSC derivadas de hiPSC diminui o comportamento depressivo em SPT e ERDT. | 181 |
| Figura 10. hNSCs derivadas de hiPSC transplantadas demonstraram excelente capacidade de sobrevivência no hipocampo epilético. | 182 |
| Figura 11. Diferenciação das hNSC transplantadas no hipocampo epilético. | 183 |
| Figura 12. Transplante de NSCs derivadas de hiPSC após SE preservou Interneurônios GABAérgicos que expressam Neuropeptide Y e Parvalbumina. | 185 |
| Figura 13. Transplante de hNSCs derivadas de hiPSC após SE mantém neurogênese no hipocampo epilético. | 186 |
| Figura 14. Transplante de hNSC após SE reduziu a fração de área de astrócitos GFAP+ do hipocampo epilético. | 188 |
| Figura 15. Transplante de hNSCs derivadas de hiPSC reduziu a fração de área de microglia ativada IBA-1+ no hipocampo epilético. | 189 |

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

| | |
|---|-----|
| Tabela 1. Médias±SEM do SUV por região em cada grupo, e os valores de p das comparações entre os grupos para cada região no período de 1 dia pós-transplante. | 107 |
| Tabela 2. Médias±SEM do SUV por região em cada grupo, e os valores de p das comparações entre os grupos para cada região no período de 7 dias pós-transplante..... | 108 |
| Tabela 3. Médias±SEM do SUV por região em cada grupo, e os valores de p das comparações entre os grupos para cada região no período de 14 dias pós-transplante..... | 109 |
| Tabela 4. Médias±SEM do SUV por região em cada grupo, e os valores de p das comparações entre os grupos para cada região no período de 24 dias pós-transplante..... | 110 |
| Tabela 5. Valores de p para as comparações temporais dos períodos avaliados por região do grupo Controle. | 111 |
| Tabela 6. Valores de p para as comparações temporais dos períodos avaliados por região do grupo Pilo. | 112 |
| Tabela 7. Valores de p para as comparações temporais dos períodos avaliados por região do grupo Pilo+CMMO. | 113 |
| Tabela 8. N° de voxels e Médias±SD do valor T para cada região analisada no SPM. Comparação estatisticamente significativa mostrando o metabolismo do grupo Pilo+CMMO menor que o do grupo Controle no período de 7 dias pós-transplante. | 114 |
| Tabela 9. N° de voxels e Médias±SD do valor T para cada região analisada no SPM. Comparação estatisticamente significativa mostrando o metabolismo do grupo Pilo+CMMO menor que o do grupo Controle no período de 14 dias pós-transplante. | 115 |
| Tabela 10. N° de voxels e Médias±SD do valor T para cada região analisada no SPM. Comparação estatisticamente significativa mostrando o metabolismo do grupo Pilo e do grupo Pilo+CMMO menor que grupo Controle no período de 24 dias pós-transplante. ... | 116 |
| Tabela 11. Valores de p para cada correlação entre as regiões cerebrais analisadas na rede metabólica do grupo Controle. | 117 |

Tabela 12. Valores de p para cada correlação entre as regiões cerebrais analisadas na rede metabólica do grupo Pilo..... 118

Tabela 13. Valores de p para cada correlação entre as regiões cerebrais analisadas na rede metabólica do grupo Pilo+CMMO..... 119

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1. Escala de Racine contendo os graus de resposta dos animais à injeção de PILO..... | 38 |
|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------|--|
| ABC | Complexo avidina-biotina (do inglês <i>Avidin-Biotin Complex</i>) |
| BDNF | Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês <i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>) |
| CCD | Cromatografia em camada delgada |
| CER | Crises espontâneas recorrentes |
| CLAE | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| CMMO | Células mononucleares da medula óssea |
| CT | Células-tronco |
| CTH | Células-tronco hematopoiéticas |
| CTM | Células-tronco mesenquimais |
| CTMO | Células-tronco da medula óssea |
| DAB | Diaminobenzidina (do inglês <i>3,3'-diaminobenzidine</i>) |
| DAPI | Corante nuclear (do inglês <i>4',6-diamidino-2-phenilindol</i>) |
| DCX | Doublecortina (do inglês <i>Doublecortin</i>) |
| DMEM | Meio de cultura de células (do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>) |
| EEG | Eletroencefalograma |
| EGFP | Proteína verde fluorescente (do inglês <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>) |
| ELT | Epilepsia do lobo temporal |
| EMT | Esclerose mesial temporal |
| ERDT | Teste da alimentação relacionada a depressão (do inglês <i>Eating Related Depression Test</i>) |
| ESC | Células-tronco embrionárias (do inglês <i>Embryonic Stem Cells</i>) |
| F-FDG | Fluorodeoxiglicose (do inglês <i>Fluorodeoxyglucose</i>) |
| fMRI | Imagem por ressonância magnética funcional (do inglês <i>Functional Magnetic Resonance Imaging</i>) |
| FST | Teste do nado forçado (do inglês <i>Forced Swim Test</i>) |
| GABA | Ácido gama-aminobutírico (do inglês <i>Gamma-AminoButyric Acid</i>) |
| GD | Giro denteado |
| GDNF | Fator neurotrófico derivado da glia (do inglês <i>Glial cell-derived neurotrophic factor</i>) |

| | |
|--------------------------------|--|
| GEE | Equações de Estimações Generalizadas (do inglês <i>Generalized Estimating Equation</i>) |
| GFAP | Proteína glial fibrilar ácida (do inglês <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>) |
| GS | Glutamina sintetase |
| HNA | Antígeno nuclear humano (do inglês <i>Human Nuclear Antigen</i>) |
| HPA | Hipotálamo-pituitária-adrenal |
| hr-IL1Ra | Receptor humano recombinante de interleucina 1 (do inglês <i>Human Recombinant Interleukin-1 Receptor Antagonist</i>) |
| IBA-1 | Molécula adaptadora da ligação de cálcio ionizado 1 (do inglês <i>Ionized Calcium-Binding Adapter Molecule 1</i>) |
| IFN-α | Interferon α |
| IL-10 | Interleucina 10 |
| IL-1β | Interleucina-1 β |
| IL-2 | Interleucina 2 |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| i.p. | Intraperitoneal |
| iPSC | Células-tronco pluripotentes induzidas (do inglês: <i>Induced Pluripotent Stem Cell</i>) |
| i.v. | Intravenoso |
| KA | Ácido cáinico (do inglês <i>Kainic Acid</i>) |
| Ki-67 | Marcador de proliferação celular |
| MO | Medula óssea |
| NEM | Meio de expansão neuronal (do inglês <i>Neural Expansion Medium</i>) |
| NeuN | Anti-núcleo neuronal (do inglês <i>Neuronal Nuclear Antigen</i>) |
| NFST | Teste de supressão de alimento (do inglês <i>Novelty Feeding Suppressed Test</i>) |
| NG2 | Marcador de precursor de oligodendrócitos |
| NGF | Fator de crescimento neural (do inglês <i>Neural Growth Factor</i>) |
| NIM | Meio de indução neuronal (do inglês <i>Neural Induction Medium</i>) |
| NORT | Teste de reconhecimento de objeto (do inglês <i>Novel Object Recognition Test</i>) |
| NPY | Neuropeptídeo Y |

| | |
|----------------|--|
| NSC | Células-tronco neurais (do inglês <i>Neural Stem Cells</i>) |
| O1 | Marcador de oligodendrócitos 1 |
| OCT-4 | Fator de transcrição de ligação ao octâmero 4 (do inglês <i>Octamer-Binding Transcription Factor 4</i>) |
| OF | Objeto familiar |
| OIPT | Teste de localização do objeto (do inglês <i>Object In Place Test</i>) |
| OLF | Objeto no local familiar |
| OLN | Objeto no local novo |
| OLT | Teste de localização do objeto (do inglês <i>Object Location Test</i>) |
| ON | Objeto novo |
| PBS | Tampão fosfato-salino (do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>) |
| PET | Tomografia por emissão de pósitrons (do inglês <i>Positron Emission Tomography</i>) |
| PFA | Paraformoladeído |
| PILO | Pilocarpina |
| PO | Poly-O-Ornitina (do inglês <i>Poly-O-Ornithine</i>) |
| PST | Teste de separação por padrão (do inglês <i>Pattern Sepatation Test</i>) |
| PV | Parvalbumina |
| SCNT | Transferência Nuclear de Células Somáticas (do inglês <i>Somatic Cell Nuclear Transfer</i>) |
| SE | <i>Status epilepticus</i> |
| SGZ-GCL | Zona subgranular-Camada de células granulares (do inglês <i>Subgranular Zone-Granular Cell Layer</i>) |
| SNC | Sistema nervoso central |
| SPM | Mapeamento paramétrico estatístico (do inglês <i>Statistical Parametric Mapping</i>) |
| SS | Solução Salina |
| SUV | Valor padronizado de captação (do inglês <i>Standardized Uptake Value</i>) |
| TGF-β1 | Fator de crescimento transformador β (do inglês <i>Transforming Growth Factor β</i>) |

| | |
|--------------------------------|---|
| TNF-α | Fator de necrose tumoral alfa (do inglês <i>Tumor Necrosis Factor α</i>) |
| Tra-1-60 | Marcador de pluripotência |
| TSPO | Proteína translocadora (do inglês <i>Translocator Protein</i>) |
| TUJ-1 | Beta tubulina classe III neurônio-específico (do inglês <i>Neuron-specific Class III β-tubulin</i>) |
| VEGF | Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>) |
| VM | Vídeo-monitoramento |
| VOI | Voxel de interesse (do inglês <i>Voxel of Interest</i>) |
| VTA | Área tegmental ventral (do inglês <i>Ventral Tegmental Area</i>) |

APRESENTAÇÃO

Esta tese está organizada em três capítulos:

Capítulo I: Introdução

Capítulo II: Efeito do transplante de células mononucleares da medula óssea sobre o metabolismo cerebral da glicose *in vivo* e o comportamento depressivo no modelo experimental de epilepsia crônica induzido por pilocarpina.

Capítulo III: Transplante de células-tronco neurais (NSC) derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas humanas (hiPSC) após *status epilepticus* ameniza o desenvolvimento de epilepsia crônica e preserva funções de memória, cognição e depressão.

O Capítulo I compreende uma introdução sobre epilepsia e terapia celular.

O Capítulo II compreende de Resumo, Abstract, Objetivos, Materiais e Métodos, Discussão, Resultados e Conclusões referentes ao trabalho desenvolvido no Laboratório de Neurociências e Centro de Pesquisa Pré-Clínica do Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul (InsCer) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), sob a orientação do Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa. Nos anexos deste capítulo, está inserido o parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), figuras suplementares e o artigo original submetido à revista *Epilepsia*.

O Capítulo III é composto por Resumo, Abstract, Objetivos, Materiais e Métodos, Discussão, Resultados e Conclusões referentes ao trabalho desenvolvido durante o período de doutorado sanduíche no Institute for Regenerative Medicine da Texas A&M University Health Science Center, sob orientação do Prof. Dr. Ashok K. Shetty.

Na seção “Apêndices” estão os artigos científicos publicados dentro da linha de pesquisa em epilepsia e células-tronco.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| Capítulo I..... | 1 |
| 1. EPILEPSIA | 2 |
| 1.1 EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL (ELT) | 2 |
| 1.2 MODELOS EXPERIMENTAIS DE EPILEPSIA | 5 |
| 1.2.1 Modelo Experimental de Epilepsia Induzida por Pilocarpina | 7 |
| 1.2.2 Modelo experimental de Epilepsia Induzida por Ácido Caínico (KA) | 8 |
| 1.3 DEPRESSÃO NA EPILEPSIA..... | 9 |
| 1.4 TERAPIA CELULAR..... | 10 |
| 1.4.1 Células-tronco da medula óssea (CTMO) | 13 |
| 1.4.2 Células-tronco Pluripotentes Induzidas (iPSC) | 14 |
| 1.4.2.1 Células-tronco neurais (NSC)..... | 15 |
| 1.4.3 Terapia celular na epilepsia | 16 |
| 2. REFERÊNCIAS | 20 |
| Capítulo II..... | 31 |
| 1. OBJETIVOS | 35 |
| 1.1 OBJETIVO GERAL | 35 |
| 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 35 |
| 3. METODOLOGIA..... | 36 |
| 3.1 ANIMAIS..... | 36 |
| 3.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS..... | 36 |
| 3.3 MODELO EXPERIMENTAL DE EPILEPSIA INDUZIDA POR PILOCARPINA | 37 |
| 3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL..... | 38 |
| 3.5 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS | 39 |
| 3.6 PRODUÇÃO DE FLÚOR-18 | 40 |
| 3.7 SÍNTESE DE ¹⁸ F-FDG | 41 |
| 3.8 ESCANEAMENTO POR MICROPET | 42 |
| 3.9 RECONSTRUÇÃO DAS IMAGENS E REDE METABÓLICA CEREBRAL..... | 44 |
| 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA IMAGEM MOLECULAR | 45 |
| 3.11 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL | 46 |
| 3.11.1 Teste de reconhecimento de objetos (NORT)..... | 47 |
| 3.11.2 Teste de separação de padrão (PST) | 48 |
| 3.11.3 Teste do nado forçado (FST) | 48 |
| 3.11.4 Teste da preferência por sacarose (SPT)..... | 49 |
| 3.11.5 Teste de alimentação relacionada à depressão (ERDT)..... | 50 |
| 3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL..... | 51 |

| | |
|---|-----------|
| 4. RESULTADOS..... | 51 |
| 4.1 EPILEPSIA INDUZIDA POR PILOCARPINA | 51 |
| 4.2 TRANSPLANTE DE CMMO REDUZ CERS INDUZIDAS POR PILOCARPINA | 51 |
| 4.3 ALTERAÇÕES DO METABOLISMO CEREBRAL DE FDG EM ANIMAIS COM EPILEPSIA CRÔNICA INDUZIDA POR PILOCARPINA TRATADOS E NÃO TRATADOS COM CMMO | 54 |
| 4.3.1 Alterações no metabolismo cerebral de FDG 1 dia após o transplante (23 dias após a injeção de pilocarpina) | 54 |
| 4.3.2 Alterações do metabolismo cerebral de FDG 7 dias após o transplante (29 dias após a injeção de pilocarpina) | 56 |
| 4.3.3 Alterações do metabolismo cerebral de FDG 14 dias após o transplante (36 dias após a injeção de pilocarpina) | 57 |
| 4.3.4 Alterações o metabolismo cerebral de FDG 24 dias após o transplante de CMMO (46 dias após a injeção de pilocarpina) | 58 |
| 4.3.5 Análise temporal do metabolismo cerebral de FDG nos grupos experimentais entre os períodos pós-transplante | 59 |
| 4.4 ALTERAÇÕES DO METABOLISMO DE GLICOSE NO CÉREBRO DE ANIMAIS COM EPILEPSIA CRÔNICA TRATADOS E NÃO TRATADOS COM AS CMMO POR SPM | 62 |
| 4.4.1 Alterações metabólicas cerebrais 1 dia após o transplante de CMMO (23 dias após a injeção de pilocarpina) | 62 |
| 4.4.2 Alterações metabólicas cerebrais 7 dias após o transplante de CMMO (29 dias após a injeção de pilocarpina) | 62 |
| 4.4.3 Alterações metabólicas cerebrais 14 dias após o transplante de CMMO (36 dias após a injeção de pilocarpina) | 63 |
| 4.4.4 Alterações metabólicas cerebrais 24 dias após o transplante de CMMO (46 dias após a injeção de pilocarpina) | 63 |
| 4.4.5 Alterações da rede metabólica no período de 24 dias pós-transplante (ou 46 dias pós-SE)..... | 65 |
| 4.5 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO COGNITIVO E DEPRESSIVO | 69 |
| 4.5.1 Transplante de CMMO diminuiu o déficit cognitivo em animais epiléticos | 69 |
| 4.5.2 Transplante de CMMO manteve a função de memória de separação de padrões em animais epiléticos | 70 |
| 4.5.3 Transplante de CMMO reduziu o comportamento depressivo em animais epiléticos no teste do nado forçado e teste de depressão relacionada à alimentação 71 | |
| 4.5.4 Transplante de CMMO diminuiu a anedonia em animais epiléticos no teste da preferência por sacarose..... | 73 |
| 5. DISCUSSÃO | 74 |

| | |
|--|------------|
| 6. CONCLUSÃO..... | 89 |
| 7. REFERÊNCIAS | 90 |
| 8. ANEXOS | 101 |
| 8.1 ANEXO I: Carta Aprovação CEUA PUCRS..... | 101 |
| 8.2 ANEXO II: Figuras complementares..... | 102 |
| 8.3 ANEXO III: Artigo Original..... | 120 |
| Capítulo III..... | 153 |
| 1. OBJETIVOS | 157 |
| 1.1 OBJETIVO GERAL | 157 |
| 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 157 |
| 2. METODOLOGIA..... | 158 |
| 2.1 GERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO NEURAIS (NSC) A PARTIR DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTE INDUZIDAS HUMANAS (hiPSC)..... | 158 |
| 2.2 ANIMAIS E INDUÇÃO DO MODELO DE ÁCIDO CAÍNICO (KA)..... | 159 |
| 2.3 TRANSPLANTE INTRAHIPOCAMPAL DE HNSC DERIVADAS DE HIPSC | 160 |
| 2.4 DIFERENCIAÇÃO DAS hiPSC-NSC IN VITRO..... | 161 |
| 2.5 MONITORAMENTO DE CRISES ESPONTÂNEAS RECORRENTES (CERS)..... | 161 |
| 2.6 MONITORAMENTO DE CERS VIA VÍDEO-ENCEFALOGRAMA (VIDEO-EEG) | 161 |
| 2.7 TESTES COMPORTAMENTAIS..... | 162 |
| 2.7.1 Teste de Localização do Objeto (OLT)..... | 163 |
| 2.7.2 Teste de Reconhecimento de Objetos (NORT)..... | 163 |
| 2.7.3 Teste de Separação de Padrão (PST)..... | 164 |
| 2.7.4 Teste de Localização de Objetos (OIPT)..... | 164 |
| 2.7.5 Teste de alimentação relacionada à depressão (ERDT)..... | 165 |
| 2.7.6 Teste de preferência por sacarose (SPT)..... | 165 |
| 2.8 PROCESSAMENTO DO TECIDO..... | 166 |
| 2.9 ANÁLISES IMUNOHISTOLÓGICAS..... | 167 |
| 2.9.1 Análise da sobrevivência das hNSC transplantadas..... | 167 |
| 2.9.2 Análise da diferenciação das hNSC transplantadas no hipocampo..... | 168 |
| 2.9.3 Análise quantitativa de novos neurônios DCX+ na SGZ-GCL e Hilo..... | 169 |
| 2.9.4 Análise quantitativa de interneurônios NPY+ e PV+ no hipocampo..... | 170 |
| 2.9.5 Análise quantitativa das estruturas GFAP e IBA-1 no hipocampo..... | 170 |
| 2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 171 |
| 3. RESULTADOS..... | 172 |
| 3.1 DIFERENCIAÇÃO DAS iPSC-hNSC IN VITRO..... | 172 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 3.2 | TRANSPLANTE DE hNSC PÓS-SE REDUZIU A FREQUÊNCIA E SEVERIDADE DAS CRISES ESPONTÂNEAS RECORRENTES (CER)..... | 173 |
| 3.3 | TRANSPLANTE DE hNSCS MANTIVERAM AS FUNÇÕES DE MEMÓRIA PARA A LOCALIZAÇÃO DE OBJETOS EM ANIMAIS EPILÉPTICOS..... | 175 |
| 3.4 | TRANSPLANTE DAS hNSC PRESERVOU A FUNÇÃO DE MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS EM ANIMAIS EPILÉPTICOS | 176 |
| 3.5 | TRANSPLANTE DAS hNSC MANTEVE A FUNÇÃO DE MEMÓRIA DE SEPARAÇÃO DE PADRÃO EM ANIMAIS EPILÉPTICOS | 178 |
| 3.6 | TRANSPLANTE DAS hNSC PRESERVOU A FUNÇÃO DE MEMÓRIA DE LOCALIZAÇÃO DE OBJETOS EM ANIMAIS EPILÉPTICOS | 179 |
| 3.7 | TRANSPLANTE DAS hNSC REDUZIRAM O COMPORTAMENTO DEPRESSIVO EM ANIMAIS EPILÉPTICOS..... | 180 |
| 3.8 | SOBREVIVÊNCIA E DIFERENCIAÇÃO DAS hNSC TRANSPLANTADAS NO HIPOCAMPO DE ANIMAIS EPILÉPTICOS | 181 |
| 3.9 | TRANSPLANTE DE hNSC PÓS-SE PRESERVOU INTERNEURÔNIOS GABAÉRGICOS EXPRESSANDO NEUROPEPTÍDEO Y E PARAVALBUMINA 184..... | 184 |
| 3.10 | TRANSPLANTE DE hNSC MANTEVE NÍVEIS NORMAIS DE NEUROGÊNESE EM ANIMAIS COM EPILEPSIA CRÔNICA..... | 185 |
| 3.11 | TRANSPLANTE DAS hNSC PÓS-SE REDUZIU A REATIVIDADE DE ASTRÓCITOS EM ANIMAIS EPILÉPTICOS | 187 |
| 3.12 | TRANSPLANTE DAS hNSCS PÓS-SE REDUZIU A ATIVAÇÃO DE MICROGLIA EM ANIMAIS EPILÉPTICOS | 188 |
| 4. | DISCUSSÃO | 190 |
| 5. | CONCLUSÃO..... | 196 |
| 6. | REFERÊNCIAS | 197 |
| | APÊNDICES – Artigos publicados na linha de pesquisa em epilepsia e células-tronco | 207 |
| | APÊNDICE I..... | 207 |
| | APÊNDICE II: | 213 |
| | APÊNDICE III: | 222 |

Capítulo I

Introdução

1. EPILEPSIA

Estima-se que a incidência da epilepsia atinja cerca de 1% da população nos países desenvolvidos e cerca de 2% nos países em desenvolvimento, apesar das dificuldades metodológicas para a determinação e obtenção de dados acerca desta doença (Sander and Hart 1999, Engel 2001). Atualmente o tratamento medicamentoso das epilepsias é essencialmente sintomático, visando primariamente o controle das crises através de fármacos antiepilépticos. No entanto, aproximadamente 30% dos pacientes não respondem a esta terapêutica, tornando-se refratários ao tratamento (Loscher 2002).

A epilepsia compreende uma ampla categoria de síndromes caracterizadas por crises espontâneas e recorrentes resultantes de um disparo intenso, sincronizado e rítmico de populações neuronais no sistema nervoso central (SNC) e de excitabilidade excessiva, na ausência de condição tóxica-metabólica ou febril (Gastaut 1973, Rogawski and Porter 1990, McNamara 1994). Fatores causais, tais como predisposição individual, presença de lesão cerebral ou alterações bioquímicas ou elétricas no cérebro podem estar envolvidos no desenvolvimento da epilepsia (Guerreiro, Guerreiro et al. 2000).

1.1 EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL (ELT)

Entre as epilepsias refratárias ao tratamento medicamentoso, aquelas com origem no lobo temporal são as mais frequentes (Valério 1995, Blumcke, Beck et al. 1996, Yacubian 1998). A epilepsia do lobo temporal (ELT) é caracterizada clinicamente pelo desenvolvimento gradativo de crises espontâneas e recorrentes (CERs) – crises parciais complexas, com ou sem generalização secundária associada a progressiva perda neuronal e declínio do desempenho cognitivo, independentemente da doença subjacente. Na maioria das vezes, antes da apresentação de CERs, os pacientes experimentam crises convulsivas febris prolongadas na infância ou outros danos iniciais nos primeiros anos de vida, seguido de período livre de crises que perdura por um longo tempo. Alguns estudos sugerem que essas crises convulsivas febris prolongadas possam estar envolvidas com o desenvolvimento da ELT (Dube, Brewster et al. 2009).

Em um estudo foi mostrado diferenças fenotípicas entre os hipocampos de pacientes com epilepsia mesial do lobo temporal que apresentaram crises convulsivas febris e os que não apresentaram essas crises durante a infância, como por exemplo, maior perda neuronal no hipocampo dos pacientes que apresentaram essas crises anteriormente (Bando, Alegro et al. 2011). As crises do lobo temporal frequentemente iniciam-se entre os 5-10 anos de vida, quando respondem aos fármacos anti-epilépticos, mas recorrem durante a adolescência, ou mais tarde, quando, em geral, passam a não mais responder adequadamente ao tratamento medicamentoso (Engel 1996).

As crises do lobo temporal tendem a seguir uma sequência de eventos relativamente fixa. Um fenômeno clínico bastante comum nos pacientes com ELT é a presença da aura na fase ictal, ou seja, imediatamente antes do início de uma crise parcial complexa. Esta consiste de uma sensação de mal epigástrico ascendente, sensações dismnésticas (déjà vu) e psíquicas – medo súbito desproposital, alucinações olfatórias e gustativas. As manifestações decorrentes das crises parciais complexas, que geralmente duram 1 a 2 minutos, iniciam com parada de atividade, olhar fixo não responsivo, postura distônica, automatismos oroalimentares e motores estereotipados. Após a remissão da crise, o paciente pode apresentar desorientação, amnésia do evento, déficit de memória recente e afasia. Uma avaliação neuropsicológica do paciente com ELT pode revelar distúrbios de memória. Esta disfunção é proporcional ao grau de atrofia das estruturas mesiais, sobretudo do hipocampo (Yacubian 1998).

Na maioria das ELT há comprometimento das estruturas mesiais do lobo temporal, estabelecendo-se a esclerose mesial temporal (EMT) (Leite and Cavalheiro 1998). As principais modificações fisiopatológicas da EMT incluem morte neuronal, gliose reativa, brotamentos de colaterais axônicas das células granulares (fibras musgosas) na região da camada molecular interna do giro denteado, alterações na morfologia e localização dos dendritos, e neurogênese na camada subgranular do giro denteado (Blumcke, Beck et al. 1999, Blumcke, Thom et al. 2002, Guedes, Galvis-Alonso et al. 2006). Alguns pacientes com ELT, também, podem apresentar esclerose do lobo temporal associada com a esclerose hipocampal. A ELT com a esclerose do hipocampo é frequentemente associada com comprometimento da memória (Motamedi e Meador, 2003). Em um estudo foi verificado

que, aproximadamente, 11% dos pacientes com esclerose hipocampal eram acompanhados de esclerose do lobo temporal, sugerindo que este processo seja acompanhado de uma displasia re-organizacional e uma extensão da EMT como uma patologia separada (Thom, Eriksson et al. 2009).

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

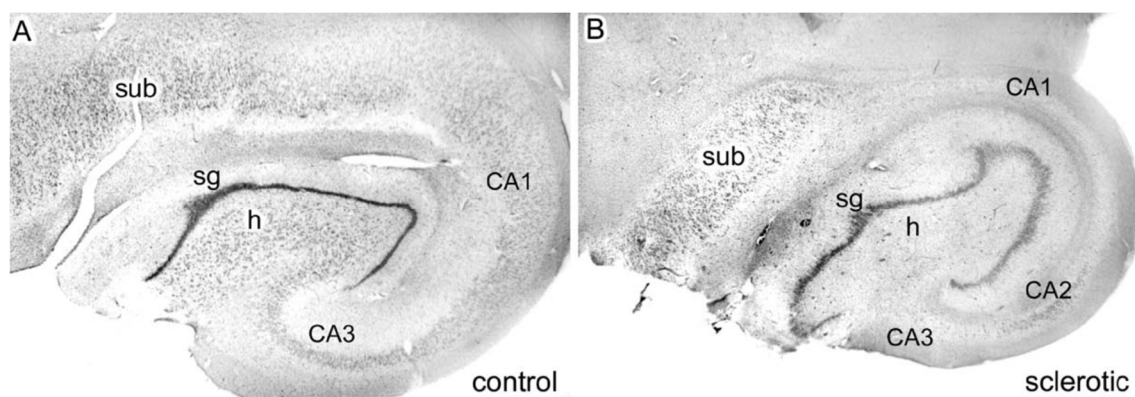


Figura 1. Figura comparativa entre hipocampo humano normal e esclerótico. A) Espécimen de autópsia controle mostrando hipocampo humano normal. B) Esclerose hipocâmpal em Espécimen cirúrgico, com perda neuronal extensiva no hilo (h) e nas áreas de CA3 e CA1, e sobrevivência de neurônios de CA2 e subiculares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

Existem teorias que tentam explicar como a estrutura hipocâmpal está envolvida com o início das CERs, sendo que a morte das células musgosas da região hilar parece ser um mecanismo fundamental para o quadro epileptogênico. A teoria das “células em cesto

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

1.2 MODELOS EXPERIMENTAIS DE EPILEPSIA

Foram desenvolvidos diversos modelos animais de epilepsia ou de crises epilépticas. Os principais induzem uma cascata de eventos moleculares e estruturais que resultam em modificações nas propriedades neuronais intrínsecas, bem como nas redes neuronais, tornando-as epileptogênicas. Nos modelos denominados agudos, o animal apresenta crises convulsivas somente durante a ação do agente indutor, enquanto que nos modelos ditos crônicos as crises ocorrem a intervalos variados de tempo após a indução, podendo acompanhar toda a vida do animal (Cavalheiro, Leite et al. 1991, Sanabria and Cavalheiro 2000). Dentre os modelos crônicos de epilepsia sintomática incluem os modelos nos quais a epilepsia é induzida por métodos químicos ou elétricos em animais previamente saudáveis (Kandratavicius, Balista et al. 2014). Já os modelos genéticos empregam animais com mutações espontâneas ou animais transgênicos e *knockout* para o desenvolvimento da epilepsia (Suzuki 2004).

Os principais modelos experimentais de epilepsia do lobo temporal envolvem condições nas quais a epilepsia é consequência de um dano encefálico induzido por um episódio agudo de *status epilepticus* (SE), este podendo ser desencadeado através da aplicação de convulsivantes químicos, como pilocarpina (PILO) ou ácido caínico (KA), e pode durar várias horas (Cavalheiro, Riche et al. 1982, Leite, Bortolotto et al. 1990). O

dano cerebral induzido pelo SE nos animais pode ser considerado equivalente à uma injúria precipitante inicial vista em pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial, a qual geralmente é apresentada como crise febril prolongada (Mathern, Babb et al. 1996). Nesses modelos, o SE é interrompido depois de determinado tempo e é seguido de um período latente variável (Leite, Garcia-Cairasco et al. 2002). Após o período latente, inicia-se a fase crônica, que se caracteriza pela ocorrência de crises espontâneas e recorrentes, as quais podem persistir por toda a vida (Coulter, McIntyre et al. 2002). Assim, em geral, estes modelos reproduzem melhor a epilepsia humana, porque apresentam CERs precedidas por uma fase de latência e alterações neuropatológicas semelhantes àquelas encontradas em indivíduos com ELT. Os avanços tecnológicos permitiram estudos funcionais/metabólicos do cérebro, tais como os exames de tomografia por emissão de pósitrons (PET, do inglês *Positron Emission Tomography*) utilizando a flúor-desoxiglicose marcada com Flúor-18 (^{18}F -FDG) que permite visualizar a atividade metabólica cerebral utilizando equipamentos de microPET para animais de pequeno porte (Mirrione, Schiffer et al. 2007). Esta técnica tem sido utilizada na investigação das alterações metabólicas no cérebro de vários distúrbios cerebrais, incluindo a epilepsia e doenças neurodegenerativas, e podem agora ser avaliados em animais de pequeno porte (Goffin, Bormans et al. 2008, Guo, Gao et al. 2009, Jupp, Williams et al. 2012, Lee, Park et al. 2012, Choi, Kim et al. 2014, Zimmer, Parent et al. 2014).

Tanto na epilepsia do lobo temporal humana quanto em modelos experimentais de epilepsia crônica, a perda progressiva de neurônios correlaciona-se com o acometimento de estruturas importantes na memória e aprendizagem, comprometendo estas funções (Sarkisian, Tandon et al. 1997). Evidências clínicas, complementadas por estudos pré-clínicos sugerem que há um grande déficit cognitivo após o SE, inferido através de medidas de aprendizagem ou memória. Em particular, há relatos do comprometimento tanto da memória explícita, quanto da memória implícita (Liu, Gatt et al. 1994, Holmes 1997). A propagação das crises a partir dos focos epilépticos para as áreas adjacentes é acompanhada por vários sintomas comportamentais e cognitivos, uma vez que várias das regiões responsáveis por essas funções são afetadas na ELT (Vlooswijk, Jansen et al. 2010, Braakman, van der Kruijs et al. 2012).

O hipocampo é uma região vital para as funções de memória, cognição, depressão e humor (Deng, Aimone et al. 2010, Samuels e Hen 2011), sendo a região mais afetada pela epilepsia do lobo temporal. Desta perspectiva, estratégias de intervenção que são eficientes para prevenir ou restringir a progressão da lesão na memória, disfunção de humor e desenvolvimento da epilepsia crônica possui imenso valor. As intervenções terapêuticas ideais são aquelas capazes de promover neurogênese com a incorporação adequada de novos neurônios nos circuitos hipocampais danificados (Shetty 2014). Esses requisitos são importantes porque a neurogênese do hipocampo desempenha papéis vitais na formação de memórias dependentes do hipocampo e a manutenção da função humoral (Deng, Aimone et al. 2010, Snyder, Soumier et al. 2011). Assim como, a probabilidade de que a neurogênese anormal segue após a lesão e contribui para uma reorganização sináptica aberrante no hipocampo, bem como, disfunções de memória e humor, e o desenvolvimento da ELT crônica (Scharfman e Gray 2007, Shetty 2014).

1.2.1 Modelo Experimental de Epilepsia Induzida por Pilocarpina

Dentre os modelos farmacológicos disponíveis, o da epilepsia induzida por pilocarpina (PILO; um agonista colinérgico muscarínico) é um dos que mais se aproxima da ELT. Inicialmente descrito por Turski e colaboradores (Turski, Cavalheiro et al. 1983), este modelo crônico de epilepsia tem sido utilizado com o intuito de avaliar os mecanismos envolvidos na epilepsia da infância bem como as consequências imediatas e tardias das crises epiléticas. Este modelo reproduz as condições necessárias para a indução de uma sintomatologia semelhante àquela observada durante uma crise epilética, bem como alterações morfológicas idênticas às observadas em tecido epilético humano (Cavalheiro, Leite et al. 1991).

Extraída das folhas das plantas sul-americanas *Pilocarpus jaborandi* e *Pilocarpus microphyllus*, a PILO é um alcalóide que induz um estado comportamental crônico que parece depender da facilitação de descargas em salva em neurônios hipocampais, por meio do bloqueio de correntes iônicas de potássio, que são dependentes da ativação muscarínica (M) (Sanabria e Cavalheiro 2000). A partir da ativação de muitos neurônios durante o SE

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

O modelo de pilocarpina é amplamente utilizado em uma série de estudos. Dependendo dos objetivos dos experimentos, são usadas diferentes dosagens de pilocarpina, procedimentos de pré e pós-tratamento, e também, diversas linhagens de animais (Curia, Longo et al. 2008). Ao receber PILO, os animais ficam em SE duradouro de, no mínimo, 30 minutos. Os ratos apresentam crises epiléticas de intensidade variável, caracterizadas por imobilidade, tremor, automatismo bucofaciais, abalos de extremidades, ataxia e crises tônico-clônicas. Esta crise aguda é seguida por um período latente, com normalização progressiva do EEG, sendo uma fase em que o animal permanece sem crises comportamentais e que dura em média 14 a 25 dias. A partir daí, surgem crises epiléticas espontâneas recorrentes, caracterizando a fase crônica (Leite, Bortolotto et al. 1990, Cavalheiro, Leite et al. 1991). Neste modelo, a perda neuronal está localizada principalmente nas regiões do hipocampo, córtex piriforme e entorrinal, tálamo, amígdala e neocórtex (Turski, Cavalheiro et al. 1983). Além disso, a extensão da lesão hipocampal está diretamente relacionada com a duração do SE (Lemos e Cavalheiro 1995).

1.2.2 Modelo experimental de Epilepsia Induzida por Ácido Caínico (KA)

O ácido cainico (KA) é um análogo de L-glutamato e um agonista de receptores de cainato ionotrópicos extraído de algas vermelhas (*Digenea simplex*) encontradas em águas tropicais e subtropicais. Assim como o modelo da pilocarpina, o modelo de epilepsia induzida pelo KA também é amplamente utilizado para o estudo da ELT (Levesque e Avoli 2013) e foi um dos primeiros compostos utilizados para modelar ELT em roedores (Sharma, Reams et al. 2007). A administração sistêmica ou intracerebral de KA causa despolarização neuronal, principalmente no hipocampo, conseqüentemente dando origem

às crises epilépticas (Ben-Ari, Lagowska et al. 1979, Cavalheiro, Riche et al. 1982, Hellier, Patrylo et al. 1998).

Os animais submetidos a injeção de KA apresentam crises espontâneas e recorrentes, com generalização secundária na maioria das vezes e frequência variável, e geralmente acompanhada de esclerose hipocampal (Raedt, Van Dycke et al. 2009). As crises comportamentais são muito similares àquelas apresentadas no modelo da pilocarpina, com três fases típicas da epilepsia: fase aguda, fase latente e fase crônica (Leite, Garcia-Cairasco et al. 2002). Para a indução de SE por injeção de KA sistêmica, os animais geralmente recebem doses graduais via intraperitoneal (Rao, Hattiangady et al. 2006, Hattiangady e Shetty 2010), e doses menores para a administração intracerebral (Shetty, Zaman et al. 2005).

Os animais apresentam crises epilépticas de intensidade variável, caracterizadas por imobilidade, tremor, automatismo bucofaciais, abalos de extremidades, ataxia e crises tônico-clônicas, mais uma vez semelhante ao modelo da pilocarpina. Esta crise aguda é seguida por um período latente, com normalização progressiva do EEG (eletroencefalograma), sendo uma fase em que o animal permanece sem crises comportamentais e que dura em média 30 a 60 dias. A partir daí, surgem crises epilépticas espontâneas recorrentes, caracterizando a fase crônica do modelo (Rao, Hattiangady et al. 2006, Hattiangady e Shetty 2008).

1.3 DEPRESSÃO NA EPILEPSIA

A depressão representa uma das comorbidades mais comuns em pacientes com epilepsia (Kanner 2003). Embora os aspectos psicossociais desses pacientes possam contribuir para a depressão associada à epilepsia, existe um consenso crescente de que esta condição tem base neurobiológica (Kanner 2005). Evidências clínicas e experimentais sugerem que os desequilíbrios em tais neurotransmissores como GABA, glutamato, norepinefrina e serotonina, os quais são comumente observados em pacientes com epilepsia, podem contribuir para o desenvolvimento da depressão (Kanner 2006,

Kondziella, Alvestad et al. 2007). Um estudo clínico enfatizou deficiências similares no funcionamento do sistema adrenocortical hipotalâmico pituitário em pacientes com epilepsia e aqueles com depressão (Zobel, Barkow et al. 2004). Alguns relatos clínicos têm implicado a neurodegeneração ou disfunção do hipocampo no desenvolvimento de depressão em pacientes com epilepsia (Gilliam, Maton et al. 2007, Shamim, Hasler et al. 2009).

O estabelecimento e a validação de modelos animais que apresentem essa comorbidade na epilepsia são fundamentais para a compreensão dos mecanismos dessa condição, e para o desenvolvimento pré-clínico de novas terapias. A depressão tem sido descrita em alguns modelos de epilepsia experimental (Sarkisova, Midzianovskaia et al. 2003, Jones, Salzberg et al. 2008, Mazarati, Siddarth et al. 2008). De fato, vários medicamentos antiepilépticos, podem causar comportamento depressivo, enquanto alguns antidepressivos aumentam o risco de crises, particularmente em situações de overdose (Hesdorffer e Kanner 2009). A intervenção cirúrgica da epilepsia pode ser uma eficiente opção para estes pacientes, mas a remoção da área epileptogênica pode determinar eventual perda de funções cerebrais limitando o número de pacientes que podem receber este tratamento (Paglioli, Palmini et al. 2004, Paglioli, Palmini et al. 2006). Dentro desse panorama, torna-se fundamental que sejam estudadas e disponibilizadas novas alternativas terapêuticas, entre elas a terapia com células-tronco.

1.4 TERAPIA CELULAR

As células-tronco (CT) 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 autorregenerar, quanto de se diferenciar através de uma determinada via molecular e originar diferentes linhagens celulares (Figura 2) (Morrison, Shah et al. 1997).

As células-tronco são em geral classificadas como células-tronco embrionárias e células-tronco adultas ou somáticas. As células-tronco embrionárias são derivadas do

blastocisto e são consideradas pluripotentes, isto é, têm a capacidade de originar células derivadas das três camadas germinativas: mesoderma, endoderma e ectoderma. Já as células-tronco adultas ou somáticas são células indiferenciadas que, no entanto, se encontram em tecidos diferenciados (especializados). Essas células são responsáveis pelo reabastecimento tecidual ao longo da vida e estão presentes na maioria dos tecidos, tais como, o sangue, a pele, o fígado, o coração e o cérebro (Morrison, Shah et al. 1997, Kaji e Leiden 2001).

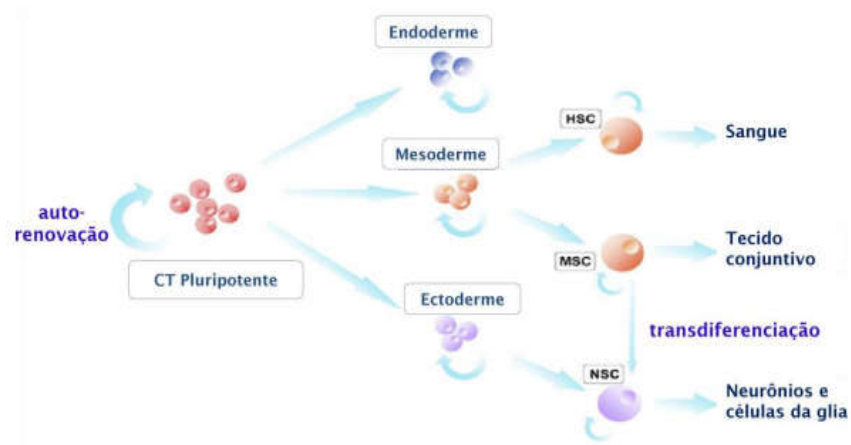


Figura 2. Modelo da diferenciação das células-tronco. A partir de uma célula pluripotente, as células-tronco perdem gradualmente seu potencial de diferenciação. Células-tronco multipotentes têm potencial de transdiferenciação em linhagem neuronal. HSC: célula-tronco hematopoiética; MSC: célula-tronco mesenquimal; NSC: célula-tronco neural. Adaptado de Carney e Shah, 2011 (Carney e Shah 2011).

Como resultado do progresso contínuo do conhecimento a respeito da capacidade regenerativa do sistema nervoso e do potencial terapêutico das células-tronco, houve um grande aumento no interesse em se estudar estratégias baseadas em terapia celular para o tratamento de doenças neurológicas (Figura 3). A hipótese se baseia na ideia de que, uma vez introduzidas no SNC, essas células poderiam promover a reposição das células perdidas durante o curso da doença ou ainda modular a regeneração endógena e cascatas inflamatórias através da expressão de fatores tróficos.

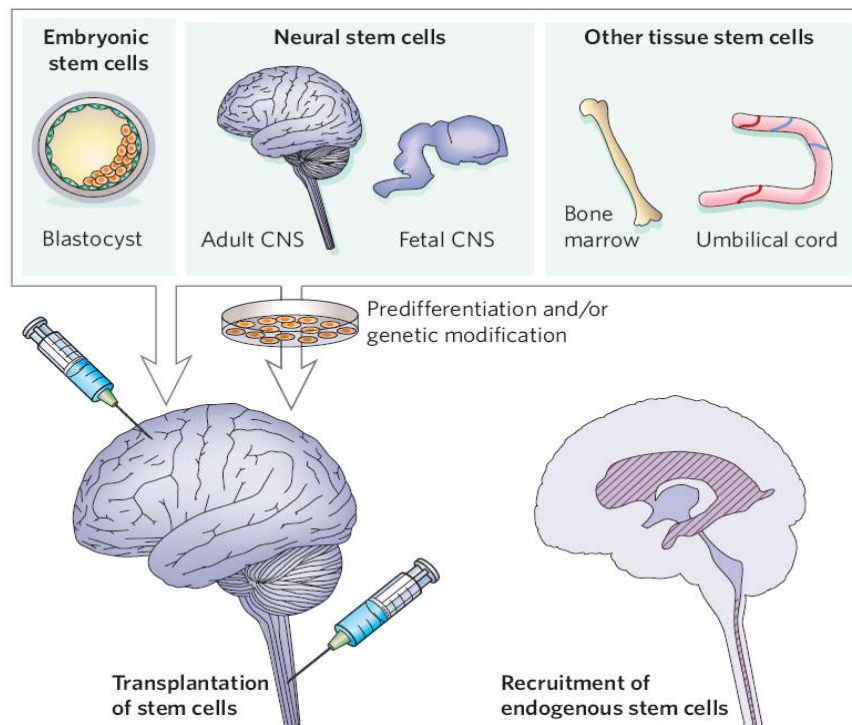


Figura 3. Aplicação de células tronco no SNC. As células-tronco seriam isoladas e transplantadas no cérebro doente ou medula espinhal, diretamente ou após pré-diferenciação em cultura para tipos específicos de neurônios e células gliais (Lindvall e Kokaia 2006).

Dois tecidos amplamente utilizados para a coleta de células-tronco adultas são a medula óssea e o sangue de cordão umbilical. Nestes tecidos, as células-tronco são encontradas na fração mononuclear que, após separadas das demais células, apresentam a importante característica de expressarem marcadores de células indiferenciadas (Kobylka, Ivanyi et al. 1998).

Recentemente, estudos têm demonstrado que o transplante de células-tronco tem melhorado a função em modelos experimentais de acidentes vasculares cerebrais (Haas, Weidner et al. 2005), doença de Parkinson (Kim, Auerbach et al. 2002), doença de Huntington (Dunnett e Rosser 2004), traumatismo raquimedular (Koda, Okada et al. 2005, Kaminski, Falavigna et al. 2013), esclerose lateral amiotrófica (Venturin, Greggio et al. 2016), hipóxia-isquemia (de Paula, Vitola et al. 2012, Greggio, de Paula et al. 2014) e epilepsia (Venturin, Greggio et al. 2011, Costa-Ferro, Souza et al. 2012).

1.4.1 Células-tronco da medula óssea (CTMO)

A MO é uma fonte permanente de células-tronco e contém três tipos de populações: células-tronco hematopoiéticas (CTH), células-tronco mesenquimais (CTM) e possivelmente progenitoras endoteliais (Korbling e Estrov 2003). Já foi demonstrado que as células da MO podem dar origem, *in vivo*, a células de outras linhagens como microglia e neurônios (Eglitis, Dawson et al. 1999, Brazelton, Rossi et al. 2000, Mezey, Chandross et al. 2000). A incorporação destas células no tecido nervoso parece ser intensificada frente a um dano tecidual. Ainda, mesmo que estas células não regenerem o tecido lesado por diferenciação em determinado tipo celular, é provável que a recuperação de funções cerebrais ou estabilização da doença neurológica ocorra por outros mecanismos biológicos, tais como, a liberação de citocinas, ativação de células endógenas ou expressão/modulação de fatores tróficos. Além disso, as células-tronco da MO têm se mostrado eficazes em muitos estudos com modelos experimentais de inúmeras doenças do sistema nervoso, como em lesões da medula espinhal (Koda, Okada et al. 2005), acidentes vasculares cerebrais (Haas, Weidner et al. 2005), doença de Parkinson (Levy, Bahat-Stroomza et al. 2008) e também na epilepsia (Costa-Ferro, Vitola et al. 2010, Venturin, Greggio et al. 2011, Costa-Ferro, Souza et al. 2012, Zanirati, Azevedo et al. 2015).

A fração de células mononucleares da medula óssea (CMMO) utilizada como tratamento neste trabalho consiste em diferentes tipos celulares, incluindo monócitos, precursores mesenquimais e endoteliais, que podem ter diferentes potenciais terapêuticos (Costa-Ferro, Souza et al. 2012). Essas células podem ser facilmente obtidas a partir de um pequeno volume de medula óssea do próprio paciente, sem necessidade de serem expandidas em culturas, evitando maiores manipulações. Portanto, as CMMO fornecem uma fonte facilmente acessível de células para a realização de transplantes autólogos, visando a translação deste tratamento na epilepsia.

1.4.2 Células-tronco Pluripotentes Induzidas (iPSC)

A Transferência Nuclear de Células Somáticas (SCNT do inglês *Somatic Cell Nuclear Transfer*), desenvolvida por John Gurdon, em 1962, foi a técnica precursora da reprogramação de células somáticas, mostrando que ovócitos de anfíbios anucleados são capazes de restaurar a pluripotência ao material nuclear extraído de células adultas (Gurdon 1962). Após, a técnica SCNT foi reproduzida em diversos tipos celulares, incluindo humanos e outros mamíferos (Campbell, McWhir et al. 1996, Chesne, Adenot et al. 2002, Chung, Eum et al. 2014, Nityanandam e Baldwin 2015).

A técnica de geração de células pluripotentes através da reprogramação de fibroblastos de camundongos, e após, de células humanas, foi desenvolvida pelos pesquisadores japoneses Kazutoshi Takahashi e Shinya Yamanaka (Takahashi e Yamanaka 2006, Takahashi, Tanabe et al. 2007). Em seus experimentos, os pesquisadores realizaram a reprogramação de células somáticas através da ativação de fatores de transcrição pela transfecção de genes que conferem a pluripotência celular. Estas células foram reprogramadas pela adição de quatro diferentes genes: OCT4, KLF-4, SOX-2, E C-MYC, por meio de vetores virais. As células produzidas por esse método são chamadas de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC do inglês *Induced Pluripotent Stem Cells*) e são muito similares às células-tronco embrionárias (ESC, do inglês *Embryonic Stem Cells*), apresentando as mesmas características de auto renovação e potencial de diferenciação em linhagens dos três folhetos embrionários (Fries, Blieden et al. 1994, Takahashi e Yamanaka 2006). O Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia, no ano de 2012, foi dividido entre os pesquisadores Gurdon e Yamanaka, por apresentaram uma mudança no paradigma referente à compreensão da diferenciação celular e da plasticidade de células diferenciadas (Nityanandam e Baldwin 2015).

Desde então, diversos métodos visando aumentar a eficiência de protocolos de reprogramação, manutenção e diferenciação das iPSC vem sendo aprimorados e desenvolvidos com sucesso, permitindo a geração de vários subtipos celulares *in vitro*. As iPSC podem ser geradas de pacientes portadores de uma determinada doença ou indivíduos saudáveis e, posteriormente, diferenciadas em células adultas específicas. A diferenciação celular a partir das iPSC é considerada uma ferramenta de grande utilidade para a busca de

novas drogas, contando com o desenvolvimento de modelo celular de diversas doenças e terapia celular (Zhang, Zhang et al. 2013).

1.4.2.1 Células-tronco neurais (NSC)

Em particular, um grande número de estudos demonstrou enorme interesse em células-tronco neurais (NSC, do inglês, *Neural Stem Cells*) por elas poderem ser geradas a partir de diferentes tipos de células, como ESC e iPSC ou ainda, por poderem ser obtidas a partir de regiões do cérebro adulto em desenvolvimento (Hattiangady e Shetty 2011, Hattiangady e Shetty 2012, Shetty 2012, Shetty 2014) (Figura 4). Muitos estudos recentes demonstraram que as NSCs podem sobreviver a transplantes intracerebrais, serem introduzidas em regiões danificadas do cérebro, secretar fatores neurotróficos, o que influencia na sobrevivência de células hospedeiras e promove recuperação funcional em modelos de doenças neurológicas (Turner e Shetty 2003, Waldau, Hattiangady et al. 2010, Shetty 2011, Shetty 2014, Shetty e Upadhyya 2016, Upadhyya, Hattiangady et al. 2016). Além disso, estudos exploram a possibilidade do uso de NSC como um tratamento prospectivo para contenção de epileptogênese e prevenção do desenvolvimento da ELT crônica, diminuindo a disfunção de humor e memória causados por danos no hipocampo (Chu, Kim et al. 2004, Hattiangady e Shetty 2012).

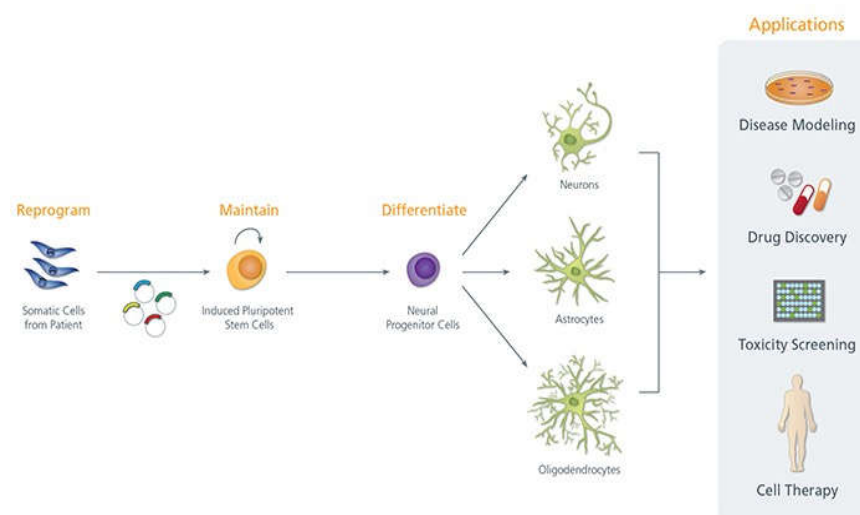


Figura 4. Reprogramação, diferenciação e aplicação das iPSC. Células somáticas adultas podem ser reprogramadas através de genes de transfecção gerando células pluripotentes induzidas (iPSC). As iPSC podem ser diferenciadas em diversos tipos celulares, incluindo células progenitoras neurais, estas podendo se diferenciar em diferentes linhagens neuronais, bem como astrócitos e oligodendrócitos. Essas células neurodiferenciadas podem ser utilizadas para diferentes finalidades como geração de modelos celulares de diversas patologias, busca por novos fármacos, avaliação da toxicidade e para o uso como terapia celular no tratamento de diferentes doenças. Fonte: Stem Cell Technologies.

1.4.3 Terapia celular na epilepsia

Na epilepsia, a exemplo de outros distúrbios do sistema nervoso central, há perda de sub-populações neuronais, o que representa uma consequência importante na patogenia da doença. Esta observação vem estimulando a pesquisa que objetiva repor os neurônios perdidos durante o processo da doença, bem como os mediadores fisiológicos que eles produzem (DaCosta 2012). Nos últimos anos, um grande número de abordagens alternativas usando diferentes terapias celulares vem sendo estudado e mostrando inúmeros efeitos benéficos no tratamento da epilepsia (Shetty e Hattiangady 2007, Acharya, Hattiangady et al. 2008, Shetty 2011), tais como células GABAérgicas (Gernert, Thompson et al. 2002, Thompson 2009, Cunningham, Cho et al. 2014, Shetty e Upadhyya 2016), neurônios/progenitores neurais derivados de células-tronco embrionárias (Ruschenschmidt, Koch et al. 2005, Carpentino, Hartman et al. 2008), células precursoras estriatais (Hattiangady, Rao et al. 2008), células-tronco/fetais hipocampais (Rao, Hattiangady et al. 2006, Rao, Hattiangady et al. 2007, Shen, Liu et al. 2010), células mononucleares da medula óssea (CMMO) (Costa-Ferro, Vitola et al. 2010, Venturin, Greggio et al. 2011, Costa-Ferro, Souza et al. 2012, Leal, Costa-Ferro et al. 2014, Zanirati, Azevedo et al. 2015), células-tronco mesenquimais (CTM) (Li, Ren et al. 2009, Abdanipour, Tiraihi et al. 2011, Long, Qiu et al. 2013), células-tronco neurais (Chu, Kim et al. 2004, Jing, Shingo et al. 2009, Hattiangady, Kuruba et al. 2010, Waldau, Hattiangady et al. 2010, Hattiangady e Shetty 2012, Miltiadous, Kouroupi et al. 2013, Hattiangady, Bates et al. 2015), entre outros tipos celulares.

O nosso grupo de pesquisa vem explorando e demonstrando um eficaz potencial terapêutico das células mononucleares da medula óssea no modelo experimental de

epilepsia induzida por pilocarpina. Em nosso laboratório, demonstrou-se que a administração de CMMO em animais com epilepsia aguda impede o aparecimento de CERs em curto prazo, bem como diminui a frequência de crises quando os mesmos animais são avaliados 120 dias após o transplante (Costa-Ferro, Vitola et al. 2010). Adicionalmente, verificou-se a preservação da densidade de neurônios hipocampais, bem como das sinapses na colateral hipocampal de Schaeffer, nos animais que receberam tratamento celular quando comparados com controles epiléticos não-tratados. Ainda, em estudos subsequentes, demonstramos que há diminuição da frequência de crises não somente quando os animais são tratados no período agudo da doença, mas também quando o transplante é feito durante o período crônico (Venturin, Greggio et al. 2011, Costa-Ferro, Souza et al. 2012). As CMMO também reverterem o déficit cognitivo associado ao modelo da pilocarpina (Venturin, Greggio et al. 2011), além de proteger contra a perda neuronal e gliose reativa relacionadas ao modelo de epilepsia estudado (Costa-Ferro, Vitola et al. 2010, Costa-Ferro, Souza et al. 2012).

Entretanto, as células administradas foram raramente encontradas no encéfalo dos animais transplantados, sugerindo que o mecanismo responsável pela prevenção das crises, pela redução da perda neuronal e pela reorganização da rede hipocampal não esteja relacionado à diferenciação direta das células imaturas transplantadas em células nervosas. Dados obtidos pelo nosso grupo indicam que entre os mecanismos de ação das CMMO podem estar relacionados com a modulação da resposta inflamatória, alterando os níveis de citocinas como IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10, bem como com a modulação da expressão de fatores tróficos BDNF, GDNF, NGF, VEGF e TGF- β 1 (Costa-Ferro, Souza et al. 2012, Leal, Costa-Ferro et al. 2014, Zanirati, Azevedo et al. 2015). Recentemente, foi demonstrado que o transplante autólogo de CMMO em pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial apresentou redução das crises recorrentes e uma melhora significativa da memória, além de evidenciar também, a segurança do tratamento (DaCosta, Portuguese et al. 2016).

Além da avaliação do efeito terapêutico da administração de células-tronco em modelos experimentais de epilepsia, estudos vêm evidenciando a utilização de sistemas de imagem não-invasivos, como o microPET afim de verificar as repercussões *in vivo* do

transplante dessas células. Esse sistema permite que se visualize e quantifique dados moleculares funcionais *in vivo* em animais de pequeno porte, e tem sido amplamente utilizado na investigação de aspectos relacionados à terapia celular na epilepsia, especificamente no modelo da pilocarpina.

A utilização das iPSCs para compreensão dos mecanismos das epilepsias e para futuras aplicações terapêuticas está evoluindo rapidamente e se tornando uma estratégia singular. Modelos *in vitro* de iPSC são de valor significativo para investigar novos compostos farmacológicos para diversas doenças neurológicas, incluindo a epilepsia. Adicionalmente, proporcionam uma alternativa terapêutica com um grande potencial para o tratamento da epilepsia do lobo temporal, uma vez que possuem a capacidade de gerar células-tronco neurais, progenitores neurais e tipos específicos de neurônios, os quais podem se integrar e reparar o sistema nervoso epiléptico. Avanços em várias áreas ainda são necessários para impactar significativamente o desenvolvimento de pesquisas na epilepsia e a terapia celular utilizando estas abordagens, porém células derivadas de iPSCs de pacientes com epilepsia têm demonstrado potencial para revelar subjacentes mecanismos envolvidos na doença e identificar potenciais tratamentos (Du e Parent 2015, Parent e Anderson 2015, Tidball e Parent 2016). Outra abordagem para utilização de iPSC na epilepsia é o seu uso para a terapia celular através do transplante de células-tronco neurais derivadas de iPSC em modelos animais e a posterior avaliação dos seus efeitos terapêuticos diretamente no cérebro lesionado, acompanhando assim, a integração dessas células em redes de desenvolvimento e maturação *in vivo*.

Além da sua capacidade para modelar a patologia molecular e celular da epilepsia, as iPSCs humanas são uma grande promessa terapêutica como fonte autóloga de material para terapia celular para o tratamento das epilepsias (Southwell, Nicholas et al. 2014). Os estudos envolvendo a utilização de iPSC para o tratamento da epilepsia em modelos experimentais, geralmente, diferenciam as iPSC em células-tronco neurais e/ou progenitoras neurais e estas são transplantadas no cérebro de animais com epilepsia. Estes estudos buscam explorar a sobrevivência, migração e integração dessas células no sistema nervoso, para posteriormente, avaliar os benefícios terapêuticos (Hattiangady and Shetty 2012, Shetty 2014). Assim como, outros estudos demonstram grande potencial na

utilização de interneurônios derivadas de iPSC de pacientes para o tratamento das epilepsias (Zipancic, Calcagnotto et al. 2010, Maisano, Litvina et al. 2012, Shetty e Upadhy 2016).

2. REFERÊNCIAS

- Abdanipour, A., T. Tiraihi and J. Mirnajafi-Zadeh (2011). "Improvement of the pilocarpine epilepsy model in rat using bone marrow stromal cell therapy." *Neurol Res* **33**(6): 625-632.
- Acharya, M. M., B. Hattiangady and A. K. Shetty (2008). "Progress in neuroprotective strategies for preventing epilepsy." *Prog Neurobiol* **84**(4): 363-404.
- Bando, S. Y., M. C. Alegro, E. Amaro, Jr., A. V. Silva, L. H. Castro, H. T. Wen, A. Lima Lde, H. Brentani and C. A. Moreira-Filho (2011). "Hippocampal CA3 transcriptome signature correlates with initial precipitating injury in refractory mesial temporal lobe epilepsy." *PLoS One* **6**(10): e26268.
- Ben-Ari, Y., J. Lagowska, E. Tremblay and G. Le Gal La Salle (1979). "A new model of focal status epilepticus: intra-amygdaloid application of kainic acid elicits repetitive secondarily generalized convulsive seizures." *Brain Res* **163**(1): 176-179.
- Blumcke, I., H. Beck, A. A. Lie and O. D. Wiestler (1999). "Molecular neuropathology of human mesial temporal lobe epilepsy." *Epilepsy Res* **36**(2-3): 205-223.
- Blumcke, I., H. Beck, B. Scheffler, P. R. Hof, J. H. Morrison, H. K. Wolf, J. Schramm, C. E. Elger and O. D. Wiestler (1996). "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* **92**(6): 576-587.
- Blumcke, I., M. Thom and O. D. Wiestler (2002). "Ammon's horn sclerosis: a maldevelopmental disorder associated with temporal lobe epilepsy." *Brain Pathol* **12**(2): 199-211.
- Braakman, H. M., S. J. van der Kruijs, M. J. Vaessen, J. F. Jansen, M. H. Debeij-van Hall, J. S. Vles, A. P. Aldenkamp, W. H. Backes and P. A. Hofman (2012). "Microstructural and functional MRI studies of cognitive impairment in epilepsy." *Epilepsia* **53**(10): 1690-1699.
- Brazelton, T. R., F. M. Rossi, G. I. Keshet and H. M. Blau (2000). "From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice." *Science* **290**(5497): 1775-1779.
- Campbell, K. H., J. McWhir, W. A. Ritchie and I. Wilmut (1996). "Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line." *Nature* **380**(6569): 64-66.
- Carney, B. J. and K. Shah (2011). "Migration and fate of therapeutic stem cells in different brain disease models." *Neuroscience* **197**: 37-47.
- Carpentino, J. E., N. W. Hartman, L. B. Grabel and J. R. Naegele (2008). "Region-specific differentiation of embryonic stem cell-derived neural progenitor transplants into the adult mouse hippocampus following seizures." *J Neurosci Res* **86**(3): 512-524.
- Cavalheiro, E. A., J. P. Leite, Z. A. Bortolotto, W. A. Turski, C. Ikonomidou and L. Turski (1991). "Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures." *Epilepsia* **32**(6): 778-782.

Capítulo I

Introdução

1. EPILEPSIA

Estima-se que a incidência da epilepsia atinja cerca de 1% da população nos países desenvolvidos e cerca de 2% nos países em desenvolvimento, apesar das dificuldades metodológicas para a determinação e obtenção de dados acerca desta doença (Sander and Hart 1999, Engel 2001). Atualmente o tratamento medicamentoso das epilepsias é essencialmente sintomático, visando primariamente o controle das crises através de fármacos antiepilépticos. No entanto, aproximadamente 30% dos pacientes não respondem a esta terapêutica, tornando-se refratários ao tratamento (Loscher 2002).

A epilepsia compreende uma ampla categoria de síndromes caracterizadas por crises espontâneas e recorrentes resultantes de um disparo intenso, sincronizado e rítmico de populações neuronais no sistema nervoso central (SNC) e de excitabilidade excessiva, na ausência de condição tóxica-metabólica ou febril (Gastaut 1973, Rogawski and Porter 1990, McNamara 1994). Fatores causais, tais como predisposição individual, presença de lesão cerebral ou alterações bioquímicas ou elétricas no cérebro podem estar envolvidos no desenvolvimento da epilepsia (Guerreiro, Guerreiro et al. 2000).

1.1 EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL (ELT)

Entre as epilepsias refratárias ao tratamento medicamentoso, aquelas com origem no lobo temporal são as mais frequentes (Valério 1995, Blumcke, Beck et al. 1996, Yacubian 1998). A epilepsia do lobo temporal (ELT) é caracterizada clinicamente pelo desenvolvimento gradativo de crises espontâneas e recorrentes (CERs) – crises parciais complexas, com ou sem generalização secundária associada a progressiva perda neuronal e declínio do desempenho cognitivo, independentemente da doença subjacente. Na maioria das vezes, antes da apresentação de CERs, os pacientes experimentam crises convulsivas febris prolongadas na infância ou outros danos iniciais nos primeiros anos de vida, seguido de período livre de crises que perdura por um longo tempo. Alguns estudos sugerem que essas crises convulsivas febris prolongadas possam estar envolvidas com o desenvolvimento da ELT (Dube, Brewster et al. 2009).

Em um estudo foi mostrado diferenças fenotípicas entre os hipocampos de pacientes com epilepsia mesial do lobo temporal que apresentaram crises convulsivas febris e os que não apresentaram essas crises durante a infância, como por exemplo, maior perda neuronal no hipocampo dos pacientes que apresentaram essas crises anteriormente (Bando, Alegro et al. 2011). As crises do lobo temporal frequentemente iniciam-se entre os 5-10 anos de vida, quando respondem aos fármacos anti-epilépticos, mas recorrem durante a adolescência, ou mais tarde, quando, em geral, passam a não mais responder adequadamente ao tratamento medicamentoso (Engel 1996).

As crises do lobo temporal tendem a seguir uma sequência de eventos relativamente fixa. Um fenômeno clínico bastante comum nos pacientes com ELT é a presença da aura na fase ictal, ou seja, imediatamente antes do início de uma crise parcial complexa. Esta consiste de uma sensação de mal epigástrico ascendente, sensações dismnésticas (déjà vu) e psíquicas – medo súbito desproposital, alucinações olfatórias e gustativas. As manifestações decorrentes das crises parciais complexas, que geralmente duram 1 a 2 minutos, iniciam com parada de atividade, olhar fixo não responsivo, postura distônica, automatismos oroalimentares e motores estereotipados. Após a remissão da crise, o paciente pode apresentar desorientação, amnésia do evento, déficit de memória recente e afasia. Uma avaliação neuropsicológica do paciente com ELT pode revelar distúrbios de memória. Esta disfunção é proporcional ao grau de atrofia das estruturas mesiais, sobretudo do hipocampo (Yacubian 1998).

Na maioria das ELT há comprometimento das estruturas mesiais do lobo temporal, estabelecendo-se a esclerose mesial temporal (EMT) (Leite and Cavalheiro 1998). As principais modificações fisiopatológicas da EMT incluem morte neuronal, gliose reativa, brotamentos de colaterais axônicas das células granulares (fibras musgosas) na região da camada molecular interna do giro denteado, alterações na morfologia e localização dos dendritos, e neurogênese na camada subgranular do giro denteado (Blumcke, Beck et al. 1999, Blumcke, Thom et al. 2002, Guedes, Galvis-Alonso et al. 2006). Alguns pacientes com ELT, também, podem apresentar esclerose do lobo temporal associada com a esclerose hipocampal. A ELT com a esclerose do hipocampo é frequentemente associada com comprometimento da memória (Motamedi e Meador, 2003). Em um estudo foi verificado

que, aproximadamente, 11% dos pacientes com esclerose hipocampal eram acompanhados de esclerose do lobo temporal, sugerindo que este processo seja acompanhado de uma displasia re-organizacional e uma extensão da EMT como uma patologia separada (Thom, Eriksson et al. 2009).

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

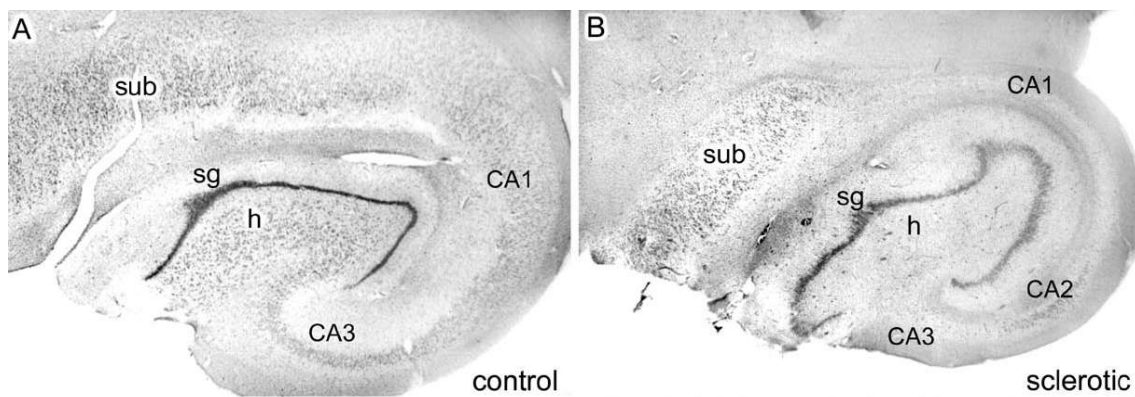


Figura 1. Figura comparativa entre hipocampo humano normal e esclerótico. A) Espécimen de autópsia controle mostrando hipocampo humano normal. B) Esclerose hipocampal em Espécimen cirúrgico, com perda neuronal extensiva no hilo (h) e nas áreas de CA3 e CA1, e sobrevivência de neurônios de CA2 e subiculares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

Existem teorias que tentam explicar como a estrutura hipocampal está envolvida com o início das CERs, sendo que a morte das células musgosas da região hilar parece ser um mecanismo fundamental para o quadro epileptogênico. A teoria das “células em cesto

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

1.2 MODELOS EXPERIMENTAIS DE EPILEPSIA

Foram desenvolvidos diversos modelos animais de epilepsia ou de crises epilépticas. Os principais induzem uma cascata de eventos moleculares e estruturais que resultam em modificações nas propriedades neuronais intrínsecas, bem como nas redes neuronais, tornando-as epileptogênicas. Nos modelos denominados agudos, o animal apresenta crises convulsivas somente durante a ação do agente indutor, enquanto que nos modelos ditos crônicos as crises ocorrem a intervalos variados de tempo após a indução, podendo acompanhar toda a vida do animal (Cavalheiro, Leite et al. 1991, Sanabria and Cavalheiro 2000). Dentre os modelos crônicos de epilepsia sintomática incluem os modelos nos quais a epilepsia é induzida por métodos químicos ou elétricos em animais previamente saudáveis (Kandratavicius, Balista et al. 2014). Já os modelos genéticos empregam animais com mutações espontâneas ou animais transgênicos e *knockout* para o desenvolvimento da epilepsia (Suzuki 2004).

Os principais modelos experimentais de epilepsia do lobo temporal envolvem condições nas quais a epilepsia é consequência de um dano encefálico induzido por um episódio agudo de *status epilepticus* (SE), este podendo ser desencadeado através da aplicação de convulsivantes químicos, como pilocarpina (PILO) ou ácido caínico (KA), e pode durar várias horas (Cavalheiro, Riche et al. 1982, Leite, Bortolotto et al. 1990). O

dano cerebral induzido pelo SE nos animais pode ser considerado equivalente à uma injúria precipitante inicial vista em pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial, a qual geralmente é apresentada como crise febril prolongada (Mathern, Babb et al. 1996). Nesses modelos, o SE é interrompido depois de determinado tempo e é seguido de um período latente variável (Leite, Garcia-Cairasco et al. 2002). Após o período latente, inicia-se a fase crônica, que se caracteriza pela ocorrência de crises espontâneas e recorrentes, as quais podem persistir por toda a vida (Coulter, McIntyre et al. 2002). Assim, em geral, estes modelos reproduzem melhor a epilepsia humana, porque apresentam CERs precedidas por uma fase de latência e alterações neuropatológicas semelhantes àquelas encontradas em indivíduos com ELT. Os avanços tecnológicos permitiram estudos funcionais/metabólicos do cérebro, tais como os exames de tomografia por emissão de pósitrons (PET, do inglês *Positron Emission Tomography*) utilizando a flúor-desoxiglicose marcada com Flúor-18 (^{18}F -FDG) que permite visualizar a atividade metabólica cerebral utilizando equipamentos de microPET para animais de pequeno porte (Mirrione, Schiffer et al. 2007). Esta técnica tem sido utilizada na investigação das alterações metabólicas no cérebro de vários distúrbios cerebrais, incluindo a epilepsia e doenças neurodegenerativas, e podem agora ser avaliados em animais de pequeno porte (Goffin, Bormans et al. 2008, Guo, Gao et al. 2009, Jupp, Williams et al. 2012, Lee, Park et al. 2012, Choi, Kim et al. 2014, Zimmer, Parent et al. 2014).

Tanto na epilepsia do lobo temporal humana quanto em modelos experimentais de epilepsia crônica, a perda progressiva de neurônios correlaciona-se com o acometimento de estruturas importantes na memória e aprendizagem, comprometendo estas funções (Sarkisian, Tandon et al. 1997). Evidências clínicas, complementadas por estudos pré-clínicos sugerem que há um grande déficit cognitivo após o SE, inferido através de medidas de aprendizagem ou memória. Em particular, há relatos do comprometimento tanto da memória explícita, quanto da memória implícita (Liu, Gatt et al. 1994, Holmes 1997). A propagação das crises a partir dos focos epilépticos para as áreas adjacentes é acompanhada por vários sintomas comportamentais e cognitivos, uma vez que várias das regiões responsáveis por essas funções são afetadas na ELT (Vlooswijk, Jansen et al. 2010, Braakman, van der Kruijs et al. 2012).

O hipocampo é uma região vital para as funções de memória, cognição, depressão e humor (Deng, Aimone et al. 2010, Samuels e Hen 2011), sendo a região mais afetada pela epilepsia do lobo temporal. Desta perspectiva, estratégias de intervenção que são eficientes para prevenir ou restringir a progressão da lesão na memória, disfunção de humor e desenvolvimento da epilepsia crônica possui imenso valor. As intervenções terapêuticas ideais são aquelas capazes de promover neurogênese com a incorporação adequada de novos neurônios nos circuitos hipocampais danificados (Shetty 2014). Esses requisitos são importantes porque a neurogênese do hipocampo desempenha papéis vitais na formação de memórias dependentes do hipocampo e a manutenção da função humoral (Deng, Aimone et al. 2010, Snyder, Soumier et al. 2011). Assim como, a probabilidade de que a neurogênese anormal segue após a lesão e contribui para uma reorganização sináptica aberrante no hipocampo, bem como, disfunções de memória e humor, e o desenvolvimento da ELT crônica (Scharfman e Gray 2007, Shetty 2014).

1.2.1 Modelo Experimental de Epilepsia Induzida por Pilocarpina

Dentre os modelos farmacológicos disponíveis, o da epilepsia induzida por pilocarpina (PILO; um agonista colinérgico muscarínico) é um dos que mais se aproxima da ELT. Inicialmente descrito por Turski e colaboradores (Turski, Cavalheiro et al. 1983), este modelo crônico de epilepsia tem sido utilizado com o intuito de avaliar os mecanismos envolvidos na epilepsia da infância bem como as consequências imediatas e tardias das crises epiléticas. Este modelo reproduz as condições necessárias para a indução de uma sintomatologia semelhante àquela observada durante uma crise epilética, bem como alterações morfológicas idênticas às observadas em tecido epilético humano (Cavalheiro, Leite et al. 1991).

Extraída das folhas das plantas sul-americanas *Pilocarpus jaborandi* e *Pilocarpus microphyllus*, a PILO é um alcalóide que induz um estado comportamental crônico que parece depender da facilitação de descargas em salva em neurônios hipocampais, por meio do bloqueio de correntes iônicas de potássio, que são dependentes da ativação muscarínica (M) (Sanabria e Cavalheiro 2000). A partir da ativação de muitos neurônios durante o SE

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

O modelo de pilocarpina é amplamente utilizado em uma série de estudos. Dependendo dos objetivos dos experimentos, são usadas diferentes dosagens de pilocarpina, procedimentos de pré e pós-tratamento, e também, diversas linhagens de animais (Curia, Longo et al. 2008). Ao receber PILO, os animais ficam em SE duradouro de, no mínimo, 30 minutos. Os ratos apresentam crises epiléticas de intensidade variável, caracterizadas por imobilidade, tremor, automatismo bucofaciais, abalos de extremidades, ataxia e crises tônico-clônicas. Esta crise aguda é seguida por um período latente, com normalização progressiva do EEG, sendo uma fase em que o animal permanece sem crises comportamentais e que dura em média 14 a 25 dias. A partir daí, surgem crises epiléticas espontâneas recorrentes, caracterizando a fase crônica (Leite, Bortolotto et al. 1990, Cavalheiro, Leite et al. 1991). Neste modelo, a perda neuronal está localizada principalmente nas regiões do hipocampo, córtex piriforme e entorrinal, tálamo, amígdala e neocórtex (Turski, Cavalheiro et al. 1983). Além disso, a extensão da lesão hipocampal está diretamente relacionada com a duração do SE (Lemos e Cavalheiro 1995).

1.2.2 Modelo experimental de Epilepsia Induzida por Ácido Caínico (KA)

O ácido cainico (KA) é um análogo de L-glutamato e um agonista de receptores de cainato ionotrópicos extraído de algas vermelhas (*Digenea simplex*) encontradas em águas tropicais e subtropicais. Assim como o modelo da pilocarpina, o modelo de epilepsia induzida pelo KA também é amplamente utilizado para o estudo da ELT (Levesque e Avoli 2013) e foi um dos primeiros compostos utilizados para modelar ELT em roedores (Sharma, Reams et al. 2007). A administração sistêmica ou intracerebral de KA causa despolarização neuronal, principalmente no hipocampo, conseqüentemente dando origem

às crises epilépticas (Ben-Ari, Lagowska et al. 1979, Cavalheiro, Riche et al. 1982, Hellier, Patrylo et al. 1998).

Os animais submetidos a injeção de KA apresentam crises espontâneas e recorrentes, com generalização secundária na maioria das vezes e freqüência variável, e geralmente acompanhada de esclerose hipocampal (Raedt, Van Dycke et al. 2009). As crises comportamentais são muito similares àquelas apresentadas no modelo da pilocarpina, com três fases típicas da epilepsia: fase aguda, fase latente e fase crônica (Leite, Garcia-Cairasco et al. 2002). Para a indução de SE por injeção de KA sistêmica, os animais geralmente recebem doses graduais via intraperitoneal (Rao, Hattiangady et al. 2006, Hattiangady e Shetty 2010), e doses menores para a administração intracerebral (Shetty, Zaman et al. 2005).

Os animais apresentam crises epilépticas de intensidade variável, caracterizadas por imobilidade, tremor, automatismo bucofaciais, abalos de extremidades, ataxia e crises tônico-clônicas, mais uma vez semelhante ao modelo da pilocarpina. Esta crise aguda é seguida por um período latente, com normalização progressiva do EEG (eletroencefalograma), sendo uma fase em que o animal permanece sem crises comportamentais e que dura em média 30 a 60 dias. A partir daí, surgem crises epilépticas espontâneas recorrentes, caracterizando a fase crônica do modelo (Rao, Hattiangady et al. 2006, Hattiangady e Shetty 2008).

1.3 DEPRESSÃO NA EPILEPSIA

A depressão representa uma das comorbidades mais comuns em pacientes com epilepsia (Kanner 2003). Embora os aspectos psicossociais desses pacientes possam contribuir para a depressão associada à epilepsia, existe um consenso crescente de que esta condição tem base neurobiológica (Kanner 2005). Evidências clínicas e experimentais sugerem que os desequilíbrios em tais neurotransmissores como GABA, glutamato, norepinefrina e serotonina, os quais são comumente observados em pacientes com epilepsia, podem contribuir para o desenvolvimento da depressão (Kanner 2006,

Kondziella, Alvestad et al. 2007). Um estudo clínico enfatizou deficiências similares no funcionamento do sistema adrenocortical hipotalâmico pituitário em pacientes com epilepsia e aqueles com depressão (Zobel, Barkow et al. 2004). Alguns relatos clínicos têm implicado a neurodegeneração ou disfunção do hipocampo no desenvolvimento de depressão em pacientes com epilepsia (Gilliam, Maton et al. 2007, Shamim, Hasler et al. 2009).

O estabelecimento e a validação de modelos animais que apresentem essa comorbidade na epilepsia são fundamentais para a compreensão dos mecanismos dessa condição, e para o desenvolvimento pré-clínico de novas terapias. A depressão tem sido descrita em alguns modelos de epilepsia experimental (Sarkisova, Midzianovskaia et al. 2003, Jones, Salzberg et al. 2008, Mazarati, Siddarth et al. 2008). De fato, vários medicamentos antiepiléticos, podem causar comportamento depressivo, enquanto alguns antidepressivos aumentam o risco de crises, particularmente em situações de overdose (Hesdorffer e Kanner 2009). A intervenção cirúrgica da epilepsia pode ser uma eficiente opção para estes pacientes, mas a remoção da área epileptogênica pode determinar eventual perda de funções cerebrais limitando o número de pacientes que podem receber este tratamento (Paglioli, Palmini et al. 2004, Paglioli, Palmini et al. 2006). Dentro desse panorama, torna-se fundamental que sejam estudadas e disponibilizadas novas alternativas terapêuticas, entre elas a terapia com células-tronco.

1.4 TERAPIA CELULAR

As células-tronco (CT) 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 autorregenerar, quanto de se diferenciar através de uma determinada via molecular e originar diferentes linhagens celulares (Figura 2) (Morrison, Shah et al. 1997).

As células-tronco são em geral classificadas como células-tronco embrionárias e células-tronco adultas ou somáticas. As células-tronco embrionárias são derivadas do

blastocisto e são consideradas pluripotentes, isto é, têm a capacidade de originar células derivadas das três camadas germinativas: mesoderma, endoderma e ectoderma. Já as células-tronco adultas ou somáticas são células indiferenciadas que, no entanto, se encontram em tecidos diferenciados (especializados). Essas células são responsáveis pelo reabastecimento tecidual ao longo da vida e estão presentes na maioria dos tecidos, tais como, o sangue, a pele, o fígado, o coração e o cérebro (Morrison, Shah et al. 1997, Kaji e Leiden 2001).

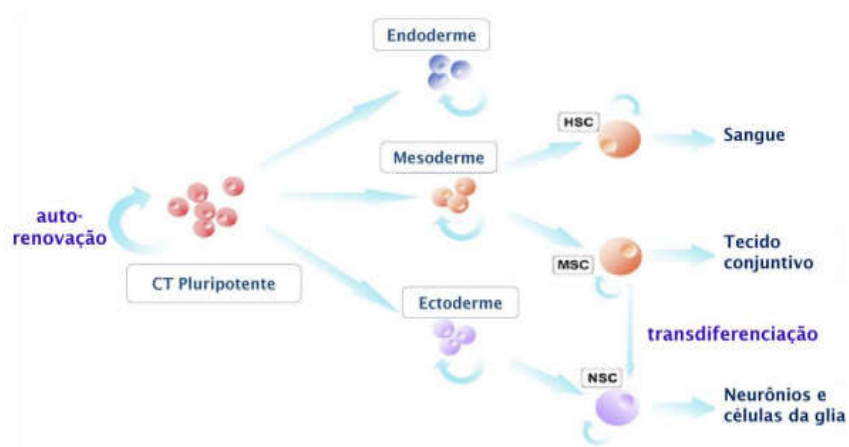


Figura 2. Modelo da diferenciação das células-tronco. A partir de uma célula pluripotente, as células-tronco perdem gradualmente seu potencial de diferenciação. Células-tronco multipotentes têm potencial de transdiferenciação em linhagem neuronal. HSC: célula-tronco hematopoiética; MSC: célula-tronco mesenquimal; NSC: célula-tronco neural. Adaptado de Carney e Shah, 2011 (Carney e Shah 2011).

Como resultado do progresso contínuo do conhecimento a respeito da capacidade regenerativa do sistema nervoso e do potencial terapêutico das células-tronco, houve um grande aumento no interesse em se estudar estratégias baseadas em terapia celular para o tratamento de doenças neurológicas (Figura 3). A hipótese se baseia na ideia de que, uma vez introduzidas no SNC, essas células poderiam promover a reposição das células perdidas durante o curso da doença ou ainda modular a regeneração endógena e cascatas inflamatórias através da expressão de fatores tróficos.

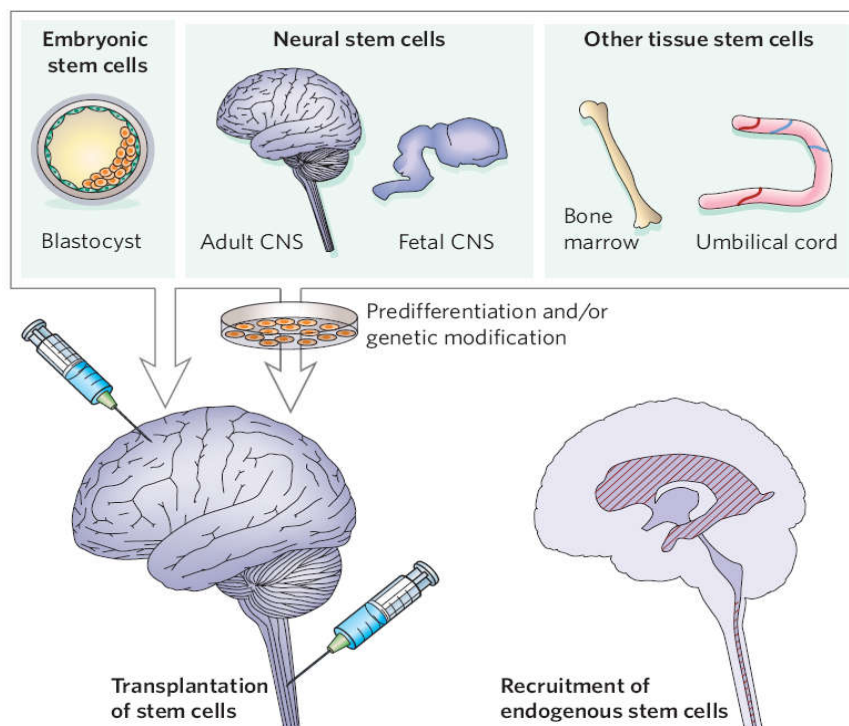


Figura 3. Aplicação de células tronco no SNC. As células-tronco seriam isoladas e transplantadas no cérebro doente ou medula espinhal, diretamente ou após pré-diferenciação em cultura para tipos específicos de neurônios e células gliais (Lindvall e Kokaia 2006).

Dois tecidos amplamente utilizados para a coleta de células-tronco adultas são a medula óssea e o sangue de cordão umbilical. Nestes tecidos, as células-tronco são encontradas na fração mononuclear que, após separadas das demais células, apresentam a importante característica de expressarem marcadores de células indiferenciadas (Kobylka, Ivanyi et al. 1998).

Recentemente, estudos têm demonstrado que o transplante de células-tronco tem melhorado a função em modelos experimentais de acidentes vasculares cerebrais (Haas, Weidner et al. 2005), doença de Parkinson (Kim, Auerbach et al. 2002), doença de Huntington (Dunnett e Rosser 2004), traumatismo raquimedular (Koda, Okada et al. 2005, Kaminski, Falavigna et al. 2013), esclerose lateral amiotrófica (Venturin, Greggio et al. 2016), hipóxia-isquemia (de Paula, Vitola et al. 2012, Greggio, de Paula et al. 2014) e epilepsia (Venturin, Greggio et al. 2011, Costa-Ferro, Souza et al. 2012).

1.4.1 Células-tronco da medula óssea (CTMO)

A MO é uma fonte permanente de células-tronco e contém três tipos de populações: células-tronco hematopoiéticas (CTH), células-tronco mesenquimais (CTM) e possivelmente progenitoras endoteliais (Korbling e Estrov 2003). Já foi demonstrado que as células da MO podem dar origem, *in vivo*, a células de outras linhagens como microglia e neurônios (Eglitis, Dawson et al. 1999, Brazelton, Rossi et al. 2000, Mezey, Chandross et al. 2000). A incorporação destas células no tecido nervoso parece ser intensificada frente a um dano tecidual. Ainda, mesmo que estas células não regenerem o tecido lesado por diferenciação em determinado tipo celular, é provável que a recuperação de funções cerebrais ou estabilização da doença neurológica ocorra por outros mecanismos biológicos, tais como, a liberação de citocinas, ativação de células endógenas ou expressão/modulação de fatores tróficos. Além disso, as células-tronco da MO têm se mostrado eficazes em muitos estudos com modelos experimentais de inúmeras doenças do sistema nervoso, como em lesões da medula espinhal (Koda, Okada et al. 2005), acidentes vasculares cerebrais (Haas, Weidner et al. 2005), doença de Parkinson (Levy, Bahat-Stroomza et al. 2008) e também na epilepsia (Costa-Ferro, Vitola et al. 2010, Venturin, Greggio et al. 2011, Costa-Ferro, Souza et al. 2012, Zanirati, Azevedo et al. 2015).

A fração de células mononucleares da medula óssea (CMMO) utilizada como tratamento neste trabalho consiste em diferentes tipos celulares, incluindo monócitos, precursores mesenquimais e endoteliais, que podem ter diferentes potenciais terapêuticos (Costa-Ferro, Souza et al. 2012). Essas células podem ser facilmente obtidas a partir de um pequeno volume de medula óssea do próprio paciente, sem necessidade de serem expandidas em culturas, evitando maiores manipulações. Portanto, as CMMO fornecem uma fonte facilmente acessível de células para a realização de transplantes autólogos, visando a translação deste tratamento na epilepsia.

1.4.2 Células-tronco Pluripotentes Induzidas (iPSC)

A Transferência Nuclear de Células Somáticas (SCNT do inglês *Somatic Cell Nuclear Transfer*), desenvolvida por John Gurdon, em 1962, foi a técnica precursora da reprogramação de células somáticas, mostrando que ovócitos de anfíbios anucleados são capazes de restaurar a pluripotência ao material nuclear extraído de células adultas (Gurdon 1962). Após, a técnica SCNT foi reproduzida em diversos tipos celulares, incluindo humanos e outros mamíferos (Campbell, McWhir et al. 1996, Chesne, Adenot et al. 2002, Chung, Eum et al. 2014, Nityanandam e Baldwin 2015).

A técnica de geração de células pluripotentes através da reprogramação de fibroblastos de camundongos, e após, de células humanas, foi desenvolvida pelos pesquisadores japoneses Kazutoshi Takahashi e Shinya Yamanaka (Takahashi e Yamanaka 2006, Takahashi, Tanabe et al. 2007). Em seus experimentos, os pesquisadores realizaram a reprogramação de células somáticas através da ativação de fatores de transcrição pela transfecção de genes que conferem a pluripotência celular. Estas células foram reprogramadas pela adição de quatro diferentes genes: OCT4, KLF-4, SOX-2, E C-MYC, por meio de vetores virais. As células produzidas por esse método são chamadas de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC do inglês *Induced Pluripotent Stem Cells*) e são muito similares às células-tronco embrionárias (ESC, do inglês *Embryonic Stem Cells*), apresentando as mesmas características de auto renovação e potencial de diferenciação em linhagens dos três folhetos embrionários (Fries, Blieden et al. 1994, Takahashi e Yamanaka 2006). O Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia, no ano de 2012, foi dividido entre os pesquisadores Gurdon e Yamanaka, por apresentaram uma mudança no paradigma referente à compreensão da diferenciação celular e da plasticidade de células diferenciadas (Nityanandam e Baldwin 2015).

Desde então, diversos métodos visando aumentar a eficiência de protocolos de reprogramação, manutenção e diferenciação das iPSC vem sendo aprimorados e desenvolvidos com sucesso, permitindo a geração de vários subtipos celulares *in vitro*. As iPSC podem ser geradas de pacientes portadores de uma determinada doença ou indivíduos saudáveis e, posteriormente, diferenciadas em células adultas específicas. A diferenciação celular a partir das iPSC é considerada uma ferramenta de grande utilidade para a busca de

novas drogas, contando com o desenvolvimento de modelo celular de diversas doenças e terapia celular (Zhang, Zhang et al. 2013).

1.4.2.1 Células-tronco neurais (NSC)

Em particular, um grande número de estudos demonstrou enorme interesse em células-tronco neurais (NSC, do inglês, *Neural Stem Cells*) por elas poderem ser geradas a partir de diferentes tipos de células, como ESC e iPSC ou ainda, por poderem ser obtidas a partir de regiões do cérebro adulto em desenvolvimento (Hattiangady e Shetty 2011, Hattiangady e Shetty 2012, Shetty 2012, Shetty 2014) (Figura 4). Muitos estudos recentes demonstraram que as NSCs podem sobreviver a transplantes intracerebrais, serem introduzidas em regiões danificadas do cérebro, secretar fatores neurotróficos, o que influencia na sobrevivência de células hospedeiras e promove recuperação funcional em modelos de doenças neurológicas (Turner e Shetty 2003, Waldau, Hattiangady et al. 2010, Shetty 2011, Shetty 2014, Shetty e Upadhyya 2016, Upadhyya, Hattiangady et al. 2016). Além disso, estudos exploram a possibilidade do uso de NSC como um tratamento prospectivo para contenção de epileptogênese e prevenção do desenvolvimento da ELT crônica, diminuindo a disfunção de humor e memória causados por danos no hipocampo (Chu, Kim et al. 2004, Hattiangady e Shetty 2012).

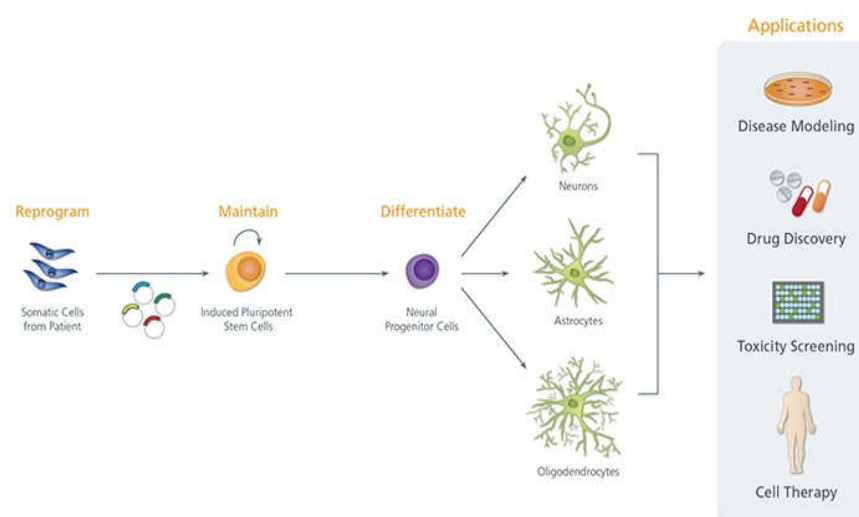


Figura 4. Reprogramação, diferenciação e aplicação das iPSC. Células somáticas adultas podem ser reprogramadas através de genes de transfecção gerando células pluripotentes induzidas (iPSC). As iPSC podem ser diferenciadas em diversos tipos celulares, incluindo células progenitoras neurais, estas podendo se diferenciar em diferentes linhagens neuronais, bem como astrócitos e oligodendrócitos. Essas células neurodiferenciadas podem ser utilizadas para diferentes finalidades como geração de modelos celulares de diversas patologias, busca por novos fármacos, avaliação da toxicidade e para o uso como terapia celular no tratamento de diferentes doenças. Fonte: Stem Cell Technologies.

1.4.3 Terapia celular na epilepsia

Na epilepsia, a exemplo de outros distúrbios do sistema nervoso central, há perda de sub-populações neuronais, o que representa uma consequência importante na patogenia da doença. Esta observação vem estimulando a pesquisa que objetiva repor os neurônios perdidos durante o processo da doença, bem como os mediadores fisiológicos que eles produzem (DaCosta 2012). Nos últimos anos, um grande número de abordagens alternativas usando diferentes terapias celulares vem sendo estudado e mostrando inúmeros efeitos benéficos no tratamento da epilepsia (Shetty e Hattiangady 2007, Acharya, Hattiangady et al. 2008, Shetty 2011), tais como células GABAérgicas (Gernert, Thompson et al. 2002, Thompson 2009, Cunningham, Cho et al. 2014, Shetty e Upadhy 2016), neurônios/progenitores neurais derivados de células-tronco embrionárias (Ruschenschmidt, Koch et al. 2005, Carpentino, Hartman et al. 2008), células precursoras estriatais (Hattiangady, Rao et al. 2008), células-tronco/fetais hipocampais (Rao, Hattiangady et al. 2006, Rao, Hattiangady et al. 2007, Shen, Liu et al. 2010), células mononucleares da medula óssea (CMMO) (Costa-Ferro, Vitola et al. 2010, Venturin, Greggio et al. 2011, Costa-Ferro, Souza et al. 2012, Leal, Costa-Ferro et al. 2014, Zanirati, Azevedo et al. 2015), células-tronco mesenquimais (CTM) (Li, Ren et al. 2009, Abdanipour, Tiraihi et al. 2011, Long, Qiu et al. 2013), células-tronco neurais (Chu, Kim et al. 2004, Jing, Shingo et al. 2009, Hattiangady, Kuruba et al. 2010, Waldau, Hattiangady et al. 2010, Hattiangady e Shetty 2012, Miltiadous, Kouroupi et al. 2013, Hattiangady, Bates et al. 2015), entre outros tipos celulares.

O nosso grupo de pesquisa vem explorando e demonstrando um eficaz potencial terapêutico das células mononucleares da medula óssea no modelo experimental de

epilepsia induzida por pilocarpina. Em nosso laboratório, demonstrou-se que a administração de CMMO em animais com epilepsia aguda impede o aparecimento de CERs em curto prazo, bem como diminui a frequência de crises quando os mesmos animais são avaliados 120 dias após o transplante (Costa-Ferro, Vitola et al. 2010). Adicionalmente, verificou-se a preservação da densidade de neurônios hipocampais, bem como das sinapses na colateral hipocampal de Schaeffer, nos animais que receberam tratamento celular quando comparados com controles epiléticos não-tratados. Ainda, em estudos subsequentes, demonstramos que há diminuição da frequência de crises não somente quando os animais são tratados no período agudo da doença, mas também quando o transplante é feito durante o período crônico (Venturin, Greggio et al. 2011, Costa-Ferro, Souza et al. 2012). As CMMO também revertem o déficit cognitivo associado ao modelo da pilocarpina (Venturin, Greggio et al. 2011), além de proteger contra a perda neuronal e gliose reativa relacionadas ao modelo de epilepsia estudado (Costa-Ferro, Vitola et al. 2010, Costa-Ferro, Souza et al. 2012).

Entretanto, as células administradas foram raramente encontradas no encéfalo dos animais transplantados, sugerindo que o mecanismo responsável pela prevenção das crises, pela redução da perda neuronal e pela reorganização da rede hipocampal não esteja relacionado à diferenciação direta das células imaturas transplantadas em células nervosas. Dados obtidos pelo nosso grupo indicam que entre os mecanismos de ação das CMMO podem estar relacionados com a modulação da resposta inflamatória, alterando os níveis de citocinas como IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10, bem como com a modulação da expressão de fatores tróficos BDNF, GDNF, NGF, VEGF e TGF- β 1 (Costa-Ferro, Souza et al. 2012, Leal, Costa-Ferro et al. 2014, Zanirati, Azevedo et al. 2015). Recentemente, foi demonstrado que o transplante autólogo de CMMO em pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial apresentou redução das crises recorrentes e uma melhora significativa da memória, além de evidenciar também, a segurança do tratamento (DaCosta, Portuguese et al. 2016).

Além da avaliação do efeito terapêutico da administração de células-tronco em modelos experimentais de epilepsia, estudos vêm evidenciando a utilização de sistemas de imagem não-invasivos, como o microPET afim de verificar as repercussões *in vivo* do

transplante dessas células. Esse sistema permite que se visualize e quantifique dados moleculares funcionais *in vivo* em animais de pequeno porte, e tem sido amplamente utilizado na investigação de aspectos relacionados à terapia celular na epilepsia, especificamente no modelo da pilocarpina.

A utilização das iPSCs para compreensão dos mecanismos das epilepsias e para futuras aplicações terapêuticas está evoluindo rapidamente e se tornando uma estratégia singular. Modelos *in vitro* de iPSC são de valor significativo para investigar novos compostos farmacológicos para diversas doenças neurológicas, incluindo a epilepsia. Adicionalmente, proporcionam uma alternativa terapêutica com um grande potencial para o tratamento da epilepsia do lobo temporal, uma vez que possuem a capacidade de gerar células-tronco neurais, progenitores neurais e tipos específicos de neurônios, os quais podem se integrar e reparar o sistema nervoso epiléptico. Avanços em várias áreas ainda são necessários para impactar significativamente o desenvolvimento de pesquisas na epilepsia e a terapia celular utilizando estas abordagens, porém células derivadas de iPSCs de pacientes com epilepsia têm demonstrado potencial para revelar subjacentes mecanismos envolvidos na doença e identificar potenciais tratamentos (Du e Parent 2015, Parent e Anderson 2015, Tidball e Parent 2016). Outra abordagem para utilização de iPSC na epilepsia é o seu uso para a terapia celular através do transplante de células-tronco neurais derivadas de iPSC em modelos animais e a posterior avaliação dos seus efeitos terapêuticos diretamente no cérebro lesionado, acompanhando assim, a integração dessas células em redes de desenvolvimento e maturação *in vivo*.

Além da sua capacidade para modelar a patologia molecular e celular da epilepsia, as iPSCs humanas são uma grande promessa terapêutica como fonte autóloga de material para terapia celular para o tratamento das epilepsias (Southwell, Nicholas et al. 2014). Os estudos envolvendo a utilização de iPSC para o tratamento da epilepsia em modelos experimentais, geralmente, diferenciam as iPSC em células-tronco neurais e/ou progenitoras neurais e estas são transplantadas no cérebro de animais com epilepsia. Estes estudos buscam explorar a sobrevivência, migração e integração dessas células no sistema nervoso, para posteriormente, avaliar os benefícios terapêuticos (Hattiangady and Shetty 2012, Shetty 2014). Assim como, outros estudos demonstram grande potencial na

utilização de interneurônios derivadas de iPSC de pacientes para o tratamento das epilepsias (Zipancic, Calcagnotto et al. 2010, Maisano, Litvina et al. 2012, Shetty e Upadhy 2016).

2. REFERÊNCIAS

- Abdanipour, A., T. Tiraihi and J. Mirnajafi-Zadeh (2011). "Improvement of the pilocarpine epilepsy model in rat using bone marrow stromal cell therapy." *Neurol Res* **33**(6): 625-632.
- Acharya, M. M., B. Hattiangady and A. K. Shetty (2008). "Progress in neuroprotective strategies for preventing epilepsy." *Prog Neurobiol* **84**(4): 363-404.
- Bando, S. Y., M. C. Alegro, E. Amaro, Jr., A. V. Silva, L. H. Castro, H. T. Wen, A. Lima Lde, H. Brentani and C. A. Moreira-Filho (2011). "Hippocampal CA3 transcriptome signature correlates with initial precipitating injury in refractory mesial temporal lobe epilepsy." *PLoS One* **6**(10): e26268.
- Ben-Ari, Y., J. Lagowska, E. Tremblay and G. Le Gal La Salle (1979). "A new model of focal status epilepticus: intra-amygdaloid application of kainic acid elicits repetitive secondarily generalized convulsive seizures." *Brain Res* **163**(1): 176-179.
- Blumcke, I., H. Beck, A. A. Lie and O. D. Wiestler (1999). "Molecular neuropathology of human mesial temporal lobe epilepsy." *Epilepsy Res* **36**(2-3): 205-223.
- Blumcke, I., H. Beck, B. Scheffler, P. R. Hof, J. H. Morrison, H. K. Wolf, J. Schramm, C. E. Elger and O. D. Wiestler (1996). "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* **92**(6): 576-587.
- Blumcke, I., M. Thom and O. D. Wiestler (2002). "Ammon's horn sclerosis: a maldevelopmental disorder associated with temporal lobe epilepsy." *Brain Pathol* **12**(2): 199-211.
- Braakman, H. M., S. J. van der Kruijs, M. J. Vaessen, J. F. Jansen, M. H. Debeij-van Hall, J. S. Vles, A. P. Aldenkamp, W. H. Backes and P. A. Hofman (2012). "Microstructural and functional MRI studies of cognitive impairment in epilepsy." *Epilepsia* **53**(10): 1690-1699.
- Brazelton, T. R., F. M. Rossi, G. I. Keshet and H. M. Blau (2000). "From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice." *Science* **290**(5497): 1775-1779.
- Campbell, K. H., J. McWhir, W. A. Ritchie and I. Wilmut (1996). "Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line." *Nature* **380**(6569): 64-66.
- Carney, B. J. and K. Shah (2011). "Migration and fate of therapeutic stem cells in different brain disease models." *Neuroscience* **197**: 37-47.
- Carpentino, J. E., N. W. Hartman, L. B. Grabel and J. R. Naegele (2008). "Region-specific differentiation of embryonic stem cell-derived neural progenitor transplants into the adult mouse hippocampus following seizures." *J Neurosci Res* **86**(3): 512-524.
- Cavalheiro, E. A., J. P. Leite, Z. A. Bortolotto, W. A. Turski, C. Ikonomidou and L. Turski (1991). "Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures." *Epilepsia* **32**(6): 778-782.

- Cavalheiro, E. A., D. A. Riche and G. Le Gal La Salle (1982). "Long-term effects of intrahippocampal kainic acid injection in rats: a method for inducing spontaneous recurrent seizures." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **53**(6): 581-589.
- Chesne, P., P. G. Adenot, C. Viglietta, M. Baratte, L. Boulanger and J. P. Renard (2002). "Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells." Nat Biotechnol **20**(4): 366-369.
- Choi, H., Y. K. Kim, H. Kang, H. Lee, H. J. Im, D. W. Hwang, E. E. Kim, J. K. Chung and D. S. Lee (2014). "Abnormal metabolic connectivity in the pilocarpine-induced epilepsy rat model: a multiscale network analysis based on persistent homology." Neuroimage **99**: 226-236.
- Chu, K., M. Kim, K. H. Jung, D. Jeon, S. T. Lee, J. Kim, S. W. Jeong, S. U. Kim, S. K. Lee, H. S. Shin and J. K. Roh (2004). "Human neural stem cell transplantation reduces spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus in adult rats." Brain Res **1023**(2): 213-221.
- Chung, Y. G., J. H. Eum, J. E. Lee, S. H. Shim, V. Sepilian, S. W. Hong, Y. Lee, N. R. Treff, Y. H. Choi, E. A. Kimbrel, R. E. Dittman, R. Lanza and D. R. Lee (2014). "Human somatic cell nuclear transfer using adult cells." Cell Stem Cell **14**(6): 777-780.
- Costa-Ferro, Z. S., B. S. Souza, M. M. Leal, C. M. Kaneto, C. M. Azevedo, I. C. da Silva, M. B. Soares, R. Ribeiro-dos-Santos and J. C. Dacosta (2012). "Transplantation of bone marrow mononuclear cells decreases seizure incidence, mitigates neuronal loss and modulates pro-inflammatory cytokine production in epileptic rats." Neurobiol Dis **46**(2): 302-313.
- Costa-Ferro, Z. S., A. S. Vitola, M. F. Pedroso, F. B. Cunha, L. L. Xavier, D. C. Machado, M. B. Soares, R. Ribeiro-dos-Santos and J. C. DaCosta (2010). "Prevention of seizures and reorganization of hippocampal functions by transplantation of bone marrow cells in the acute phase of experimental epilepsy." Seizure **19**(2): 84-92.
- Coulter, D. A., D. C. McIntyre and W. Loscher (2002). "Animal models of limbic epilepsies: what can they tell us?" Brain Pathol **12**(2): 240-256.
- Cunningham, M., J. H. Cho, A. Leung, G. Savvidis, S. Ahn, M. Moon, P. K. Lee, J. J. Han, N. Azimi, K. S. Kim, V. Y. Bolshakov and S. Chung (2014). "hPSC-derived maturing GABAergic interneurons ameliorate seizures and abnormal behavior in epileptic mice." Cell Stem Cell **15**(5): 559-573.
- Curia, G., D. Longo, G. Biagini, R. S. Jones and M. Avoli (2008). "The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy." J Neurosci Methods **172**(2): 143-157.
- DaCosta, J. C., M. W. Portuguese, D. R. Marinowic, L. P. Schilling, C. M. Torres, D. I. DaCosta, M. J. Carrion, E. F. Raupp, D. C. Machado, R. B. Soder, S. L. Lardi and B. Garicochea (2016). "Safety and Seizure Control in Patients with Mesial Temporal Lobe Epilepsy Treated with Regional Superselective Intra-arterial Injection of Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells." J Tissue Eng Regen Med.
- DaCosta, J. C. e. V., G. T. (2012). Aplicações de Células -Tronco nas Doenças do Sistema Nervoso Central. Células-Tronco - Ciência, Tecnologia e Ética. A. T. F. J. P. d. F. K. S. Ogliari. Rio de Janeiro, Revinter. **1**: 138-173.

- de Paula S, Greggio S, Marinowic DR, Machado DC, Dacosta JC (2012). "The dose-response effect of acute intravenous transplantation of human umbilical cord blood cells on brain damage and spatial memory deficits in neonatal hypoxia-ischemia". Neuroscience. May 17;210:431-41
- Deng, W., J. B. Aimone and F. H. Gage (2010). "New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory?" Nat Rev Neurosci **11**(5): 339-350.
- Du, F., W. O. Whetsell, Jr., B. Abou-Khalil, B. Blumenkopf, E. W. Lothman and R. Schwarcz (1993). "Preferential neuronal loss in layer III of the entorhinal cortex in patients with temporal lobe epilepsy." Epilepsy Res **16**(3): 223-233.
- Du, X. and J. M. Parent (2015). "Using Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells to Model and Treat Epilepsies." Curr Neurol Neurosci Rep **15**(10): 71.
- Dube, C. M., A. L. Brewster and T. Z. Baram (2009). "Febrile seizures: mechanisms and relationship to epilepsy." Brain Dev **31**(5): 366-371.
- Dunnett, S. B. and A. E. Rosser (2004). "Cell therapy in Huntington's disease." NeuroRx **1**(4): 394-405.
- Eglitis, M. A., D. Dawson, K. W. Park and M. M. Mouradian (1999). "Targeting of marrow-derived astrocytes to the ischemic brain." Neuroreport **10**(6): 1289-1292.
- Engel, J., Jr. (1996). "Introduction to temporal lobe epilepsy." Epilepsy Res **26**(1): 141-150.
- Engel, J., Jr. (2001). "A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology." Epilepsia **42**(6): 796-803.
- Fries, K. M., T. Blieden, R. J. Looney, G. D. Sempowski, M. R. Silvera, R. A. Willis and R. P. Phipps (1994). "Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis." Clin Immunol Immunopathol **72**(3): 283-292.
- Gastaut, H. (1973). "Letter: 'Epileptic seizures'." Dev Med Child Neurol **15**(5): 688-689.
- Gernert, M., K. W. Thompson, W. Loscher and A. J. Tobin (2002). "Genetically engineered GABA-producing cells demonstrate anticonvulsant effects and long-term transgene expression when transplanted into the central piriform cortex of rats." Exp Neurol **176**(1): 183-192.
- Gilliam, F. G., B. M. Maton, R. C. Martin, S. M. Sawrie, R. E. Faught, J. W. Hugg, M. Viikinsalo and R. I. Kuzniecky (2007). "Hippocampal 1H-MRSI correlates with severity of depression symptoms in temporal lobe epilepsy." Neurology **68**(5): 364-368.
- Goffin, K., G. Bormans, C. Casteels, B. Bosier, D. M. Lambert, I. D. Grachev, W. Van Paesschen and K. Van Laere (2008). "An in vivo [18F]MK-9470 microPET study of type 1 cannabinoid receptor binding in Wistar rats after chronic administration of valproate and levetiracetam." Neuropharmacology **54**(7): 1103-1106.
- Greggio, S., de Paula, S., Azevedo, P. N., Venturin, G. T. & Dacosta, J. C. (2014). "Intra-arterial transplantation of human umbilical cord blood mononuclear cells in neonatal hypoxicischemic rats". Life sciences **96**, 33-39.

- Guedes, F. A., O. Y. Galvis-Alonso and J. P. Leite (2006). "Plasticidade neuronal associada à epilepsia do lobo temporal mesial: insights a partir de estudos em humanos e em modelos animais." Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology **12**(1): 10-17.
- Guerreiro, C. A. M., M. M. Guerreiro, F. Cendes and I. Lopes-Cendes (2000). Considerações gerais. In: Guerreiro, C. A. M., Guerreiro, M. M., Cendes, F., Lopes-Cendes, I. Epilepsia. Lemos. São Paulo.
- Guo, Y., F. Gao, S. Wang, Y. Ding, H. Zhang, J. Wang and M. P. Ding (2009). "In vivo mapping of temporospatial changes in glucose utilization in rat brain during epileptogenesis: an 18F-fluorodeoxyglucose-small animal positron emission tomography study." Neuroscience **162**(4): 972-979.
- Gurdon, J. B. (1962). "The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles." J Embryol Exp Morphol **10**: 622-640.
- Haas, S., N. Weidner and J. Winkler (2005). "Adult stem cell therapy in stroke." Curr Opin Neurol **18**(1): 59-64.
- Hattiangady, B., A. Bates, S. Shin, B. Shuai, X. Rao, M. C. Vemuri and A. K. Shetty (2015). "hiPSC-derived NSC grafting intervention early after hippocampus injury preserves memory and mood function and reduces the occurrence of seizures." Society for Neuroscience meeting abstracts, Chicago, USA.
- Hattiangady, B., R. Kuruba, V. K. Pahirar and A. K. Shetty (2010). "Intrahippocampal grafting of NSCs after status epilepticus eases both spontaneous seizures & cognitive dysfunction in a rat model of temporal lobe epilepsy." Soc Neurosci Abstr.
- Hattiangady, B., M. S. Rao and A. K. Shetty (2008). "Grafting of striatal precursor cells into hippocampus shortly after status epilepticus restrains chronic temporal lobe epilepsy." Exp Neurol **212**(2): 468-481.
- Hattiangady, B. and A. K. Shetty (2008). "Implications of decreased hippocampal neurogenesis in chronic temporal lobe epilepsy." Epilepsia **49 Suppl 5**: 26-41.
- Hattiangady, B. and A. K. Shetty (2010). "Decreased neuronal differentiation of newly generated cells underlies reduced hippocampal neurogenesis in chronic temporal lobe epilepsy." Hippocampus **20**(1): 97-112.
- Hattiangady, B. and A. K. Shetty (2011). "Neural stem cell grafting in an animal model of chronic temporal lobe epilepsy." Curr Protoc Stem Cell Biol **Chapter 2**: Unit2D 7.
- Hattiangady, B. and A. K. Shetty (2012). "Neural stem cell grafting counteracts hippocampal injury-mediated impairments in mood, memory, and neurogenesis." Stem Cells Transl Med **1**(9): 696-708.
- Hellier, J. L., P. R. Patrylo, P. S. Buckmaster and F. E. Dudek (1998). "Recurrent spontaneous motor seizures after repeated low-dose systemic treatment with kainate: assessment of a rat model of temporal lobe epilepsy." Epilepsy Res **31**(1): 73-84.
- Hesdorffer, D. C. and A. M. Kanner (2009). "The FDA alert on suicidality and antiepileptic drugs: Fire or false alarm?" Epilepsia **50**(5): 978-986.
- Holmes, G. L. (1997). "Epilepsy in the developing brain: lessons from the laboratory and clinic." Epilepsia **38**(1): 12-30.

- Jing, M., T. Shingo, T. Yasuhara, A. Kondo, T. Morimoto, F. Wang, T. Baba, W. J. Yuan, N. Tajiri, T. Uozumi, M. Murakami, M. Tanabe, Y. Miyoshi, S. Zhao and I. Date (2009). "The combined therapy of intrahippocampal transplantation of adult neural stem cells and intraventricular erythropoietin-infusion ameliorates spontaneous recurrent seizures by suppression of abnormal mossy fiber sprouting." Brain Res **1295**: 203-217.
- Jones, N. C., M. R. Salzberg, G. Kumar, A. Couper, M. J. Morris and T. J. O'Brien (2008). "Elevated anxiety and depressive-like behavior in a rat model of genetic generalized epilepsy suggesting common causation." Exp Neurol **209**(1): 254-260.
- Jupp, B., J. Williams, D. Binns, R. J. Hicks, L. Cardamone, N. Jones, S. Rees and T. J. O'Brien (2012). "Hypometabolism precedes limbic atrophy and spontaneous recurrent seizures in a rat model of TLE." Epilepsia **53**(7): 1233-1244.
- Kaji, E. H. and J. M. Leiden (2001). "Gene and stem cell therapies." JAMA **285**(5): 545-550.
- Kaminski, E. L., A. Falavigna, G. T. Venturin, D. Marinowic, P. B. Bagatini, L. L. Xavier and J. C. DaCosta (2013). "Two intrathecal transplants of bone marrow mononuclear cells produce motor improvement in an acute and severe model of spinal cord injury." Coluna/Columna **12**(4): 274-277.
- Kandratavicius, L., P. A. Balista, C. Lopes-Aguiar, R. N. Ruggiero, E. H. Umeoka, N. Garcia-Cairasco, L. S. Bueno-Junior and J. P. Leite (2014). "Animal models of epilepsy: use and limitations." Neuropsychiatr Dis Treat **10**: 1693-1705.
- Kanner, A. M. (2003). "Depression in epilepsy: prevalence, clinical semiology, pathogenic mechanisms, and treatment." Biol Psychiatry **54**(3): 388-398.
- Kanner, A. M. (2005). "Depression in epilepsy: a neurobiologic perspective." Epilepsy Curr **5**(1): 21-27.
- Kanner, A. M. (2006). "Depression and epilepsy: a new perspective on two closely related disorders." Epilepsy Curr **6**(5): 141-146.
- Kim, J. H., J. M. Auerbach, J. A. Rodriguez-Gomez, I. Velasco, D. Gavin, N. Lumelsky, S. H. Lee, J. Nguyen, R. Sanchez-Pernaute, K. Bankiewicz and R. McKay (2002). "Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease." Nature **418**(6893): 50-56.
- Kobylka, P., P. Ivanyi and B. S. Breur-Vriesendorp (1998). "Preservation of immunological and colony-forming capacities of long-term (15 years) cryopreserved cord blood cells." Transplantation **65**(9): 1275-1278.
- Koda, M., S. Okada, T. Nakayama, S. Koshizuka, T. Kamada, Y. Nishio, Y. Someya, K. Yoshinaga, A. Okawa, H. Moriya and M. Yamazaki (2005). "Hematopoietic stem cell and marrow stromal cell for spinal cord injury in mice." Neuroreport **16**(16): 1763-1767.
- Kondziella, D., S. Alvestad, A. Vaaler and U. Sonnewald (2007). "Which clinical and experimental data link temporal lobe epilepsy with depression?" J Neurochem **103**(6): 2136-2152.
- Korbling, M. and Z. Estrov (2003). "Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept?" N Engl J Med **349**(6): 570-582.

Leal, M. M., Z. S. Costa-Ferro, B. S. Souza, C. M. Azevedo, T. M. Carvalho, C. M. Kaneto, R. H. Carvalho, R. R. Dos Santos and M. B. Soares (2014). "Early transplantation of bone marrow mononuclear cells promotes neuroprotection and modulation of inflammation after status epilepticus in mice by paracrine mechanisms." Neurochem Res **39**(2): 259-268.

Lee, E. M., G. Y. Park, K. C. Im, S. T. Kim, C. W. Woo, J. H. Chung, K. S. Kim, J. S. Kim, Y. M. Shon, Y. I. Kim and J. K. Kang (2012). "Changes in glucose metabolism and metabolites during the epileptogenic process in the lithium-pilocarpine model of epilepsy." Epilepsia **53**(5): 860-869.

Leite, J. P., Z. A. Bortolotto and E. A. Cavalheiro (1990). "Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy." Neurosci Biobehav Rev **14**(4): 511-517.

Leite, J. P. and E. A. Cavalheiro (1998). Neurobiologia da esclerose mesial temporal. In: Costa, J. C.; Palmini, A.; Yacubian, E. M. T.; Cavalheiro, E. A. . Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias - aspectos clínicos e cirúrgicos. E. Lemos. **1**: 129-136.

Leite, J. P., N. Garcia-Cairasco and E. A. Cavalheiro (2002). "New insights from the use of pilocarpine and kainate models." Epilepsy Res **50**(1-2): 93-103.

Lemos, T. and E. A. Cavalheiro (1995). "Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats." Exp Brain Res **102**(3): 423-428.

Levesque, M. and M. Avoli (2013). "The kainic acid model of temporal lobe epilepsy." Neurosci Biobehav Rev **37**(10 Pt 2): 2887-2899.

Levy, Y. S., M. Bahat-Stroomza, R. Barzilay, A. Burshtein, S. Bulvik, Y. Barhum, H. Panet, E. Melamed and D. Offen (2008). "Regenerative effect of neural-induced human mesenchymal stromal cells in rat models of Parkinson's disease." Cytherapy **10**(4): 340-352.

Li, T., G. Ren, D. L. Kaplan and D. Boison (2009). "Human mesenchymal stem cell grafts engineered to release adenosine reduce chronic seizures in a mouse model of CA3-selective epileptogenesis." Epilepsy Res **84**(2-3): 238-241.

Lindvall, O. and Z. Kokaia (2006). "Stem cells for the treatment of neurological disorders." Nature **441**(7097): 1094-1096.

Liu, Z., A. Gatt, S. J. Werner, M. A. Mikati and G. L. Holmes (1994). "Long-term behavioral deficits following pilocarpine seizures in immature rats." Epilepsy Res **19**(3): 191-204.

Long, Q., B. Qiu, K. Wang, J. Yang, C. Jia, W. Xin, P. Wang, R. Han, Z. Fei and W. Liu (2013). "Genetically engineered bone marrow mesenchymal stem cells improve functional outcome in a rat model of epilepsy." Brain Res **1532**: 1-13.

Loscher, W. (2002). "Current status and future directions in the pharmacotherapy of epilepsy." Trends Pharmacol Sci **23**(3): 113-118.

Maisano, X., E. Litvina, S. Tagliatela, G. B. Aaron, L. B. Grabel and J. R. Naegele (2012). "Differentiation and functional incorporation of embryonic stem cell-derived GABAergic interneurons in the dentate gyrus of mice with temporal lobe epilepsy." J Neurosci **32**(1): 46-61.

- Mathern, G. W., T. L. Babb, J. P. Leite, K. Pretorius, K. M. Yeoman and P. A. Kuhlman (1996). "The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy." Epilepsy Res **26**(1): 151-161.
- Mazarati, A., P. Siddarth, R. A. Baldwin, D. Shin, R. Caplan and R. Sankar (2008). "Depression after status epilepticus: behavioural and biochemical deficits and effects of fluoxetine." Brain **131**(Pt 8): 2071-2083.
- McNamara, J. O. (1994). "Cellular and molecular basis of epilepsy." J Neurosci **14**(6): 3413-3425.
- Mello, L. E., E. A. Cavalheiro, A. M. Tan, W. R. Kupfer, J. K. Pretorius, T. L. Babb and D. M. Finch (1993). "Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting." Epilepsia **34**(6): 985-995.
- Mezey, E., K. J. Chandross, G. Harta, R. A. Maki and S. R. McKercher (2000). "Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow." Science **290**(5497): 1779-1782.
- Miltiadous, P., G. Kouroupi, A. Stamatakis, P. N. Koutsoudaki, R. Matsas and F. Stylianopoulou (2013). "Subventricular zone-derived neural stem cell grafts protect against hippocampal degeneration and restore cognitive function in the mouse following intrahippocampal kainic acid administration." Stem Cells Transl Med **2**(3): 185-198.
- Mirrione, M. M., W. K. Schiffer, J. S. Fowler, D. L. Alexoff, S. L. Dewey and S. E. Tsirka (2007). "A novel approach for imaging brain-behavior relationships in mice reveals unexpected metabolic patterns during seizures in the absence of tissue plasminogen activator." Neuroimage **38**(1): 34-42.
- Morrison, S. J., N. M. Shah and D. J. Anderson (1997). "Regulatory mechanisms in stem cell biology." Cell **88**(3): 287-298.
- Motamedi, G. and K. Meador (2003). "Epilepsy and cognition." Epilepsy Behav **4 Suppl 2**: S25-38.
- Nityanandam, A. and K. K. Baldwin (2015). "Advances in reprogramming-based study of neurologic disorders." Stem Cells Dev **24**(11): 1265-1283.
- Paglioli, E., A. Palmi, J. C. da Costa, M. Portuguez, J. V. Martinez, M. E. Calcagnotto, J. R. Hoefel, S. Raupp and L. Barbosa-Coutinho (2004). "Survival analysis of the surgical outcome of temporal lobe epilepsy due to hippocampal sclerosis." Epilepsia **45**(11): 1383-1391.
- Paglioli, E., A. Palmi, M. Portuguez, N. Azambuja, J. C. da Costa, H. F. da Silva Filho, J. V. Martinez and J. R. Hoefel (2006). "Seizure and memory outcome following temporal lobe surgery: selective compared with nonselective approaches for hippocampal sclerosis." J Neurosurg **104**(1): 70-78.
- Parent, J. M. and S. A. Anderson (2015). "Reprogramming patient-derived cells to study the epilepsies." Nat Neurosci **18**(3): 360-366.
- Pitkanen, A., J. Tuunanen, R. Kalviainen, K. Partanen and T. Salmenpera (1998). "Amygdala damage in experimental and human temporal lobe epilepsy." Epilepsy Res **32**(1-2): 233-253.

- Raedt, R., A. Van Dycke, D. Van Melkebeke, T. De Smedt, P. Claeys, T. Wyckhuys, K. Vonck, W. Wadman and P. Boon (2009). "Seizures in the intrahippocampal kainic acid epilepsy model: characterization using long-term video-EEG monitoring in the rat." Acta Neurol Scand **119**(5): 293-303.
- Rao, M. S., B. Hattiangady, K. S. Rai and A. K. Shetty (2007). "Strategies for promoting anti-seizure effects of hippocampal fetal cells grafted into the hippocampus of rats exhibiting chronic temporal lobe epilepsy." Neurobiol Dis **27**(2): 117-132.
- Rao, M. S., B. Hattiangady, D. S. Reddy and A. K. Shetty (2006). "Hippocampal neurodegeneration, spontaneous seizures, and mossy fiber sprouting in the F344 rat model of temporal lobe epilepsy." J Neurosci Res **83**(6): 1088-1105.
- Rao, M. S., B. Hattiangady and A. K. Shetty (2006). "Fetal hippocampal CA3 cell grafts enriched with FGF-2 and BDNF exhibit robust long-term survival and integration and suppress aberrant mossy fiber sprouting in the injured middle-aged hippocampus." Neurobiol Dis **21**(2): 276-290.
- Rao, M. S., B. Hattiangady and A. K. Shetty (2006). "The window and mechanisms of major age-related decline in the production of new neurons within the dentate gyrus of the hippocampus." Aging Cell **5**(6): 545-558.
- Rogawski, M. A. and R. J. Porter (1990). "Antiepileptic drugs: pharmacological mechanisms and clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds." Pharmacol Rev **42**(3): 223-286.
- Ruschenschmidt, C., P. G. Koch, O. Brustle and H. Beck (2005). "Functional properties of ES cell-derived neurons engrafted into the hippocampus of adult normal and chronically epileptic rats." Epilepsia **46 Suppl 5**: 174-183.
- Samuels, B. A. and R. Hen (2011). "Neurogenesis and affective disorders." Eur J Neurosci **33**(6): 1152-1159.
- Sanabria, E. R. G. and E. A. Cavalheiro (2000). Epileptogênese: Contribuição dos Modelos Experimentais. In: G. M. M. Guerreiro C A M, Cendes F, Lopes-Cendes. . Epilepsia. L. e. G. Ltda. São Paulo: 29-57.
- Sander, J. V. and Y. M. A. Hart (1999). Epidemiologia da Epilepsia. Epilepsia: Um Guia Prático. São Paulo: 43-50.
- Sarkisian, M. R., P. Tandon, Z. Liu, Y. Yang, A. Hori, G. L. Holmes and C. E. Stafstrom (1997). "Multiple kainic acid seizures in the immature and adult brain: ictal manifestations and long-term effects on learning and memory." Epilepsia **38**(11): 1157-1166.
- Sarkisova, K. Y., I. S. Midzianovskaia and M. A. Kulikov (2003). "Depressive-like behavioral alterations and c-fos expression in the dopaminergic brain regions in WAG/Rij rats with genetic absence epilepsy." Behav Brain Res **144**(1-2): 211-226.
- Scharfman, H. E. and W. P. Gray (2007). "Relevance of seizure-induced neurogenesis in animal models of epilepsy to the etiology of temporal lobe epilepsy." Epilepsia **48 Suppl 2**: 33-41.
- Shamim, S., G. Hasler, C. Liew, S. Sato and W. H. Theodore (2009). "Temporal lobe epilepsy, depression, and hippocampal volume." Epilepsia **50**(5): 1067-1071.

Sharma, A. K., R. Y. Reams, W. H. Jordan, M. A. Miller, H. L. Thacker and P. W. Snyder (2007). "Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions." Toxicol Pathol **35**(7): 984-999.

Shen, H., L. Liu, Z. Huo and Z. Lin (2010). "Hippocampal stem cell grafting-mediated recovery of injured hippocampus in the rat model of temporal lobe epilepsy." Int J Neurosci **120**(10): 647-654.

Shetty, A. K. (2011). "Progress in cell grafting therapy for temporal lobe epilepsy." Neurotherapeutics **8**(4): 721-735.

Shetty, A. K. (2012). Neural Stem Cell Therapy for Temporal Lobe Epilepsy. Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies. J. L. Noebels, M. Avoli, M. A. Rogawski, R. W. Olsen and A. V. Delgado-Escueta. Bethesda (MD), National Center for Biotechnology Information (US)

Michael A Rogawski, Antonio V Delgado-Escueta, Jeffrey L Noebels, Massimo Avoli and Richard W Olsen.

Shetty, A. K. (2014). "Hippocampal injury-induced cognitive and mood dysfunction, altered neurogenesis, and epilepsy: can early neural stem cell grafting intervention provide protection?" Epilepsy Behav **38**: 117-124.

Shetty, A. K. and B. Hattiangady (2007). "Concise review: prospects of stem cell therapy for temporal lobe epilepsy." Stem Cells **25**(10): 2396-2407.

Shetty, A. K. and D. Upadhyaya (2016). "GABA-ergic cell therapy for epilepsy: Advances, limitations and challenges." Neurosci Biobehav Rev **62**: 35-47.

Shetty, A. K., V. Zaman and B. Hattiangady (2005). "Repair of the injured adult hippocampus through graft-mediated modulation of the plasticity of the dentate gyrus in a rat model of temporal lobe epilepsy." J Neurosci **25**(37): 8391-8401.

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

Sloviter, R. S. (2005). "The neurobiology of temporal lobe epilepsy: too much information, not enough knowledge." C R Biol **328**(2): 143-153.

Snyder, J. S., A. Soumier, M. Brewer, J. Pickel and H. A. Cameron (2011). "Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour." Nature **476**(7361): 458-461.

Southwell, D. G., C. R. Nicholas, A. I. Basbaum, M. P. Stryker, A. R. Kriegstein, J. L. Rubenstein and A. Alvarez-Buylla (2014). "Interneurons from embryonic development to cell-based therapy." Science **344**(6180): 1240622.

Sutula, T., G. Cascino, J. Cavazos, I. Parada and L. Ramirez (1989). "Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe." Ann Neurol **26**(3): 321-330.

Sutula, T., J. Cavazos and G. Golarai (1992). "Alteration of long-lasting structural and functional effects of kainic acid in the hippocampus by brief treatment with phenobarbital." J Neurosci **12**(11): 4173-4187.

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

Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda and S. Yamanaka (2007). "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." Cell **131**(5): 861-872.

Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." Cell **126**(4): 663-676.

Thom, M., S. Eriksson, L. Martinian, L. O. Caboclo, A. W. McEvoy, J. S. Duncan and S. M. Sisodiya (2009). "Temporal lobe sclerosis associated with hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: neuropathological features." J Neuropathol Exp Neurol **68**(8): 928-938.

Thompson, K. (2009). "Transplantation of GABA-producing cells for seizure control in models of temporal lobe epilepsy." Neurotherapeutics **6**(2): 284-294.

Tidball, A. M. and J. M. Parent (2016). "Concise Review: Exciting Cells: Modeling Genetic Epilepsies with Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells." Stem Cells **34**(1): 27-33.

Turner, D. A. and A. K. Shetty (2003). "Clinical prospects for neural grafting therapy for hippocampal lesions and epilepsy." Neurosurgery **52**(3): 632-644; discussion 641-634.

Turski, W. A., E. A. Cavalheiro, M. Schwarz, S. J. Czuczwar, Z. Kleinrok and L. Turski (1983). "Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study." Behav Brain Res **9**(3): 315-335.

Upadhyay, D., B. Hattiangady, G. A. Shetty, G. Zanirati, M. Kodali and A. K. Shetty (2016). "Neural Stem Cell or Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived GABA-ergic Progenitor Cell Grafting in an Animal Model of Chronic Temporal Lobe Epilepsy." Curr Protoc Stem Cell Biol **38**: 2D 7 1-2D 7 47.

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

Venturin, G. T., S. Greggio, D. R. Marinowic, G. Zanirati, M. Cammarota, D. C. Machado and J. C. DaCosta (2011). "Bone marrow mononuclear cells reduce seizure frequency and improve cognitive outcome in chronic epileptic rats." Life Sci **89**(7-8): 229-234.

Venturin, G. T., S. Greggio, G. Zanirati, D. R. Marinowic, I. M. de Oliveira, J. A. Pegas Henriques and J. C. DaCosta (2016). "Transplantation of bone marrow mononuclear cells prolongs survival, delays disease onset and mitigates neuronal loss in pre-symptomatic, but not symptomatic ALS mice." Neurosci Lett **633**: 182-188.

Vlooswijk, M. C., J. F. Jansen, M. C. de Krom, H. M. Majoie, P. A. Hofman, W. H. Backes and A. P. Aldenkamp (2010). "Functional MRI in chronic epilepsy: associations with cognitive impairment." Lancet Neurol **9**(10): 1018-1027.

Waldau, B., B. Hattiangady, R. Kuruba and A. K. Shetty (2010). "Medial ganglionic eminence-derived neural stem cell grafts ease spontaneous seizures and restore GDNF expression in a rat model of chronic temporal lobe epilepsy." Stem Cells **28**(7): 1153-1164.

- Yacubian, E. M. T. (1998). Contribuição da semiologia das crises parciais ao diagnóstico topográfico das epilepsias. In: Costa, J. C.; Palmieri, A.; Yacubian, E. M. T.; Cavalheiro, E. A. Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias. L. E. G. Ltda. São Paulo. **1**: 163-172.
- Zanirati, G., P. N. Azevedo, D. R. Marinowic, F. Rodrigues, A. C. de Oliveira Dias, G. T. Venturin, S. Greggio, F. Simao and J. C. DaCosta (2015). "Transplantation of bone marrow mononuclear cells modulates hippocampal expression of growth factors in chronically epileptic animals." CNS Neurosci Ther **21**(5): 463-471.
- Zhang, R., L. H. Zhang and X. Xie (2013). "iPSCs and small molecules: a reciprocal effort towards better approaches for drug discovery." Acta Pharmacol Sin **34**(6): 765-776.
- Zimmer, E. R., M. J. Parent, A. C. Cuello, S. Gauthier and P. Rosa-Neto (2014). "MicroPET imaging and transgenic models: a blueprint for Alzheimer's disease clinical research." Trends Neurosci **37**(11): 629-641.
- Zipancic, I., M. E. Calcagnotto, M. Piquer-Gil, L. E. Mello and M. Alvarez-Dolado (2010). "Transplant of GABAergic precursors restores hippocampal inhibitory function in a mouse model of seizure susceptibility." Cell Transplant **19**(5): 549-564.
- Zobel, A., K. Barkow, S. Schulze-Rauschenbach, O. Von Widdern, M. Metten, U. Pfeiffer, S. Schnell, M. Wagner and W. Maier (2004). "High neuroticism and depressive temperament are associated with dysfunctional regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system in healthy volunteers." Acta Psychiatr Scand **109**(5): 392-399.

Capítulo II

Efeito do transplante de células mononucleares da medula óssea sobre o metabolismo cerebral da glicose *in vivo* e o comportamento depressivo no modelo experimental de epilepsia crônica induzido por pilocarpina.

RESUMO

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é um dos tipos mais comuns de epilepsia na população mundial, e muitas vezes, conseqüentemente, é acompanhada por comorbidades como a depressão. A depressão tem sido considerada uma importante comorbidade da epilepsia, sendo relatada tanto em pacientes com ELT quanto em modelos experimentais de epilepsia. No entanto, não há um consenso estabelecido sobre quais regiões cerebrais estão associadas com a manifestação da depressão na epilepsia. Com a alta refratariedade da ELT, novas alternativas terapêuticas têm sido avaliadas como, por exemplo, a terapia celular. O transplante de células mononucleares da medula óssea (CMMO) vem sendo utilizado para o tratamento da epilepsia e tem mostrado um grande número de efeitos benéficos nesta neuropatologia. A epilepsia afeta o consumo de glicose cerebral, bem como a rede metabólica e a conectividade entre regiões cerebrais. Por outro lado, o PET com ^{18}F -FDG tem sido amplamente utilizado para investigar o metabolismo cerebral em pacientes com ELT ou distúrbios depressivos e na investigação experimental em animais de pequeno porte avaliados por imagens obtidas no microPET. Nós investigamos longitudinalmente as alterações no metabolismo cerebral da glicose no modelo de epilepsia induzido por pilocarpina e observamos o efeito do transplante das CMMO no comportamento depressivo e no metabolismo cerebral de FDG durante a fase crônica da epilepsia. Nossos resultados evidenciaram que os ratos tratados com pilocarpina apresentaram comportamento semelhante àqueles observados na depressão associado a menor metabolismo de ^{18}F -FDG em várias regiões cerebrais relacionadas à fisiopatologia da epilepsia e da depressão durante a fase crônica. O tratamento com CMMO reduziu a disfunção cognitiva e o comportamento depressivo mostrado pelos animais cronicamente epiléticos. No entanto, o transplante CMMO parece não afetar o metabolismo cerebral da glicose nesses animais. Adicionalmente, encontramos uma rede metabólica hipersincronizada nos animais cronicamente epiléticos e uma rede metabólica reduzida em animais tratados com as CMMO, semelhante aos animais controles. Este estudo corrobora com evidências adicionais de comportamento depressivo como comorbidade no modelo de epilepsia induzida pela pilocarpina associado a significativa alteração do metabolismo da glicose e da rede metabólica entre as regiões cerebrais envolvidas em ambas as patologias. Além disso, este estudo sugeriu um potencial efeito do transplante de CMMO para redução da

frequência de crises, déficit cognitivo e comportamento depressivo, bem como contribuiu para normalização da rede metabólica em animais cronicamente epiléticos.

ABSTRACT

Temporal lobe epilepsy (TLE) is one of the most common kind of epilepsy syndromes in the world population. Depression is an important comorbidity of epilepsy. It has been reported in patients with TLE and different experimental models of epilepsy. However, there is no established consensus about which brain regions are associated with the manifestation of depression in epilepsy. BMMC transplantation has been used for treatment of epilepsy and has showed a large number of benefit effects in this neuropathology. ^{18}F -FDG has been widely used to investigate the cerebral metabolism in patients with TLE or depression disorders, and recently in animal models using microPET imaging. We investigate longitudinally the alterations in cerebral glucose metabolism in rats submitted to the pilocarpine model and observe the effect of BMMC transplantation in cerebral FDG uptake to correlate it to depressive behavior during the chronic phase of epilepsy. Our results demonstrated that pilocarpine-treated rats showed depression-like behavior and reduced ^{18}F -FDG uptake in several brain regions related to the pathophysiology of both epilepsy and depression during chronic phase. Besides, BMMC treatment reduced cognitive dysfunction and depressive-like behavior showed by chronically epileptic rats. However, the BMMC transplantation did not affect the brain glucose metabolism in those animals. Additionally, we found a hypersynchrony metabolic network in the chronically epileptic animals, and reduced connectivity in BMMC-treated animals, similar to Control rats. This study suggests further evidence of depressive behavior as a comorbidity in the pilocarpine-induced epilepsy model, and an important alteration of glucose metabolism and metabolic network among brain regions of interest for both pathologies. Additionally, this study suggested a potential effect of BMMC transplantation for reduction of seizure frequency, cognitive deficits and depressive-like behavior, as well as contribute to normalize the connectivity in the metabolic network in chronically epileptic animals.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as alterações do metabolismo cerebral da glicose *in vivo* em ratos submetidos ao modelo da pilocarpina e monitorar a resposta terapêutica do transplante de células mononucleares da medula óssea sobre o metabolismo cerebral da glicose e comportamento depressivo durante a fase crônica da epilepsia.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Monitorar *in vivo* o metabolismo de glicose na progressão da epilepsia após a administração de pilocarpina em diferentes tempos durante a fase crônica, utilizando imagem de microPET e o radiofármaco ^{18}F -FDG.
- 2) Investigar *in vivo* o efeito do transplante de CMMO sobre o metabolismo da glicose em animais com epilepsia tratados durante o período crônico, comparando com grupo epilético não tratado e controle, em diferentes tempos, utilizando imagem de microPET e o radiofármaco ^{18}F -FDG.
- 3) Verificar o efeito do transplante de CMMO sobre o comportamento depressivo, déficit cognitivo e frequência de crises no modelo de epilepsia induzido por pilocarpina.
- 4) Avaliar a relação entre os dados obtidos por imagem de microPET com a frequência de crises espontâneas recorrentes, bem como, com o comportamento depressivo e déficit cognitivo entre os grupos epiléticos tratados com as CMMO.
- 5) Analisar a rede metabólica a partir dos dados obtidos do microPET em animais com epilepsia tratados com as CMMO durante o período crônico, comparando com grupo epilético não tratado e controle.

2. METODOLOGIA

Este estudo foi realizado no Centro de Pesquisa Pré-Clínica (CPP) do Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul (InsCer) e Laboratório de Neurociências do InsCer e Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, os quais possuem a infraestrutura e os equipamentos necessários para a realização dos experimentos.

2.1 ANIMAIS

Para este estudo foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos com 40-45 dias de vida. Todos os animais foram procedentes do Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CeMBE) da PUCRS. Os ratos foram mantidos no alojamento de animais do Prédio 14, CeMBE/PUCRS, durante os exames de imagem molecular os animais permaneceram alojados no Centro de Pesquisa Pré-Clínica (CPP) do InsCer, e para a execução de testes comportamentais relacionados à memória, eles foram mantidos no alojamento do Prédio 64 do Hospital São Lucas da PUCRS. Em todos os alojamentos, os animais permaneceram sob iluminação e temperatura controladas (ciclo claro-escuro de 12 horas e aproximadamente 24°C), com ração e água ad libitum. Também foram utilizados ratos machos EGFP+ com idade entre 30-40 dias. Estes foram doadores de CMMO e expressam a proteína verde fluorescente EGFP (do inglês enhanced green fluorescent protein) (Hakamata et al. 2001).

2.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os protocolos experimentais utilizados foram submetidos para avaliação e aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS (CEUA) e registrados sob número 7293 (Anexo I), e seguiram as normas internacionais de experimentação com animais de laboratório. Todos os procedimentos foram realizados tomando os cuidados necessários para reduzir ao máximo o número de animais empregados e seu sofrimento.

2.3 MODELO EXPERIMENTAL DE EPILEPSIA INDUZIDA POR PILOCARPINA

Para a indução de *status epilepticus* (SE) por injeção de pilocarpina intraperitoneal, geralmente é necessário doses acima de 300mg/kg (Turski, Cavalheiro et al. 1983, Leite, Bortolotto et al. 1990, Cavalheiro, Leite et al. 1991). Assim, os ratos receberam pilocarpina (PILO, 320 mg/kg) via intraperitoneal, conforme previamente descrito (Venturin, Greggio et al. 2011, Costa-Ferro, Souza et al. 2012, Zanirati, Azevedo et al. 2015). Para cessar as manifestações comportamentais da PILO (Priel 1996) os ratos receberam diazepam (10 mg/kg, i.p., 90 minutos após o início do SE). Os ratos foram pré-tratados com metilescopolamina (1 mg/kg, i.p.) para atenuar as manifestações periféricas da pilocarpina, pois esta não ultrapassa a barreira hematoencefálica, assim obtendo um maior efeito central da PILO, a qual ultrapassa a barreira. Ao receber PILO, os animais ficam em SE duradouro, ou seja, há persistência de crises contínuas durante, no mínimo, 30 minutos. Os ratos apresentam crises epiléticas de intensidade variável, caracterizadas por imobilidade, tremor, automatismo bucofaciais, abalos de extremidades, ataxia e crises tônico-clônicas. Esta crise aguda é seguida por um período latente, com normalização progressiva do EEG, sendo uma fase em que o animal permanece sem crises comportamentais e que dura em média de 14 a 25 dias. A partir daí, surgem crises epiléticas espontâneas e recorrentes, caracterizando a fase crônica da epilepsia (Cavalheiro, Leite et al. 1991).

Após a injeção de PILO, os ratos permaneceram em caixas de acrílico transparentes e foi observado as manifestações destes animais, utilizando a escala de Racine para classificá-las (Racine 1972) (Quadro 1). Foram incluídos no estudo somente os animais que atingiram os graus 4 e 5 desta escala durante a indução do SE.

| |
|------------------------------------|
| Escala de Racine (1972) |
| 0 - Imobilidade |
| 1 - Automatismos faciais |
| 2 - Mioclonias de cabeça e pescoço |
| 3- Clonias de patas anteriores |
| 4- Clonias de patas posteriores |
| 5- Elevação e queda |

Quadro 1. Escala de Racine contendo os graus de resposta dos animais à injeção de PILO. Fonte: Racine 1972.

Após decorridos 15 dias da indução do SE, os animais foram monitorados por vídeo e observação direta durante o período de sete dias (pré-transplante) para a análise do surgimento de CERs. Somente aqueles que apresentaram CERs referente aos graus 4 e 5 da escala de Racine foram incluídos no estudo.

2.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram estabelecidos três grupos de estudo, onde cada grupo continha 8 animais:

Controle: Estes animais receberam solução salina em substituição à PILO aos 45 dias de vida, e 100 µL de solução salina via veia da cauda após completarem 22 dias da injeção de salina.

Grupo Pilo: Neste grupo foi induzido SE mediante aplicação de pilocarpina conforme protocolo descrito acima. Ao completarem 22 dias da injeção de PILO, receberam 100µL de solução salina, via veia da cauda, conforme previamente descrito (Venturin, Greggio et al. 2011, Costa-Ferro, Souza et al. 2012).

Grupo Pilo+CMMO: Este grupo recebeu tratamento idêntico aos grupos Pilo, exceto ao completarem 22 dias da injeção de PILO os animais receberam transplante de CMMO no lugar de salina (100 µL contendo 10^7 células EGFP⁺), via veia da cauda, conforme previamente descrito (Costa-Ferro, Vitola et al. 2010).

Após a indução do SE (correspondente ao período latente, no qual há ausência de crises comportamentais), os animais foram previamente marcados em diferentes locais do corpo, com tinta preta à base de ervas naturais e mantidos em suas gaiolas transparentes e tiveram suas crises monitoradas por vídeo-monitoramento sem a necessidade de remoção do seu ambiente. Os animais foram filmados por um período de 12 horas (6 horas do ciclo claro e 6 horas do ciclo escuro), ao longo de 7 dias anteriores ao transplante de CMMO ou salina e 24 dias consecutivos do transplante, o qual foi dividido em três períodos de 8 dias

cada: Pós-transplante I (Pós-T I), Pós-transplante II (Pós-T II) e Pós-transplante III (Pós-T III). Após 22 dias da injeção da pilocarpina, os animais receberam o transplante intravenoso de CMMO ou salina (via veia da cauda). Nos dias 1, 7, 14 e 24 dias pós-transplante foram feitos os exames de imagem por microPET, através da injeção do radiofármaco ^{18}F -FDG afim de avaliar o metabolismo cerebral nos animais de todos os grupos experimentais. Após 60 dias da indução de SE, foram realizados testes comportamentais para avaliar memória e cognição e o comportamento depressivo dos animais submetidos ao modelo da pilocarpina (Figura 1).

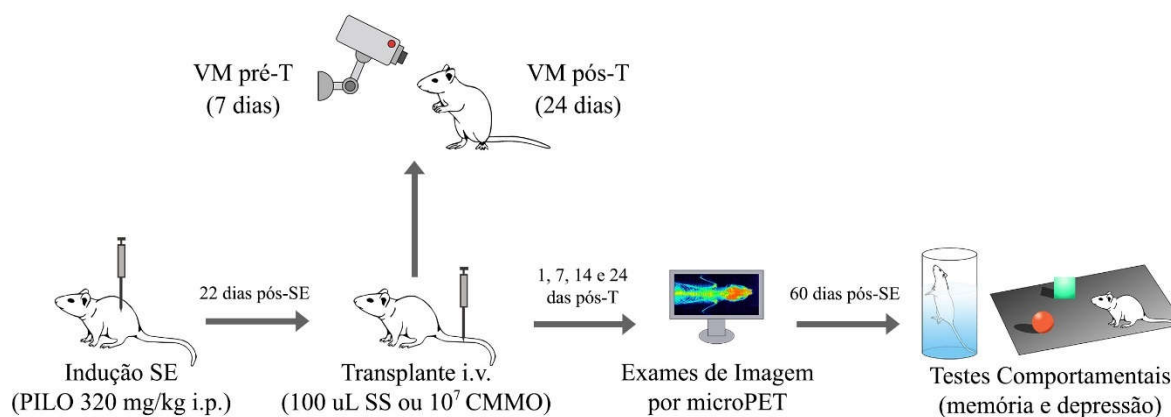


Figura 1. Delineamento do estudo. Indução de SE por injeção de pilocarpina; 15 dias após a indução do SE começa a vídeo-monitorização das crises durante sete dias antes do transplante e segue por 24 dias pós-transplante. Após 22 dias pós-SE foi feito o transplante das CMMO ou salina (100 uL contendo solução salina ou 1×10^7 CMMO). Os exames de imagem por microPET foram realizados 1, 7, 14 e 24 dias após o transplante de salina ou CMMO. Após 30 dias pós-transplante (aproximadamente 60 dias pós-SE) iniciaram-se os testes comportamentais para a avaliação da cognição, memória e depressão. SE: *Status epilepticus*; Pilo: Pilocarpina; VM Pré-T: Vídeo-monitoramento pré-transplante; VM Pós-T: Vídeo-monitoramento pós-transplante; SS: Solução salina, CMMO: Células Mononucleares da Medula Óssea.

2.5 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS

Para a obtenção das células-tronco (CT) da medula óssea (MO), ratos Lewis, que expressam a proteína GFP, foram anestesiados e dissecados e a MO de ossos longos (úmero, fêmur e tíbia) foi aspirada com o auxílio de uma agulha de 26 G contendo heparina

(10.000 U em 50 mL de PBS). O material foi centrifugado a $400 \times g$ por 10 minutos. As células foram ressuspensas em meio RPMI-1640 e fracionadas em gradiente de densidade gerado pela centrifugação a $400 \times g$ em uma solução de Ficoll-Paque. A camada mononuclear formada sobre o Ficoll-Paque foi coletada e lavada com DPBS. As concentrações celulares foram determinadas em câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão com azul de tripan. As células foram ressuspensas em DMEM com 10% FBS e 10 mM HEPES (Costa-Ferro, Vitola et al. 2010, Venturin, Greggio et al. 2011). Posteriormente, as populações celulares presentes foram caracterizadas pela detecção de antígenos de superfície e analisadas por um citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, USA). Foram preparadas alíquotas contendo 10^7 células para administração nos animais com epilepsia.

2.6 PRODUÇÃO DE FLÚOR-18

O Flúor-18 é um radioisótopo de meia-vida curta (109,8 minutos), e foi produzido através de um acelerador circular de partículas (Papash e Alenitsky 2008). O InsCer conta com um ciclotron de 8 MeV (PETTrace, GE®). O ciclotron é formado por três componentes principais: campo eletromagnético, um par de eletrodos de cobre em formato de semicírculo localizados entre os polos de um imã, chamados de Dees, e uma fonte de íons capaz de gerar íons negativos de alta intensidade. Além disso, toda sua estrutura é mantida sob vácuo (maior que 10^{-7} torr).

Após a ionização do gás hidrogênio na fonte de íons, os íons H⁻ são injetados em uma lacuna localizada entre os Dees. Quando uma radiofrequência de potencial alternado for aplicada aos Dees, os íons negativos aceleram em direção ao Dee de potencial positivo. Devido ao campo magnético ser perpendicular aos Dees e ao movimento das partículas, os íons negativos se movimentam de forma circular e ganham energia, velocidade e raio à medida que os Dees alternam seu potencial de positivo para negativo, e vice-versa. Quando a energia cinética ideal das partículas aceleradas é alcançada, os íons carregados negativamente passam através de uma folha de carbono ultrafina (stripper), que extrai seus

elétrons. Carregados positivamente, os íons mudam de direção e atingem o alvo, que é bombardeado. O alvo é líquido, composto de água enriquecida com oxigênio 18 ($[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$) que, através da reação nuclear $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$, produz o flúor nucleofílico ($^{18}\text{F}^-$). O corpo do alvo é de nióbio. A água enriquecida proveniente do ciclotron contendo o ^{18}F produzido na irradiação passa através de uma coluna de troca iônica (Waters Accel plus QMA cartridge) onde o radioisótopo fica retido. Em seguida, o ^{18}F é eluído por meio de uma solução aquosa de acetonitrila contendo carbonato de potássio (K_2CO_3) e Kryptofix 2.2.2, obtendo o fluoreto de potássio complexado com o Kryptofix 2.2.2. A água residual é removida através de aquecimento ou utilizando-se acetonitrila anidra e fluxo de nitrogênio (Hartmann 2013).

2.7 SÍNTESE DE ^{18}F -FDG

O uso de radiofármacos como o ^{18}F -FDG, por exemplo, em modelos animais de epilepsia oferece a oportunidade de investigar a relação ontológica entre o hipometabolismo límbico observado na epilepsia, a epileptogênese, os efeitos das crises e sua base patofisiológica (Jupp, Williams et al. 2012). Além disso, novos tratamentos podem ser investigados ao longo dessa janela de avaliação (Mirrione e Tsirka 2011).

O FDG é um dos radiofármacos mais utilizados em exames de PET. Ele é um análogo da glicose, exceto que na molécula de FDG há uma substituição no grupo hidroxila do carbono 2 da glicose por um átomo de flúor. A síntese de ^{18}F -FDG foi realizada através de substituição nucleofílica. A pureza radionuclídica foi avaliada por um espectrômetro de raios gama analisador multicanal com detector de NaI, pela determinação da energia dos fótons γ (gama). Também foi realizado o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) com auxílio de um curiômetro. O critério de aceitação segue as exigências da farmacopeia. O $t_{1/2}$ deve estar entre 105-115 minutos. A energia do pico principal encontrado deve ser $0.511 \pm 5\%$ MeV, representando no mínimo 96% da radioatividade total. A pureza radioquímica foi determinada por técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Ambas as técnicas comparam o perfil da amostra com o perfil do composto padrão.

A pureza Química (presença de Kryptofix 2.2.2) também foi determinada. O Kryptofix é um catalisador comumente utilizado para a síntese de radiofármacos com flúor-18, por meio de substituição nucleofílica. Por se tratar de um composto extremamente tóxico, sua presença no produto final deve estar dentro dos limites estabelecidos nos compêndios oficiais. A metodologia empregada foi a cromatografia em camada delgada, comparando a amostra com a solução padrão. Como a maioria dos agentes para imagem molecular são compostos orgânicos, é necessário utilizar solventes orgânicos durante as sínteses. Após a síntese e após a purificação, o produto final ainda pode conter pequenas quantidades destes compostos. A técnica utilizada para sua detecção foi a cromatografia gasosa. Adicionalmente, o produto foi esterilizado antes de ser injetado nos animais. Foi aplicado o método de esterilização por membrana filtrante (filtro Millipore GS 0,22um).

2.8 ESCANEAMENTO POR MICROPET

Foram investigadas *in vivo* – por meio de escaneamentos microPET - diferenças no metabolismo da glicose no tecido epiléptico para os diferentes períodos da fase crônica da epilepsia. Os escaneamentos foram feitos 1, 7, 14 e 24 dias após o transplante de CMMO ou salina (ou seja, 23, 29, 36 e 46 dias após a indução de SE, respectivamente), totalizando 88 escaneamentos de microPET (5-8 animais por grupo). Os animais foram transportados para o Centro de Pesquisa Pré-Clínica do InsCer 48h antes do primeiro scan e permaneceram no alojamento até a realização do último scan.

Para o escaneamento foi utilizado um sistema Triumph™ microPET (Gamma Medica-Ideas, Sherbrooke, QC, Canada) disponível no Centro de Pesquisa Pré-Clínica do Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul. O equipamento consiste de um subsistema completamente digital de microtomografia por emissão de pósitrons (microPET; LabPET-4®).

Em cada dia de scan, os animais foram individualmente anestesiados utilizando uma mistura de isoflurano e oxigênio (3-4% de indução e 2-3% de manutenção) e 1 mCi de ¹⁸F-FDG foi administrado através da veia da cauda. Em seguida, os animais foram devolvidos conscientes à gaiola durante um período de 40 minutos para captação do marcador. Os

animais permaneceram sobre uma placa aquecida para manter a temperatura corporal em torno de 36 graus. Após o período de captação, o rato foi colocado numa posição supinada na cama apropriada do aparelho, que foi aquecida a fim de manter a temperatura do animal, e analisado com o microPET sob anestesia inalatória. Para leituras do radiofármaco, foram realizadas aquisições estáticas por 10 minutos com um campo de visão (FOV: 3,75 cm) centrado na cabeça do rato.

O sistema de microPET, assim como o seu equivalente clínico, possui a capacidade de determinar a distribuição espacial e temporal *in vivo* de compostos marcados com um dado radionuclídeo. Baseia-se no princípio de que um isótopo, a exemplo do ^{18}F , produzido em ciclotron e ligado a uma molécula específica (radiofármaco), decai com a emissão de pósitrons. Após uma série de colisões com elétrons atômicos do tecido, este pósitron perde energia e aniquila-se com um elétron, produzindo dois fótons de alta energia que são emitidos em direções opostas. A detecção coincidente destes fótons, por um equipamento apropriado, é a base para a geração de uma imagem por microPET (Figura 2) (Lancelot e Zimmer 2010). O sistema é uma modalidade de imagem funcional para investigação molecular e permite analisar processos bioquímicos, fisiológicos, patológicos ou farmacológicos *in vivo* (Phelps 2000, Xi, Tian et al. 2011). Atualmente, os equipamentos de microPET possuem uma resolução espacial intrínseca de aproximadamente 1 mm³, compatível com estudos em animais de pequeno porte, tais como ratos e camundongos (Kiehl et al. 2011). A técnica tem sido empregada em modelos animais de epilepsia que utilizam ácido cáínico e no modelo da pilocarpina (Kornblum, Araujo et al. 2000, Mirrione, Schiffer et al. 2006, Goffin, Bormans et al. 2008, Guo, Gao et al. 2009, Jupp, Williams et al. 2012, Lee, Park et al. 2012).

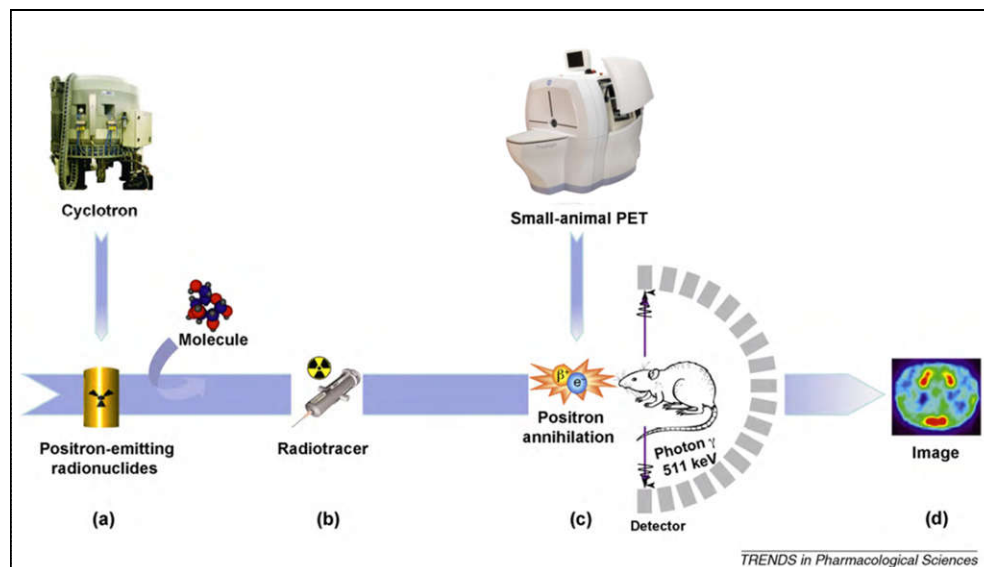


Figura 2. Representação esquemática para o princípio do microPET. (a) O ciclotron gera radionuclídeos emissores de pósitrons. Estes compostos são geralmente isótopos tais como oxigênio-15 (^{15}O), nitrogênio-13 (^{13}N), carbono-11 (^{11}C) e flúor-18 (^{18}F) com tempo de meia-vida de 2, 10, 20 e 110 minutos, respectivamente. (b) Estes radionuclídeos são incorporados em moléculas durante uma etapa de radiosíntese, gerando um “radiotraçador” específico (^{18}F -FDG). (c) Exames de microPET são obtidos após a administração intravenosa ou intraperitoneal deste radiotraçador. O marcador acumula-se no tecido em estudo e o seu radionuclídeo decai através da emissão de um pósitron. Após percorrer alguns poucos milímetros, o pósitron colide com um elétron e libera, simultaneamente, dois raios gama (fótons) com energia de 511 KeV em direções opostas. Estes fótons são detectados por uma câmara PET e simultaneamente localizados dentro de um período fixo de tempo por uma série de detectores opostos, que corresponde a múltiplos anéis constituídos por cristais de cintilação. (d) Através de um número significativo de eventos radioativos, algoritmos matemáticos reconstróem tridimensionalmente uma imagem que demonstrará a distribuição de moléculas emissoras de pósitron em determinado tecido corporal (Lancelot e Zimmer 2010).

2.9 RECONSTRUÇÃO DAS IMAGENS E REDE METABÓLICA CEREBRAL

Após a aquisição no microPET, todos os dados foram reconstruídos usando um algoritmo de expectativa-maximização de subconjuntos (3D-OSEM) com 20 iterações e sem correção de atenuação. Cada imagem reconstruída do microPET foi normalizada espacialmente em um modelo de ^{18}F -FDG utilizando a normalização cerebral com o auxílio do software PMOD 3.5 (PMOD Technologies, Zurique, Suíça) e a caixa de ferramentas Fusion. Utilizou-se um modelo voxel de interesse (VOI, do inglês *Voxel of Interest*) do

cérebro de rato de MRI para sobrepor as imagens normalizadas, anteriormente corregradas à base de dados de imagens do microPET. O metabolismo da glicose em todas as regiões foi expresso como valor de captação padronizado (SUV, do inglês *Standardized Uptake Value*) (Schiffer, Mirrione et al. 2006, Baptista, Saur et al. 2015).

Adicionalmente, foi realizada a análise baseada em voxel através do software SPM12 (*Statistical Parametric Mapping*) (Wellcome Trust Centre for Neuroimaging) para detectar possíveis alterações extras não detectadas pela análise por VOI. Uma vez que, a análise por PMOD utiliza regiões cerebrais predefinidas e a análise por SPM investiga o cérebro inteiro, sendo estatisticamente mais sensível (Parthoens, Servaes et al. 2015). Para isso, foram utilizadas as caixas de ferramentas SAMIT e WFU e as imagens foram suavizadas com um kernel gaussiano isotrópico de 1,2 mm (Parente, Feltes et al. 2016, Vallez Garcia, Otte et al. 2016).

A rede metabólica baseada em PET tem um papel complementar na compreensão da conectividade funcional do cérebro. O consumo cerebral de glicose ainda é muito utilizado como uma medida estática, porém, o ^{18}F -FDG pode ser utilizado para estudo de redes metabólicas devido a possibilidade de acoplamento entre a atividade cerebral e o metabolismo de glicose (Choi, Kim et al. 2014). Para a análise do mapa metabólico, analisamos o metabolismo de FDG normalizado pela intensidade nos VOIs dos animais e obtivemos uma matriz de correlação (20 x 20) com o auxílio do software Matlab para avaliar a rede metabólica cerebral dos animais.

2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA IMAGEM MOLECULAR

A análise estatística dos dados gerados a partir de PMOD foi realizada utilizando IBM SPSS Statistics 20 (IBM Corp, Nova Iorque, EUA) e o modelo de Equação de Estimção Generalizada (GEE, do inglês *Generalized Estimating Equation*) foi usado para considerar medidas repetidas para estudo longitudinal. O modelo GEE para a captação de ^{18}F -FDG utilizando o SUV foi aplicado individualmente para cada região do cérebro, incluindo a interação das variáveis "grupo", "dia de scan" e "grupo x dia de scan". Os dados foram ainda explorados através de comparação em pares de "grupo x dia de scan" em cada

região do cérebro para todos os períodos de scan realizados. A matriz de correlação AR (1) foi selecionada de acordo com a quase-verossimilhança sob os critérios de independência do modelo de informação. A estatística de Wald e os valores de p associados foram considerados estatisticamente significativos em $p < 0,05$ sem correção para comparações múltiplas. Os resultados são apresentados como média \pm SEM. A análise estatística dos dados gerados a partir do SPM foi realizada utilizando um teste t de 2 amostras (Controle vs. Pilo) sem normalização global. Para a avaliação das diferenças entre os grupos, os valores de T foram interrogados com um valor de $p < 0,005$ (não corrigido) e um limiar de extensão de 200 voxels. Apenas áreas com mais de 400 voxels e clusters com valor $p < 0,05$ corrigido para erro familiar foram consideradas significativas. Os resultados são apresentados como média \pm SD.

Para a análise do mapa metabólico, os coeficientes de correlação de Pearson (r) entre cada par dos VOIs foram calculados de forma inter-sujeitos e foi obtida a matriz de correlação (20×20) para cada grupo (Controle, Pilo e Pilo+CMMO) com auxílio do software GraphPad Prism 6.0. Após, foi construída uma matriz de rede não corrigida, utilizando software Matlab. Os valores de SUV foram normalizados pela ponte e a força de cada ligação foi definida como coeficientes de correlação (Choi et al. 2014). Escolhemos arbitrariamente $R=0.8$ como threshold e correlações com valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

2.11 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

O tratamento com pilocarpina leva à atrofia hipocampal, e sabe-se que o hipocampo desempenha um papel fundamental na formação e evocação de distintos tipos de memória, incluindo àquelas dependentes da integridade hipocampal e às com alto conteúdo emocional. As memórias de curta e de longa duração possuem mecanismos moleculares independentes, mas utilizam as mesmas estruturas nervosas para seu processamento, como hipocampo, córtex entorrinal e amígdala (Izquierdo, Barros et al., 1998). Em relação ao tempo de duração, as memórias de curta duração são aquelas que permanecem armazenadas por um curto período de tempo (poucos minutos ou horas), já as memórias de longa duração são aquelas que ficam armazenadas por um longo período de tempo (várias horas,

dias ou meses) (Izquierdo et al., 1998). Para avaliar se o déficit cognitivo e comportamento depressivo causados pelas crises recorrentes neste modelo de ELT foram revertidos pelo transplante de CMMO, os animais foram submetidos à tarefa de reconhecimento de objetos (NORT, do inglês *Novel Object Recognition Test*), teste de separação de padrão (PST, do inglês *Pattern Separation Test*), teste do nado forçado (FST, do inglês *Forced Swim Test*), teste de preferência por sacarose (SPT, do inglês *Sucrose Preference Test*) e teste de alimentação relacionado à depressão (ERDT, do inglês *Eating Related Depression Test*), dois meses após a indução do SE. Para todos os testes os avaliadores eram cegos quanto ao tratamento.

2.11.1 Teste de reconhecimento de objetos (NORT)

O paradigma de reconhecimento de objetos (NORT) utiliza a tendência natural que os roedores têm de explorar objetos novos, para medir sua memória (Ennaceur e Delacour 1988). Para este experimento, seguimos protocolo previamente descrito por Hattiangady e colaboradores para avaliar a memória de curta duração (Hattiangady e Shetty 2008, Upadhy, Hattiangady et al. 2016). Primeiramente, os animais foram expostos a um campo aberto (60x40x60 cm, comprimento x largura x altura), feito de madeira, com frente de vidro durante 10 minutos para habituação. No dia seguinte, os animais foram novamente habituados no campo aberto por 5 minutos (Trial 1), e após 15 minutos dois objetos idênticos foram dispostos no campo em posições equidistantes e permitiu-se o animal explorar livremente os objetos por 5 minutos (Trial 2). A terceira fase iniciou-se 15 minutos após, um dos objetos familiares ao animal foi substituído por um objeto novo e da mesma forma, o animal pôde explorar livremente por 5 minutos (Trial 3). O tempo percentual gasto explorando cada objeto foi calculado e expresso como percentual do tempo total de exploração em segundos com o intuito de avaliar a memória de curta duração. Roedores saudáveis tendem a explorar o objeto novo por mais tempo, demonstrando assim memória quanto ao objeto familiar.

2.11.2 Teste de separação de padrão (PST)

Estudos anteriores mostraram que esta tarefa requer níveis normais de neurogênese (Jain, Yoon et al. 2012, McAvoy, Besnard et al. 2015). Na primeira fase deste teste os animais são habituados em um campo aberto (60x40x60 cm, comprimento x largura x altura) por 5 minutos (Trial 1). Na segunda fase, 15 minutos após, coloca-se um fundo contendo um determinado padrão no campo, junto com dois objetos idênticos e deixa-se o animal explorar livremente por 5 minutos (Trial 2). A terceira fase inicia 30 minutos após a segunda, um padrão diferente é colocado no fundo da caixa com outros dois objetos idênticos, diferentes dos utilizados na fase 2, e da mesma forma permite-se o animal explorar por mais 5 minutos (Trial 3). A quarta e última fase inicia 15 minutos após a terceira, o mesmo padrão utilizado na fase 3 é mantido no fundo da caixa e um objeto da fase 2 (como objeto novo) é inserido juntamente com um objeto da fase 3 (como objeto familiar) (trial 4). Os parâmetros medidos incluem a porcentagem de tempo gasto com o objeto da fase 2 colocados no fundo com padrão utilizado na fase 3 (Upadhya, Hattiangady et al. 2016).

2.11.3 Teste do nado forçado (FST)

O teste do nado forçado (FST), originalmente descrito por Porsolt e colegas (Porsolt, Le Pichon et al. 1977), é utilizado para mensurar o comportamento depressivo dos animais. Neste estudo utilizamos o protocolo previamente descrito (Kodali, Parihar et al. 2015, Upadhya, Hattiangady et al. 2016). Os animais com função normal de humor costumam gastar menos tempo em imobilidade (flutuação) durante o teste. No primeiro dia, os animais foram habituados e treinados à atividade de natação individualmente em um cilindro com 45 cm de altura com água a uma temperatura de 23-25°C e profundidade de 30 cm de modo que as patas dianteiras do animal não tocassem no fundo do recipiente durante o teste. O animal foi colocado gentilmente no cilindro onde ficavam livres para nadar, durante 10 minutos. Roedores saudáveis tendem a apresentar um comportamento de luta, inicialmente, nadam durante a maior parte do tempo na água e mostram um comportamento de imobilidade (flutuação) por períodos mais curtos. Após a habituação, o animal retornou a sua gaiola que permaneceu sobre uma placa de aquecimento durante 30

min. Vinte e quatro horas após o treino foi feito o teste, onde os animais foram colocados novamente no cilindro e, um por vez, ficavam livres para nadar durante 10 minutos. O comportamento de cada animal durante todo o período do teste foi gravado por uma câmera de vídeo. Após o teste, da mesma forma, os animais retornaram as suas gaiolas que permaneceram sobre uma placa de aquecimento durante 30 min. Durante a tarefa os animais foram observados por pesquisadores treinados para agir a qualquer movimento de afogamento. Caso algum animal demonstrasse manifestações de crises durante a tarefa, este era removido imediatamente do cilindro e excluído do teste.

Em um segundo momento, avaliadores cegos analisaram as gravações e mensuraram o tempo gasto em flutuação (imobilidade) de cada animal, dividindo a análise entre os primeiros 5 minutos e últimos 5 minutos de teste. Nos primeiros minutos os animais tendem a nadar ativamente e fatores como fadiga podem influenciar na imobilidade durante os últimos minutos. Imobilidade é definida como o movimento mínimo necessário para manter a cabeça acima do nível da água e a natação é identificada como um movimento contínuo horizontal no cilindro. A porcentagem de tempo gasto em imobilidade é utilizada como uma medida do comportamento depressivo.

2.11.4 Teste da preferência por sacarose (SPT)

Para analisar a anedonia (perda da capacidade de sentir prazer em atividades prazerosas em condições normais), foi empregado o teste de preferência por sacarose (SPT). Este teste avalia a disfunção de humor em roedores medindo a perda ou redução da preferência por líquidos doces como a solução de sacarose (Snyder, Soumier et al. 2011, Baptista, Saur et al. 2015). Em condições normais, animais saudáveis tendem a mostrar preferência por beber sacarose à água normal. Por outro lado, animais com comportamento depressivo costumam consumir água normal e sacarose em proporções similares. No primeiro dia os animais foram treinados para adaptação à sacarose por 24 horas. Animais foram alojados em gaiolas individuais com livre acesso a duas garrafas idênticas cada uma contendo 100 mL de sacarose 1% e ração provida *ad libitum*. No segundo dia, alocados nas mesmas gaiolas, os animais tiveram livre acesso a duas garrafas, uma contendo 100 mL de

sacarose 1% e a outra contendo 100 mL de água e ração provida ad libitum. No terceiro dia, os animais foram privados de água e comida, permanecendo em jejum por 22 horas. No quarto e último dia, a preferência por sacarose foi avaliada após 22 horas de jejum. Os animais tiveram livre acesso a duas garrafas, uma contendo 100 mL de sacarose 1% e a outra contendo 100 mL de água por duas horas. Decorridas duas horas de teste, as garrafas foram removidas das gaiolas e o consumo de água e sacarose foram mensurados. Após o teste, os animais foram imediatamente colocados de volta a suas condições normais de alojamento, com acesso livre à ração e água. A taxa de preferência por sacarose foi calculada através da seguinte fórmula: $\text{consumo de sacarose} / (\text{consumo de água} + \text{consumo de sacarose}) \times 100$ (Upadhya, Hattiangady et al. 2016).

2.11.5 Teste de alimentação relacionada à depressão (ERDT)

Este teste examina os níveis de depressão e motivação para se alimentar após privação de comida por 24 horas. Esse teste foi adaptado a partir do teste de depressão relacionado à alimentação (ERDT) previamente descrito (Samuels e Hen 2011, Powell, Fernandes et al. 2012). Por outro lado, ratos com depressão demoram a chegar perto da comida ou levam mais tempo para comer. Neste teste, toda comida foi removida das gaiolas dos animais por 24 horas, porém água foi provida durante o período de jejum. Após 24 horas, poucos pellets de comida foram colocados em um pedaço de filtro de papel posicionado em um dos quatro cantos da gaiola em que o animal vive e cada animal foi colocado em um canto oposto à comida, podendo explorar por 5 minutos. Os pellets de comida fresca foram trocados para cada rato para eliminar qualquer problema relacionado a odores. A latência da primeira mordida na ração foi medida e comparada entre os grupos. O animal era excluído caso não mordesse a comida dentro dos 5 minutos de teste. Em condições normais, os animais saudáveis rapidamente se locomovem em direção aos pellets de ração para come-los. Entretanto, os animais com comportamento depressivo levam mais tempo para se dirigir à comida, ou apenas cheiram a comida, mas não a consomem (Upadhya, Hattiangady et al. 2016).

2.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

As análises estatísticas foram realizadas através do software PrismGraph 6.0 (Graph-Pad Software, San Diego, CA). Os dados foram expressos em média e erro padrão para variáveis de distribuição normal, e para todas as variáveis foi considerado um nível de significância $p < 0,05$.

Para a análise da frequência de crises foi utilizado o teste t de Student para amostras pareadas e para a comparação entre os períodos pré e pós-transplante foi utilizado ANOVA de uma via com medidas repetidas seguida do teste post-hoc de Tukey. Para a análise dos testes comportamentais foi utilizado teste t de Student e ANOVA de uma via seguida do teste post-hoc de Newman-Kewls.

3. REFERÊNCIAS

- Adamec, R., J. Blundell and P. Burton (2004). "Anxiolytic effects of kindling role of anatomical location of the kindling electrode in response to kindling of the right basolateral amygdala." Brain Res **1024**(1-2): 44-58.
- Akman, C. I., M. Ichise, A. Olsavsky, R. S. Tikofsky, R. L. Van Heertum and F. Gilliam (2010). "Epilepsy duration impacts on brain glucose metabolism in temporal lobe epilepsy: results of voxel-based mapping." Epilepsy Behav **17**(3): 373-380.
- Andre, V., C. Dube, J. Francois, C. Leroy, M. A. Rigoulot, C. Roch, I. J. Namer and A. Nehlig (2007). "Pathogenesis and pharmacology of epilepsy in the lithium-pilocarpine model." Epilepsia **48 Suppl 5**: 41-47.
- Bai, X., J. Guo, B. Killory, M. Vestal, R. Berman, M. Negishi, N. Danielson, E. J. Novotny, R. T. Constable and H. Blumenfeld (2011). "Resting functional connectivity between the hemispheres in childhood absence epilepsy." Neurology **76**(23): 1960-1967.
- Baillieux, H., H. J. De Smet, P. F. Paquier, P. P. De Deyn and P. Marien (2008). "Cerebellar neurocognition: insights into the bottom of the brain." Clin Neurol Neurosurg **110**(8): 763-773.
- Baptista, P. P., L. Saur, P. B. Bagatini, S. Greggio, G. T. Venturin, S. P. Vaz, R. Ferreira Kdos, J. S. Junqueira, D. R. Lara, J. C. DaCosta, C. M. Jeckel, R. G. Mestriner and L. L. Xavier (2015). "Antidepressant Effects of Ketamine Are Not Related to (1)(8)F-FDG Metabolism or Tyrosine Hydroxylase Immunoreactivity in the Ventral Tegmental Area of Wistar Rats." Neurochem Res **40**(6): 1153-1164.
- Bertoglio, D., J. Verhaeghe, E. Santermans, H. Amhaoul, E. Jonckers, L. Wyffels, A. Van Der Linden, N. Hens, S. Staelens and S. Dedeurwaerdere (2016). "Non-invasive PET imaging of brain inflammation at disease onset predicts spontaneous recurrent seizures and reflects comorbidities." Brain Behav Immun.
- Bharath, R. D., S. Sinha, R. Panda, K. Raghavendra, L. George, G. Chaitanya, A. Gupta and P. Satishchandra (2015). "Seizure Frequency Can Alter Brain Connectivity: Evidence from Resting-State fMRI." AJNR Am J Neuroradiol **36**(10): 1890-1898.
- Blumenfeld, H., K. A. McNally, S. D. Vanderhill, A. L. Paige, R. Chung, K. Davis, A. D. Norden, R. Stokking, C. Studholme, E. J. Novotny, Jr., I. G. Zubal and S. S. Spencer (2004). "Positive and negative network correlations in temporal lobe epilepsy." Cereb Cortex **14**(8): 892-902.
- Bohnen, N. I., T. J. O'Brien, B. P. Mullan and E. L. So (1998). "Cerebellar changes in partial seizures: clinical correlations of quantitative SPECT and MRI analysis." Epilepsia **39**(6): 640-650.
- Bromfield, E. B., L. Altshuler, D. B. Leiderman, M. Balish, T. A. Ketter, O. Devinsky, R. M. Post and W. H. Theodore (1992). "Cerebral metabolism and depression in patients with complex partial seizures." Arch Neurol **49**(6): 617-623.

Cavalheiro, E. A., J. P. Leite, Z. A. Bortolotto, W. A. Turski, C. Ikonomidou and L. Turski (1991). "Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures." *Epilepsia* **32**(6): 778-782.

Centeno, M. and D. W. Carmichael (2014). "Network Connectivity in Epilepsy: Resting State fMRI and EEG-fMRI Contributions." *Front Neurol* **5**: 93.

Choi, H., Y. Choi, K. W. Kim, H. Kang, W. Hwang do, E. E. Kim, J. K. Chung and D. S. Lee (2015). "Maturation of metabolic connectivity of the adolescent rat brain." *Elife* **4**.

Choi, H., Y. K. Kim, H. Kang, H. Lee, H. J. Im, D. W. Hwang, E. E. Kim, J. K. Chung and D. S. Lee (2014). "Abnormal metabolic connectivity in the pilocarpine-induced epilepsy rat model: a multiscale network analysis based on persistent homology." *Neuroimage* **99**: 226-236.

Chugani, H. T., M. E. Phelps and J. C. Mazziotta (1987). "Positron emission tomography study of human brain functional development." *Ann Neurol* **22**(4): 487-497.

Chugani, H. T., D. A. Shewmon, S. Khanna and M. E. Phelps (1993). "Interictal and postictal focal hypermetabolism on positron emission tomography." *Pediatr Neurol* **9**(1): 10-15.

Costa-Ferro, Z. S., B. S. Souza, M. M. Leal, C. M. Kaneto, C. M. Azevedo, I. C. da Silva, M. B. Soares, R. Ribeiro-dos-Santos and J. C. Dacosta (2012). "Transplantation of bone marrow mononuclear cells decreases seizure incidence, mitigates neuronal loss and modulates pro-inflammatory cytokine production in epileptic rats." *Neurobiol Dis* **46**(2): 302-313.

Costa-Ferro, Z. S., A. S. Vitola, M. F. Pedroso, F. B. Cunha, L. L. Xavier, D. C. Machado, M. B. Soares, R. Ribeiro-dos-Santos and J. C. DaCosta (2010). "Prevention of seizures and reorganization of hippocampal functions by transplantation of bone marrow cells in the acute phase of experimental epilepsy." *Seizure* **19**(2): 84-92.

Curia, G., D. Longo, G. Biagini, R. S. Jones and M. Avoli (2008). "The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy." *J Neurosci Methods* **172**(2): 143-157.

DaCosta, J. C., M. W. Portuguese, D. R. Marinowic, L. P. Schilling, C. M. Torres, D. I. DaCosta, M. J. Carrion, E. F. Raupp, D. C. Machado, R. B. Soder, S. L. Lardi and B. Garicochea (2016). "Safety and Seizure Control in Patients with Mesial Temporal Lobe Epilepsy Treated with Regional Superselective Intra-arterial Injection of Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells." *J Tissue Eng Regen Med*.

Dedeurwaerdere, S., P. D. Callaghan, T. Pham, G. L. Rahardjo, H. Amhaoul, P. Berghofer, M. Quinlivan, F. Mattner, C. Loc'h, A. Katsifis and M. C. Gregoire (2012). "PET imaging of brain inflammation during early epileptogenesis in a rat model of temporal lobe epilepsy." *EJNMMI Res* **2**(1): 60.

Deng, W., J. B. Aimone and F. H. Gage (2010). "New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory?" *Nat Rev Neurosci* **11**(5): 339-350.

Diehl, B., E. LaPresto, I. Najm, S. Raja, S. Rona, T. Babb, Z. Ying, W. Bingaman, H. O. Luders and P. Ruggieri (2003). "Neocortical temporal FDG-PET hypometabolism

correlates with temporal lobe atrophy in hippocampal sclerosis associated with microscopic cortical dysplasia." *Epilepsia* **44**(4): 559-564.

Douw, L., M. de Groot, E. van Dellen, J. J. Heimans, H. E. Ronner, C. J. Stam and J. C. Reijneveld (2010). "'Functional connectivity' is a sensitive predictor of epilepsy diagnosis after the first seizure." *PLoS One* **5**(5): e10839.

Dube, C., S. Boyet, C. Marescaux and A. Nehlig (2000). "Progressive metabolic changes underlying the chronic reorganization of brain circuits during the silent phase of the lithium-pilocarpine model of epilepsy in the immature and adult Rat." *Exp Neurol* **162**(1): 146-157.

Dube, C., S. Boyet, C. Marescaux and A. Nehlig (2001). "Relationship between neuronal loss and interictal glucose metabolism during the chronic phase of the lithium-pilocarpine model of epilepsy in the immature and adult rat." *Exp Neurol* **167**(2): 227-241.

Dudek, F. E. and L. R. Shao (2004). "Mossy fiber sprouting and recurrent excitation: direct electrophysiologic evidence and potential implications." *Epilepsy Curr* **4**(5): 184-187.

Duman, R. S. (2004). "Role of neurotrophic factors in the etiology and treatment of mood disorders." *Neuromolecular Med* **5**(1): 11-25.

Dunn, A. J., A. H. Swiergiel and R. de Beaurepaire (2005). "Cytokines as mediators of depression: what can we learn from animal studies?" *Neurosci Biobehav Rev* **29**(4-5): 891-909.

Ennaceur, A. and J. Delacour (1988). "A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data." *Behav Brain Res* **31**(1): 47-59.

Fang, L., Z. Yao, J. An, X. Chen, Y. Xie, H. Zhao, J. Mao, W. Liang and X. Ma (2016). "Topological Organization of Metabolic Brain Networks in Pre-Chemotherapy Cancer with Depression: A Resting-State PET Study." *PLoS One* **11**(11): e0166049.

Fitzgerald, P. B., A. R. Laird, J. Maller and Z. J. Daskalakis (2008). "A meta-analytic study of changes in brain activation in depression." *Hum Brain Mapp* **29**(6): 683-695.

Garcia-Hernandez, A. F., J. C.; Colom, L. V. (2010). "Understanding synchronization and hyper-synchronization in the the septo-hippocampal system." *BMC Neuroscience* **11**: 124.

Gilliam, F. G., B. M. Maton, R. C. Martin, S. M. Sawrie, R. E. Faught, J. W. Hugg, M. Viikinsalo and R. I. Kuzniecky (2007). "Hippocampal 1H-MRSI correlates with severity of depression symptoms in temporal lobe epilepsy." *Neurology* **68**(5): 364-368.

Goffin, K., G. Bormans, C. Casteels, B. Bosier, D. M. Lambert, I. D. Grachev, W. Van Paesschen and K. Van Laere (2008). "An in vivo [18F]MK-9470 microPET study of type 1 cannabinoid receptor binding in Wistar rats after chronic administration of valproate and levetiracetam." *Neuropharmacology* **54**(7): 1103-1106.

Gorski, J. A., S. A. Balogh, J. M. Wehner and K. R. Jones (2003). "Learning deficits in forebrain-restricted brain-derived neurotrophic factor mutant mice." *Neuroscience* **121**(2): 341-354.

Greicius, M. D., B. H. Flores, V. Menon, G. H. Glover, H. B. Solvason, H. Kenna, A. L. Reiss and A. F. Schatzberg (2007). "Resting-state functional connectivity in major

depression: abnormally increased contributions from subgenual cingulate cortex and thalamus." Biol Psychiatry **62**(5): 429-437.

Gross, C. G. (2000). "Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma." Nat Rev Neurosci **1**(1): 67-73.

Groticke, I., K. Hoffmann and W. Loscher (2007). "Behavioral alterations in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice." Exp Neurol **207**(2): 329-349.

Guo, Y., F. Gao, S. Wang, Y. Ding, H. Zhang, J. Wang and M. P. Ding (2009). "In vivo mapping of temporospatial changes in glucose utilization in rat brain during epileptogenesis: an 18F-fluorodeoxyglucose-small animal positron emission tomography study." Neuroscience **162**(4): 972-979.

Hagihara, H., M. Hara, K. Tsunekawa, Y. Nakagawa, M. Sawada and K. Nakano (2005). "Tonic-clonic seizures induce division of neuronal progenitor cells with concomitant changes in expression of neurotrophic factors in the brain of pilocarpine-treated mice." Brain Res Mol Brain Res **139**(2): 258-266.

Hakamata, Y., K. Tahara, H. Uchida, Y. Sakuma, M. Nakamura, A. Kume, T. Murakami, M. Takahashi, R. Takahashi, M. Hirabayashi, M. Ueda, I. Miyoshi, N. Kasai and E.

Izquierdo, I., Barros, D.M., Mello e Souza, T., de Souza, M.M., Izquierdo, L.A., Medina, J.H (1998). "Mechanisms for memory types differ." Nature, **393**: 635-6.

Kobayashi (2001). "Green fluorescent protein-transgenic rat: a tool for organ transplantation research." Biochem Biophys Res Commun **286**(4): 779-785.

Hallbergson, A. F., C. Gnatenco and D. A. Peterson (2003). "Neurogenesis and brain injury: managing a renewable resource for repair." J Clin Invest **112**(8): 1128-1133.

Hartmann, L. M., DaCosta, J.C. (2013). "Desenvolvimento do radiofármaco 18F-flumazenil para a realização de exames de PET/CT." Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Hattiangady, B., M. S. Rao and A. K. Shetty (2004). "Chronic temporal lobe epilepsy is associated with severely declined dentate neurogenesis in the adult hippocampus." Neurobiol Dis **17**(3): 473-490.

Hattiangady, B. and A. K. Shetty (2008). "Implications of decreased hippocampal neurogenesis in chronic temporal lobe epilepsy." Epilepsia **49 Suppl 5**: 26-41.

Hattiangady, B. and A. K. Shetty (2010). "Decreased neuronal differentiation of newly generated cells underlies reduced hippocampal neurogenesis in chronic temporal lobe epilepsy." Hippocampus **20**(1): 97-112.

Hattiangady, B. and A. K. Shetty (2012). "Neural stem cell grafting counteracts hippocampal injury-mediated impairments in mood, memory, and neurogenesis." Stem Cells Transl Med **1**(9): 696-708.

Helmstaedter, C., M. Kurthen, S. Lux, M. Reuber and C. E. Elger (2003). "Chronic epilepsy and cognition: a longitudinal study in temporal lobe epilepsy." Ann Neurol **54**(4): 425-432.

- Holmes, M. D., C. B. Dodrill, R. L. Kutsy, G. A. Ojemann and J. W. Miller (2001). "Is the left cerebral hemisphere more prone to epileptogenesis than the right?" Epileptic Disord **3**(3): 137-141.
- Hu, H., L. Su, Y. Q. Xu, H. Zhang and L. W. Wang (2010). "Behavioral and [F-18] fluorodeoxyglucose micro positron emission tomography imaging study in a rat chronic mild stress model of depression." Neuroscience **169**(1): 171-181.
- Jain, S., S. Y. Yoon, L. Zhu, J. Brodbeck, J. Dai, D. Walker and Y. Huang (2012). "Arf4 determines dentate gyrus-mediated pattern separation by regulating dendritic spine development." PLoS One **7**(9): e46340.
- Jang, D. P., S. H. Lee, S. Y. Lee, C. W. Park, Z. H. Cho and Y. B. Kim (2009). "Neural responses of rats in the forced swimming test: [F-18]FDG micro PET study." Behav Brain Res **203**(1): 43-47.
- Jesús Pastor, R. G. d. S. a. G. J. O. (2012). Jesús Pastor, Rafael García de Sola and Guillermo J. Ortega. Epilepsy - Histological, Electroencephalographic and Psychological Aspects. D. Stevanovic, InTech.
- Jiruska, P., M. de Curtis, J. G. Jefferys, C. A. Schevon, S. J. Schiff and K. Schindler (2013). "Synchronization and desynchronization in epilepsy: controversies and hypotheses." J Physiol **591**(4): 787-797.
- Jupp, B., J. Williams, D. Binns, R. J. Hicks, L. Cardamone, N. Jones, S. Rees and T. J. O'Brien (2012). "Hypometabolism precedes limbic atrophy and spontaneous recurrent seizures in a rat model of TLE." Epilepsia **53**(7): 1233-1244.
- Jupp, B. W., J.; Binns, D.; Hicks, R.; O'Brien, T. (2007). "Imaging small animal models of epileptogenesis." Neurology Asia **12**: 51-54.
- Kanner, A. M., S. C. Schachter, J. J. Barry, D. C. Hesdorffer, M. Mula, M. Trimble, B. Hermann, A. E. Ettinger, D. Dunn, R. Caplan, P. Ryvlin, F. Gilliam and W. C. LaFrance, Jr. (2012). "Depression and epilepsy: epidemiologic and neurobiologic perspectives that may explain their high comorbid occurrence." Epilepsy Behav **24**(2): 156-168.
- Kiessling, F. and B. J. Pichler (2011). Small Animal Imaging: Basics and Practical Guide, Springer.
- Kodali, M., V. K. Parihar, B. Hattiangady, V. Mishra, B. Shuai and A. K. Shetty (2015). "Resveratrol prevents age-related memory and mood dysfunction with increased hippocampal neurogenesis and microvasculature, and reduced glial activation." Sci Rep **5**: 8075.
- Koh, S., R. Magid, H. Chung, C. D. Stine and D. N. Wilson (2007). "Depressive behavior and selective down-regulation of serotonin receptor expression after early-life seizures: reversal by environmental enrichment." Epilepsy Behav **10**(1): 26-31.
- Kondziella, D., S. Alvestad, A. Vaaler and U. Sonnewald (2007). "Which clinical and experimental data link temporal lobe epilepsy with depression?" J Neurochem **103**(6): 2136-2152.
- Kornblum, H. I., D. M. Araujo, A. J. Annala, K. J. Tatsukawa, M. E. Phelps and S. R. Cherry (2000). "In vivo imaging of neuronal activation and plasticity in the rat brain by

- high resolution positron emission tomography (microPET)." *Nat Biotechnol* **18**(6): 655-660.
- Kuruba, R., B. Hattiangady and A. K. Shetty (2009). "Hippocampal neurogenesis and neural stem cells in temporal lobe epilepsy." *Epilepsy Behav* **14 Suppl 1**: 65-73.
- Lancelot, S. and L. Zimmer (2010). "Small-animal positron emission tomography as a tool for neuropharmacology." *Trends Pharmacol Sci* **31**(9): 411-417.
- Leal, M. M., Z. S. Costa-Ferro, B. S. Souza, C. M. Azevedo, T. M. Carvalho, C. M. Kaneto, R. H. Carvalho, R. R. Dos Santos and M. B. Soares (2014). "Early transplantation of bone marrow mononuclear cells promotes neuroprotection and modulation of inflammation after status epilepticus in mice by paracrine mechanisms." *Neurochem Res* **39**(2): 259-268.
- Lee, E. M., G. Y. Park, K. C. Im, S. T. Kim, C. W. Woo, J. H. Chung, K. S. Kim, J. S. Kim, Y. M. Shon, Y. I. Kim and J. K. Kang (2012). "Changes in glucose metabolism and metabolites during the epileptogenic process in the lithium-pilocarpine model of epilepsy." *Epilepsia* **53**(5): 860-869.
- Leite, J. P., Z. A. Bortolotto and E. A. Cavalheiro (1990). "Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy." *Neurosci Biobehav Rev* **14**(4): 511-517.
- Liao, W., Z. Zhang, Z. Pan, D. Mantini, J. Ding, X. Duan, C. Luo, G. Lu and H. Chen (2010). "Altered functional connectivity and small-world in mesial temporal lobe epilepsy." *PLoS One* **5**(1): e8525.
- Love, C., M. B. Tomas, G. G. Tronco and C. J. Palestro (2005). "FDG PET of infection and inflammation." *Radiographics* **25**(5): 1357-1368.
- Ma, J. and L. S. Leung (2004). "Schizophrenia-like behavioral changes after partial hippocampal kindling." *Brain Res* **997**(1): 111-118.
- Maccotta, L., B. J. He, A. Z. Snyder, L. N. Eisenman, T. L. Benzinger, B. M. Ances, M. Corbetta and R. E. Hogan (2013). "Impaired and facilitated functional networks in temporal lobe epilepsy." *Neuroimage Clin* **2**: 862-872.
- Maneshi, M., F. Moeller, F. Fahoum, J. Gotman and C. Grova (2012). "Resting-state connectivity of the sustained attention network correlates with disease duration in idiopathic generalized epilepsy." *PLoS One* **7**(12): e50359.
- Matsui, T., N. Nakata, S. Nagai, A. Nakatani, M. Takahashi, T. Momose, K. Ohtomo and S. Koyasu (2009). "Inflammatory cytokines and hypoxia contribute to 18F-FDG uptake by cells involved in pannus formation in rheumatoid arthritis." *J Nucl Med* **50**(6): 920-926.
- Mauceri, D., H. E. Freitag, A. M. Oliveira, C. P. Bengtson and H. Bading (2011). "Nuclear calcium-VEGFD signaling controls maintenance of dendrite arborization necessary for memory formation." *Neuron* **71**(1): 117-130.
- Mazarati, A., P. Siddarth, R. A. Baldwin, D. Shin, R. Caplan and R. Sankar (2008). "Depression after status epilepticus: behavioural and biochemical deficits and effects of fluoxetine." *Brain* **131**(Pt 8): 2071-2083.

- Mazarati, A. M., E. Pineda, D. Shin, D. Tio, A. N. Taylor and R. Sankar (2010). "Comorbidity between epilepsy and depression: role of hippocampal interleukin-1beta." Neurobiol Dis **37**(2): 461-467.
- Mazarati, A. M., D. Shin, Y. S. Kwon, A. Bragin, E. Pineda, D. Tio, A. N. Taylor and R. Sankar (2009). "Elevated plasma corticosterone level and depressive behavior in experimental temporal lobe epilepsy." Neurobiol Dis **34**(3): 457-461.
- McAvoy, K., A. Besnard and A. Sahay (2015). "Adult hippocampal neurogenesis and pattern separation in DG: a role for feedback inhibition in modulating sparseness to govern population-based coding." Front Syst Neurosci **9**: 120.
- Mello, L. E., E. A. Cavalheiro, A. M. Tan, W. R. Kupfer, J. K. Pretorius, T. L. Babb and D. M. Finch (1993). "Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting." Epilepsia **34**(6): 985-995.
- Mirrione, M. M., W. K. Schiffer, J. S. Fowler, D. L. Alexoff, S. L. Dewey and S. E. Tsirka (2007). "A novel approach for imaging brain-behavior relationships in mice reveals unexpected metabolic patterns during seizures in the absence of tissue plasminogen activator." Neuroimage **38**(1): 34-42.
- Mirrione, M. M., W. K. Schiffer, M. Siddiq, S. L. Dewey and S. E. Tsirka (2006). "PET imaging of glucose metabolism in a mouse model of temporal lobe epilepsy." Synapse **59**(2): 119-121.
- Mirrione, M. M. and S. E. Tsirka. (2011). "A Functional Role for Microglia in Epilepsy." Clinical and Genetic Aspects of Epilepsy, Dr. Zaid Afawi (Ed.), InTech.
- Morbelli, S., A. Drzezga, R. Perneczky, G. B. Frisoni, A. Caroli, B. N. van Berckel, R. Ossenkoppele, E. Guedj, M. Didic, A. Brugnolo, G. Sambuceti, M. Pagani, E. Salmon and F. Nobili (2012). "Resting metabolic connectivity in prodromal Alzheimer's disease. A European Alzheimer Disease Consortium (EADC) project." Neurobiol Aging **33**(11): 2533-2550.
- Morgan, V. L., B. P. Rogers, H. H. Sonmezturk, J. C. Gore and B. Abou-Khalil (2011). "Cross hippocampal influence in mesial temporal lobe epilepsy measured with high temporal resolution functional magnetic resonance imaging." Epilepsia **52**(9): 1741-1749.
- Mormann, F. L., K.; David, P.; Elger, C. A. (2000). "Mean phase coherence as a measure for phase synchronization and its application to the EEG of epilepsy patients." Physica D: Nonlinear Phenomena **144**: 358-369.
- Mortazavi, F., M. Ericson, D. Story, V. D. Hulce and G. L. Dunbar (2005). "Spatial learning deficits and emotional impairments in pentylenetetrazole-kindled rats." Epilepsy Behav **7**(4): 629-638.
- O'Brien, T. J., K. Miles, R. Ware, M. J. Cook, D. S. Binns and R. J. Hicks (2008). "The cost-effective use of 18F-FDG PET in the presurgical evaluation of medically refractory focal epilepsy." J Nucl Med **49**(6): 931-937.
- Osehobo, P., B. Adams, M. Sazgar, Y. Xu, R. J. Racine and M. Fahnestock (1999). "Brain-derived neurotrophic factor infusion delays amygdala and perforant path kindling without

- affecting paired-pulse measures of neuronal inhibition in adult rats." Neuroscience **92**(4): 1367-1375.
- Papash, A. I. and Y. G. Alenitsky (2008). "Commercial cyclotrons. Part I: Commercial cyclotrons in the energy range 10-30 MeV for isotope production." Physics of Particles and Nuclei **39**(4): 597-631.
- Parente, A., P. K. Feltes, D. Vallez Garcia, J. W. Sijbesma, C. M. Moriguchi Jeckel, R. A. Dierckx, E. F. de Vries and J. Doorduyn (2016). "Pharmacokinetic Analysis of ¹¹C-PBR28 in the Rat Model of Herpes Encephalitis: Comparison with (R)-¹¹C-PK11195." J Nucl Med **57**(5): 785-791.
- Park, D. H., D. J. Eve, J. Musso, 3rd, S. K. Klasko, E. Cruz, C. V. Borlongan and P. R. Sanberg (2009). "Inflammation and stem cell migration to the injured brain in higher organisms." Stem Cells Dev **18**(5): 693-702.
- Park, G. Y., E. M. Lee, M. S. Seo, Y. J. Seo, J. S. Oh, W. C. Son, K. S. Kim, J. S. Kim, J. K. Kang and K. S. Kang (2015). "Preserved Hippocampal Glucose Metabolism on ¹⁸F-FDG PET after Transplantation of Human Umbilical Cord Blood-derived Mesenchymal Stem Cells in Chronic Epileptic Rats." J Korean Med Sci **30**(9): 1232-1240.
- Parthoens, J., S. Servaes, J. Verhaeghe, S. Stroobants and S. Staelens (2015). "Prelimbic Cortical Injections of a GABA Agonist and Antagonist: In Vivo Quantification of the Effect in the Rat Brain Using [(18)F] FDG MicroPET." Mol Imaging Biol **17**(6): 856-864.
- Pertusa, M., S. Garcia-Matas, H. Mammeri, A. Adell, T. Rodrigo, J. Mallet, R. Cristofol, C. Sarkis and C. Sanfeliu (2008). "Expression of GDNF transgene in astrocytes improves cognitive deficits in aged rats." Neurobiol Aging **29**(9): 1366-1379.
- Phelps, M. E. (2000). "Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(16): 9226-9233.
- Pomykala, K. L., P. A. Ganz, J. E. Bower, L. Kwan, S. A. Castellon, S. Mallam, I. Cheng, R. Ahn, E. C. Breen, M. R. Irwin and D. H. Silverman (2013). "The association between pro-inflammatory cytokines, regional cerebral metabolism, and cognitive complaints following adjuvant chemotherapy for breast cancer." Brain Imaging Behav **7**(4): 511-523.
- Porsolt, R. D., M. Le Pichon and M. Jalfre (1977). "Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments." Nature **266**(5604): 730-732.
- Powell, T. R., C. Fernandes and L. C. Schalkwyk (2012). "Depression-Related Behavioral Tests." Curr Protoc Mouse Biol **2**(2): 119-127.
- Priel, M. R., Dos Santos, N. F., Cavalheiro, E. A. (1996). "Developmental aspects of the pilocarpine model of epilepsy." Epilepsy Research **26**(1): 115-121.
- Racine, R. J. (1972). "Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **32**(3): 281-294.
- Reibel, S., Y. Larmet, B. T. Le, J. Carnahan, C. Marescaux and A. Depaulis (2000). "Brain-derived neurotrophic factor delays hippocampal kindling in the rat." Neuroscience **100**(4): 777-788.

- Sacher, J., J. Neumann, T. Funfstuck, A. Soliman, A. Villringer and M. L. Schroeter (2012). "Mapping the depressed brain: a meta-analysis of structural and functional alterations in major depressive disorder." J Affect Disord **140**(2): 142-148.
- Salzberg, M., T. Taher, M. Davie, R. Carne, R. J. Hicks, M. Cook, M. Murphy, A. Vinton and T. J. O'Brien (2006). "Depression in temporal lobe epilepsy surgery patients: an FDG-PET study." Epilepsia **47**(12): 2125-2130.
- Samuels, B. A. and R. Hen (2011). "Neurogenesis and affective disorders." Eur J Neurosci **33**(6): 1152-1159.
- Schiffer, W. K., M. M. Mirrione, A. Biegon, D. L. Alexoff, V. Patel and S. L. Dewey (2006). "Serial microPET measures of the metabolic reaction to a microdialysis probe implant." J Neurosci Methods **155**(2): 272-284.
- Schindler, K., H. Leung, C. E. Elger and K. Lehnertz (2007). "Assessing seizure dynamics by analysing the correlation structure of multichannel intracranial EEG." Brain **130**(Pt 1): 65-77.
- Schmidt, H. D. and R. S. Duman (2010). "Peripheral BDNF produces antidepressant-like effects in cellular and behavioral models." Neuropsychopharmacology **35**(12): 2378-2391.
- Scorza, F. A., E. R. Sanabria, L. Calderazzo and E. A. Cavalheiro (1998). "Glucose utilization during interictal intervals in an epilepsy model induced by pilocarpine: a qualitative study." Epilepsia **39**(10): 1041-1045.
- Shetty, A. K. (2014). "Hippocampal injury-induced cognitive and mood dysfunction, altered neurogenesis, and epilepsy: can early neural stem cell grafting intervention provide protection?" Epilepsy Behav **38**: 117-124.
- Shirayama, Y., A. C. Chen, S. Nakagawa, D. S. Russell and R. S. Duman (2002). "Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression." J Neurosci **22**(8): 3251-3261.
- Shors, T. J., G. Miesegaes, A. Beylin, M. Zhao, T. Rydel and E. Gould (2001). "Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories." Nature **410**(6826): 372-376.
- Snyder, J. S., A. Soumier, M. Brewer, J. Pickel and H. A. Cameron (2011). "Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour." Nature **476**(7361): 458-461.
- Specht, U., T. May, R. Schulz, M. Rohde, A. Ebner, R. C. Schmidt, M. Schutz and P. Wolf (1997). "Cerebellar atrophy and prognosis after temporal lobe resection." J Neurol Neurosurg Psychiatry **62**(5): 501-506.
- Stretton, J., G. P. Winston, M. Sidhu, S. Bonelli, M. Centeno, C. Vollmar, R. A. Cleary, E. Williams, M. R. Symms, M. J. Koepp, P. J. Thompson and J. S. Duncan (2013). "Disrupted segregation of working memory networks in temporal lobe epilepsy." Neuroimage Clin **2**: 273-281.
- Su, L., Y. Cai, Y. Xu, A. Dutt, S. Shi and E. Bramon (2014). "Cerebral metabolism in major depressive disorder: a voxel-based meta-analysis of positron emission tomography studies." BMC Psychiatry **14**: 321.

- Tepmongkol, S., T. Srikijvilaikul and P. Vasavid (2013). "Factors affecting bilateral temporal lobe hypometabolism on 18F-FDG PET brain scan in unilateral medial temporal lobe epilepsy." *Epilepsy Behav* **29**(2): 386-389.
- Theodore, W. H., K. Kelley, M. T. Toczek and W. D. Gaillard (2004). "Epilepsy duration, febrile seizures, and cerebral glucose metabolism." *Epilepsia* **45**(3): 276-279.
- Turski, W. A., E. A. Cavalheiro, Z. A. Bortolotto, L. M. Mello, M. Schwarz and L. Turski (1984). "Seizures produced by pilocarpine in mice: a behavioral, electroencephalographic and morphological analysis." *Brain Res* **321**(2): 237-253.
- Turski, W. A., E. A. Cavalheiro, M. Schwarz, S. J. Czuczwar, Z. Kleinrok and L. Turski (1983). "Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study." *Behav Brain Res* **9**(3): 315-335.
- Upadhyay, D., B. Hattiangady, G. A. Shetty, G. Zanirati, M. Kodali and A. K. Shetty (2016). "Neural Stem Cell or Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived GABA-ergic Progenitor Cell Grafting in an Animal Model of Chronic Temporal Lobe Epilepsy." *Curr Protoc Stem Cell Biol* **38**: 2D 7 1-2D 7 47.
- Vaessen, M. J., J. F. Jansen, M. C. Vlooswijk, P. A. Hofman, H. J. Majoie, A. P. Aldenkamp and W. H. Backes (2012). "White matter network abnormalities are associated with cognitive decline in chronic epilepsy." *Cereb Cortex* **22**(9): 2139-2147.
- Vallez Garcia, D., A. Otte, R. A. Dierckx and J. Doorduyn (2016). "Three Month Follow-Up of Rat Mild Traumatic Brain Injury: A Combined [18F]FDG and [11C]PK11195 Positron Emission Study." *J Neurotrauma* **33**(20): 1855-1865.
- van Dellen, E., L. Douw, J. C. Baayen, J. J. Heimans, S. C. Ponten, W. P. Vandertop, D. N. Velis, C. J. Stam and J. C. Reijneveld (2009). "Long-term effects of temporal lobe epilepsy on local neural networks: a graph theoretical analysis of corticography recordings." *PLoS One* **4**(11): e8081.
- Venturin, G. T., S. Greggio, D. R. Marinowic, G. Zanirati, M. Cammarota, D. C. Machado and J. C. DaCosta (2011). "Bone marrow mononuclear cells reduce seizure frequency and improve cognitive outcome in chronic epileptic rats." *Life Sci* **89**(7-8): 229-234.
- Vezzani, A., E. Aronica, A. Mazarati and Q. J. Pittman (2013). "Epilepsy and brain inflammation." *Exp Neurol* **244**: 11-21.
- Vezzani, A., S. Balosso and T. Ravizza (2008). "The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy." *Brain Behav Immun* **22**(6): 797-803.
- Vezzani, A. and T. Granata (2005). "Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence." *Epilepsia* **46**(11): 1724-1743.
- Vlooswijk, M. C., M. J. Vaessen, J. F. Jansen, M. C. de Krom, H. J. Majoie, P. A. Hofman, A. P. Aldenkamp and W. H. Backes (2011). "Loss of network efficiency associated with cognitive decline in chronic epilepsy." *Neurology* **77**(10): 938-944.
- Xi, W., M. Tian and H. Zhang (2011). "Molecular imaging in neuroscience research with small-animal PET in rodents." *Neurosci Res* **70**(2): 133-143.
- Xia, Y., Y. Lai, L. Lei, Y. Liu and D. Yao (2009). "Left hemisphere predominance of pilocarpine-induced rat epileptiform discharges." *J Neuroeng Rehabil* **6**: 42.

Yau, S. Y., A. Li and K. F. So (2015). "Involvement of Adult Hippocampal Neurogenesis in Learning and Forgetting." Neural Plast **2015**: 717958.

Zanirati, G., P. N. Azevedo, D. R. Marinowic, F. Rodrigues, A. C. de Oliveira Dias, G. T. Venturin, S. Greggio, F. Simao and J. C. DaCosta (2015). "Transplantation of bone marrow mononuclear cells modulates hippocampal expression of growth factors in chronically epileptic animals." CNS Neurosci Ther **21**(5): 463-471.

Zhang, L., Y. Guo, H. Hu, J. Wang, Z. Liu and F. Gao (2015). "FDG-PET and NeuN-GFAP immunohistochemistry of hippocampus at different phases of the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy." Int J Med Sci **12**(3): 288-294.

Zhang, Z., G. Lu, Y. Zhong, Q. Tan, W. Liao, Z. Chen, J. Shi and Y. Liu (2009). "Impaired perceptual networks in temporal lobe epilepsy revealed by resting fMRI." J Neurol **256**(10): 1705-1713.

Zimmer, E. R., A. Leuzy, A. L. Benedet, J. Breitner, S. Gauthier and P. Rosa-Neto (2014). "Tracking neuroinflammation in Alzheimer's disease: the role of positron emission tomography imaging." J Neuroinflammation **11**: 120.

Zimmer, E. R., M. J. Parent, A. C. Cuello, S. Gauthier and P. Rosa-Neto (2014). "MicroPET imaging and transgenic models: a blueprint for Alzheimer's disease clinical research." Trends Neurosci **37**(11): 629-641.

8. ANEXOS

8.1 ANEXO I: Carta Aprovação CEUA PUCRS



SIPESQ

Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 7293

Porto Alegre, 5 de julho de 2016.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "ESTUDO LONGITUDINAL DO EFEITO DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA NO PROCESSO DE EPILEPTOGÊNESE IN VIVO" coordenado por JADERSON COSTA DA COSTA.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está autorizada a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

| Nº de Animais | Espécie | Duração do Projeto |
|---------------|-------------------|-------------------------|
| 72 | Rattus norvegicus | 05/07/2016 - 05/07/2018 |

Atenciosamente,

Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

Capítulo III

Transplante de células-tronco neurais (NSC) derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas humanas (hiPSC) após *status epilepticus* ameniza o desenvolvimento de epilepsia crônica e preserva funções de memória, cognição e depressão.

RESUMO

Várias alterações epileptogênicas e inflamação contínua acontece após indução de *status epilepticus* (SE), que pode resultar no desenvolvimento de epilepsia do lobo temporal (ELT) caracterizada por crises espontâneas e recorrentes (CERs) e prejuízos na cognição, memória e humor. Nós testamos se a intervenção precoce após SE com o transplante intrahipocampal de células-tronco neurais (NSC) derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas humanas (hiPSC) é eficaz para reduzir a frequência de CERs e a disfunção cognitiva e comportamento depressivo. Ratos F344 machos foram utilizados para indução de SE por ácido caínico (KA) durante duas horas. Após 7 dias da indução de SE os animais receberam o transplante intrahipocampal de hNSCs (3 injeções/bilateral, ~ 100.000 células). Animais do grupo Sham receberam transplante intrahipocampal de meio celular ao invés de hNSC, e animais do grupo SE receberam apenas a injeção de KA, sem procedimentos cirúrgicos. A monitoração das CERs de sessenta e quatro horas no 3º mês após o SE revelaram diminuição das CERs nos animais transplantados, em comparação com animais dos grupos Sham ou SE. Sete dias de gravações contínuas de vídeo-EEG no quarto mês após SE corroboraram com esses achados. Além disso, os animais transplantados mostraram habilidade para discernir pequenas mudanças no ambiente (função de separação de padrões), habilidade para formar memórias de reconhecimento e localização de objetos, bem como redução da disfunção humoral e depressiva no teste de preferência de sacarose e teste de alimentação relacionado à depressão. Em contraste, os ratos epiléticos tanto do grupo Sham quanto do grupo SE mostraram disfunção de separação de padrões, distúrbios de reconhecimento e memória de localização, bem como comportamento depressivo. As análises histológicas realizadas 4 meses após o transplante revelaram excelente sobrevivência das células transplantadas nos hipocampos e se diferenciaram na maior parte em neurônios NeuN+ (~ 87%). Também foi encontrado nos hipocampos dos animais transplantados alguns neurônios GABA-érgicos (~ 12%), astrócitos (11-16%) e Ki-67+ células em proliferação (~1%). Contudo, as células diferenciadas a partir das hNSC transplantadas não apresentaram a presença de Oct-4+. Além disso, o transplante de hNSC aumentou a neurogênese no hipocampo com migração aberrante reduzida dos novos neurônios, modulou a hipertrofia dos astrócitos e a ativação da microglia e preservou interneurônios positivos ao neuropeptídeo Y e à parvalbumina.

Assim, o transplante precoce de NSC derivadas de hiPSC no hipocampo após SE atenua consideravelmente a epilepsia crônica induzida e preserva a função cognitiva e melhora o comportamento depressivo.

ABSTRACT

Multiple epileptogenic changes and incessant inflammation ensue after status epilepticus (SE) induced brain injury, which in due course result in chronic temporal lobe epilepsy typified by spontaneous recurrent seizures (SRS) and impairments in cognition, memory and mood. We tested whether early intervention after SE with grafting of hiPSC-derived neural stem cells (hNSCs) into hippocampi is efficacious for curbing SRS and thwarting cognitive, memory and mood dysfunction. Young male F344 rats first underwent kainic acid induced SE for two hours and then received grafts of hNSCs into hippocampi at 7 days post-SE (3 grafts/side, ~100,000 cells/graft). Other cohorts of rats underwent similar SE but received either sham-grafting surgery or maintained as epilepsy-only controls. Sixty-four hour observations in the 3rd month after SE revealed diminished SRS in grafted animals, in comparison to animals in sham-grafted or epilepsy only groups. Seven days of continuous video-EEG recordings in the 4th month after SE corroborated these findings. Furthermore, grafted animals displayed competence for discerning minor changes in the environment (pattern separation function), ability for forming recognition and location memories in novel object recognition, object location and object in place tests, and no anhedonia-like behavior in sucrose preference test. Contrastingly, epileptic rats in both sham-grafted and epilepsy-only groups showed pattern separation, recognition and location memory impairments and anhedonia. Histological analyses performed 4 months after grafting revealed robust yield and mostly (~87%) neuronal differentiation of hNSC graft-derived cells. Some GABA-ergic neurons (~12%), astrocytes (11-16%) and Ki-67+ proliferating cells (~1%) were also seen among graft-derived cells. Yet, grafts did not contain Oct-4+ PSCs. In addition, hNSC grafting maintained normal levels of hippocampal neurogenesis with reduced aberrant migration of newly born neurons, modulated the hypertrophy of astrocytes and activation of microglia and rescued host neuropeptide Y and parvalbumin positive interneurons. Thus, hiPSC-derived NSC grafting into the hippocampus early after SE considerably mitigates SE-induced chronic epilepsy and preserves cognitive, memory and mood function.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste projeto foi verificar se células-tronco neurais derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas humanas (hiPSC-NSC) apresentam potencial terapêutico no controle das crises espontâneas e recorrentes e do dano neuronal progressivo induzido pela epilepsia experimental, através da restauração da população e/ou conexões neurais perdidas.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar a frequência de crises espontâneas e recorrentes (CERs) após o transplante intrahipocamapal das hiPSC-NSC em ratos com epilepsia induzida por ácido cáínico;
- 2) Analisar o desempenho cognitivo dos animais após o transplante das hiPSC-NSC;
- 3) Verificar o comportamento depressivo dos animais após o transplante hiPSC-NSC;
- 4) Investigar a sobrevivência das hiPSC-NSC transplantadas nos hipocampos dos animais com epilepsia crônica;
- 5) Avaliar a diferenciação das hiPSC-NSC transplantadas com diferentes marcadores neuronais, gliais, proliferação e pluripotência celular;
- 6) Analisar parâmetros como neurogênese, gliose reativa, microglia ativada, e preservação de interneurônios GABAérgicos nos hipocampos após o transplante das hiPSC-NSC em ratos com epilepsia induzida por ácido cáínico.

2. METODOLOGIA

Este estudo foi realizado durante o período de doutorado sanduíche no Institute for Regenerative Medicine da Texas A&M University Health Science Center, o qual possui a infraestrutura necessária para a realização dos experimentos.

2.1 GERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO NEURAIS (NSC) A PARTIR DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTE INDUZIDAS HUMANAS (hiPSC)

O protocolo seguido para a indução de células-tronco neurais a partir de células-tronco pluripotentes induzidas humanas (hiPSC) utilizando o meio de indução neural Gibco® PSC. As placas de seis poços foram preparadas com a matriz Geltrex (Termo Fisher Scientific), e incubadas por uma hora a 37°C. Seguindo o protocolo, as hiPSCs foram cultivadas em meio E8 (E8, do inglês, *Essential 8 Basal Medium*, Gibco). Após 24 horas, o meio E8 foi trocado para o meio de indução neural (NIM, do inglês, *Neural Induction Medium*), o qual consiste em meio Neurobasal e Suplemento de Indução Neural (Gibco). O NIM foi trocado todos os dias, e no sexto dia de indução neural, as células começaram a alcançar a confluência máxima (80-90%) e todas as colônias de diferenciação não-neural foram removidas. No sétimo dia de indução neural, as hNSCs (P0) estavam prontas para serem transferidas, e então, a expansão neural foi iniciada. Após as placas serem incubadas com Geltrex, as células foram cultivadas em um meio de expansão neural (NEM, do inglês, *Neural Expansion Medium*), o qual consiste em meio Neurobasal, Advanced DMEMF-12 e Suplemento de Indução Neural (Gibco). As células foram removidas das placas com a utilização do reagente de dissociação celular StemPro Accutase (Gibco). Em seguida, foram incubadas com o inibidor Y27632 ROCK (Sigma-Aldrich) overnight. No dia seguinte, o NEM foi completamente removido para eliminar o inibidor ROCK. Após, as hNSC seguiram sendo expandidas apenas com o NEM. O meio foi trocado em dias alternados, e normalmente, as hNSCs alcançaram confluência entre 4 e 6 dias após o início de cada passagem.

2.2 ANIMAIS E INDUÇÃO DO MODELO DE ÁCIDO CAÍNICO (KA)

Os ratos Fisher 344 (F344) foram obtidos de Harlan (Indianapolis, IN). Nós induzimos SE em ratos F344 machos jovens (40 dias) via injeções intraperitoneais de ácido caínico (3.0 mg/Kg peso corporal) até que eles exibissem SE. As crises foram analisadas utilizando a escala de Racine (Racine 1972) e terminadas duas horas depois por diazepam (5.0 mg/kg) como descrito em estudos prévios (Rao, Hattiangady et al. 2006, Hattiangady, Rao et al. 2008). Todos os protocolos de animais foram revisados e aprovados pelo Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) do Central Texas Veterans Health Care System, Temple TX. Os experimentos realizados estão ilustrados na Figura 1.

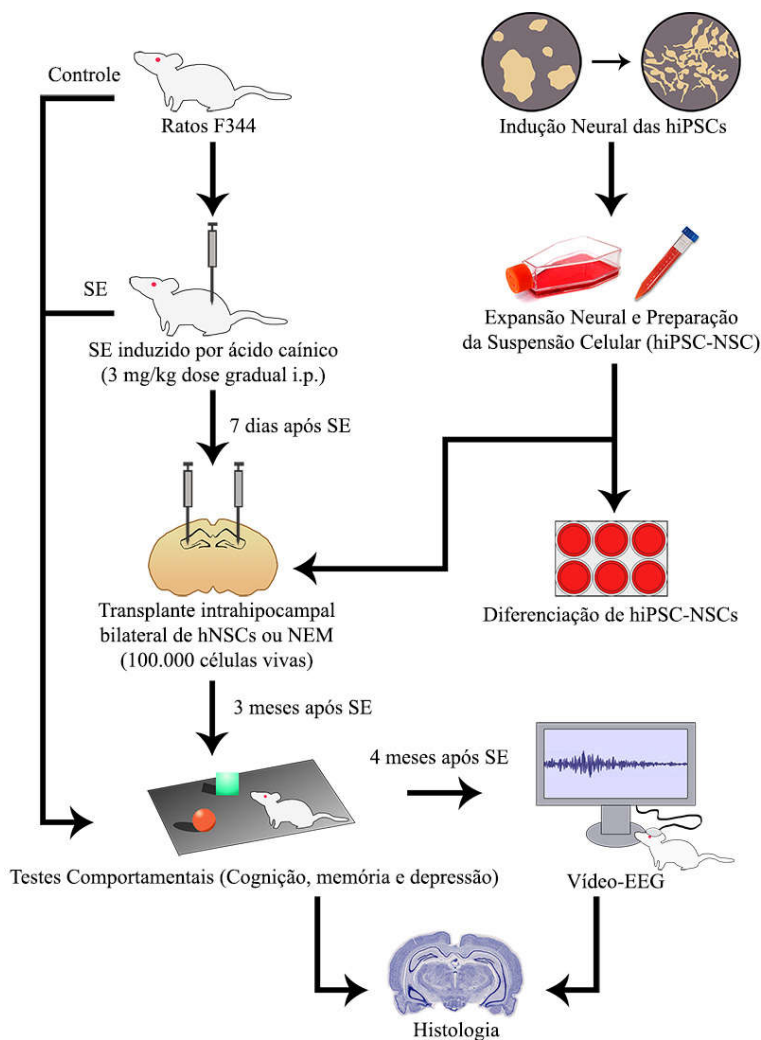


Figura 1. Delineamento experimental. Do topo até a direita está exemplificada a preparação das NSCs derivadas de hiPSC para o transplante. O processo inclui a expansão de hiPSC como corpos embrionários

seguidos de indução neural e geração de hNSCs. Os próximos passos consistem na expansão das hNSCs e no dia do transplante, a suspensão celular é preparada para o transplante e o resto é preparado para diferenciação. Da esquerda para baixo estão descritos os passos para a preparação de ratos F344 machos jovens para os grupos que foram para o procedimento cirúrgico receber o transplante cerebral, incluindo os animais do grupo Sham, e o grupo SE que não recebeu nenhum transplante. O status epilepticus (SE) foi induzido através de injeções intraperitoneais graduais de ácido cáinico (KA). Para o transplante, em torno de 100.000 hNSCs derivadas de hiPSC foram transplantadas em três locais do hipocampo de ratos em 7 dias pós-SE. Nos animais do grupo Sham, foi injetado o meio de cultura de expansão neural (NEM) nos mesmos locais do hipocampo onde as hNSC foram injetadas no outro grupo. Os animais que não receberam transplante foram designados aos grupos SE. A frequência do comportamento de crises espontâneas recorrentes (CERs) foi medida 3 meses após SE e as análises das crises por EEG foram feitas ~4 meses após o SE. Os animais foram perfundidos para análise histológica para avaliação dos efeitos do transplante no hipocampo em 4-5 meses após o transplante.

2.3 TRANSPLANTE INTRAHIPOCAMPAL DE hNSC DERIVADAS DE hiPSC

Sete dias após a indução de SE, as hNSC foram transplantadas bilateralmente nos hipocampos dos animais (n=20). O protocolo de transplante foi similar aos descritos nos estudos anteriores do grupo (Hattiangady, Rao et al. 2006, Rao, Hattiangady et al. 2007, Hattiangady e Shetty 2011). Para o transplante, 1 μ L de suspensão celular contendo aproximadamente 100.000 células vivas, foi injetado utilizando-se uma seringa Hamilton de 10 μ L em três locais de cada hipocampo de acordo com as seguintes coordenadas estereotáxicas: (I) antero-posterior (AP)= 3.0 mm a partir do bregma, lateral (ML)=2.0 mm a partir da linha medial, e ventral (V)=3.2 mm a partir da superfície do cérebro; (II) AP=4.0 mm, ML=3.0 mm, V=4.0 mm; (III) AP=4.8 mm, ML=4.0 mm, V=4.0 mm. Também, foi feito o transplante intrahipocampal do meio de expansão neural (NEM) em ratos após SE, seguindo as mesmas coordenadas, servindo como controle celular (n=11). Após, a cirurgia os animais receberam cuidados especiais, incluindo comida macia e hidrogel, e injeções subcutâneas de solução salina (10 mL/dia) por 5 dias após a cirurgia. Além disso, todos os animais que passaram por transplante (seja hNSC ou NEM) foram imuno-suprimidos através de injeções subcutâneas de ciclosporina (10 mg/Kg) a partir de 24-48 horas antes da cirurgia e depois diariamente até a eutanásia.

2.4 DIFERENCIAÇÃO DAS hiPSC-NSC *IN VITRO*

As amostras da suspensão de hiPSC-NSC foram incubadas em placas de cultura de 24 poços revestidas com Poly-L-Ornitina (PO) e incubadas durante 2 horas. Após a remoção da PO, as placas seguiram para incubação com Laminina (20 ug / mL) durante 1 hora, ambas a 37 °C. Após a lavagem da Laminina, a suspensão celular foi transferida para a placa contendo o meio de diferenciação (Meio Neurobasal, B-27 com ácido retinóico, Glutamax, Nonessencial AA, L-Ascórbico, BDNF e GDNF) durante 15 dias. O meio foi trocado a cada dois dias. No 15º dia de diferenciação as células eram lavadas e fixadas em paraformolaldeído 4% (PFA 4%), e após processadas para diferentes protocolos de imunofluorescência para verificar as frações de células estaminais neurais (Nestin), neurônios imaturos (TUJ-1), neurônios GABAérgicos (GABA), astrócitos (GFAP), oligodendrócitos (O1) e pluripotência (Oct-4 e Tra -1).

2.5 MONITORAMENTO DE CRISES ESPONTÂNEAS RECORRENTES (CERS)

Um total de 64 horas de contagem de CERs via observação direta foram realizadas durante o terceiro mês pós-SE em sessões de 4 horas de observação contínua (Rao, Hattiangady et al. 2006, Rao, Hattiangady et al. 2007, Waldau, Hattiangady et al. 2010, Hattiangady, Kuruba et al. 2011). As crises foram observadas durante o dia por pesquisadores treinados, evitando ruídos e atividades que pudessem estressar os animais durante as sessões de monitoração. As crises foram contadas com a utilização da escala de Racine (Racine 1972). Após a conclusão de todas as sessões, a média de frequência de todas as CER, a frequência de CER estágio V, a média de duração de cada CER, e o tempo total de duração de cada crise foram calculados.

2.6 MONITORAMENTO DE CERS VIA VÍDEO-ENCEFALOGRAMA (VIDEO-EEG)

Além da quantificação de CERs via monitoração direta, quatro meses após a indução de SE, vídeo-encefalograma (video-EEG) foi gravado continuamente por sete dias (24 horas por dia). A frequência de CERs foi medida para cada grupo. As gravações foram

iniciadas somente após todos os testes comportamentais terem sido finalizados. Para este experimento, os animais passaram por cirurgia para implantação de eletrodos, de acordo com o protocolo descrito anteriormente (Hattiangady e Shetty 2011, Hattiangady, Mishra et al. 2014, Upadhya, Hattiangady et al. 2016). Para a gravação do EEG, eletrodos de metal esterilizado com parafusos de montagem (Pastics One) foram implantados epiduralmente, para gravação de EEG do córtex, foi implantado um acima do córtex parietal frontal direito e, como eletrodo de referência, outro acima do cerebelo esquerdo. Um eletrodo intracraniano de aço inoxidável com encaixe (Teflon) também foi colocado no giro denteado direito para gravar o EEG diretamente a partir do hipocampo (Rao, Hattiangady et al. 2006). No crânio, também foi implantado um par de parafusos de ancoragem para segurar os eletrodos de EEG com cimento dental. Todos os eletrodos e parafusos foram cimentados no local, e após, os eletrodos foram presos a um micro plugue, que foi então cimentado na cabeça do animal. Duas semanas após a cirurgia de implantação de eletrodos, a monitoração de EEG foi iniciada, utilizando um sistema de monitoramento de vídeo-EEG digital (AS40 da Grass Telefactor). Após a finalização de todas as análises em vídeo, a média da frequência de todas as crises, e as CERs estágio V foram calculadas.

2.7 TESTES COMPORTAMENTAIS

Vários testes comportamentais foram aplicados para avaliar a função ou memória cognitiva dependentes do hipocampo (Parihar, Hattiangady et al. 2011, Parihar, Hattiangady et al. 2013, Hattiangady, Mishra et al. 2014, Kodali, Parihar et al. 2015). Três meses após SE, para verificar a integridade de diferentes regiões do cérebro envolvidas na função cognitiva, os animais foram testados para memória de reconhecimento de objeto (NORT) para função do córtex perirrinal, teste de localização de objeto (OLT) para função do hipocampo, teste de separação de padrão (PST) para a extensão da neurogênese, teste de local do objeto (OIPT) para testar a integridade do giro do córtex pré-frontal medial, córtex perirrinal e hipocampo. Para avaliar o comportamento depressivo, foi aplicado um teste de depressão relacionado à alimentação (ERDT), e teste de preferência por sacarose (SPT). Todos os protocolos dos testes de comportamento utilizados neste estudo foram descritos recentemente em nosso estudo (Upadhya, Hattiangady et al. 2016).

2.7.1 Teste de Localização do Objeto (OLT)

Este teste examina a habilidade cognitiva de detecção mínima de mudanças no ambiente. Este teste inclui três fases sucessivas com um intervalo entre fases de 15 minutos, ilustrado na Figura 5 (A-C). A primeira fase é a fase de habituação. O animal é colocado no centro de um campo aberto em uma caixa (100 cm, comprimento × 100 cm, largura × 60 cm, altura) para exploração por 5 minutos (Trial 1). A segunda fase é a fase de treino e inicia 15 minutos após a primeira fase, onde coloca-se dois objetos idênticos em lados opostos dentro caixa (Trial 2). O animal é colocado no centro da mesma caixa para explorar livremente os objetos por 5 minutos. A terceira fase é a fase de teste, onde se deixa um dos objetos no mesmo lugar e se coloca o outro em um novo local dentro da caixa (Trial 3). O rato é colocado no centro da caixa em um intervalo de 15 minutos entre cada fase. O movimento do animal na terceira fase foi continuamente registrado e gravado em vídeo utilizando o programa Noldus Ethovision XT. Dados como o tempo gasto na exploração no objeto movido para o novo local, no objeto que ficou no mesmo local e o tempo total gasto foram medidos.

2.7.2 Teste de Reconhecimento de Objetos (NORT)

O paradigma de reconhecimento de objetos (NORT) utiliza a tendência natural que os roedores têm de explorar objetos novos para medir sua memória (Ennaceur e Delacour 1988). Para este experimento, seguimos protocolo previamente descrito por Hattiangady e colaboradores (Hattiangady e Shetty 2008, Upadhya, Hattiangady et al. 2016). Este teste inclui quatro fases sucessivas com um intervalo entre fases de 15 minutos, ilustrado na Figura 6 (A-C). Primeiramente, os animais foram expostos a um campo aberto durante 10 minutos para habituação. No dia seguinte, os animais foram novamente habituados no campo por 5 minutos (Trial 1), e após 15 minutos dois objetos idênticos foram dispostos no campo em posições equidistantes e permitiu-se o animal explorar livremente os objetos por 5 minutos (Trial 2). A terceira fase iniciou-se 15 minutos após, um dos objetos familiares ao animal foi substituído por um objeto novo e da mesma forma, o animal pôde explorar livremente por 5 minutos (Trial 3). O tempo percentual gasto explorando cada objeto foi calculado e expresso como percentual do tempo total de exploração em segundos com o

intuito de avaliar a memória de curta duração. Roedores saudáveis tendem a explorar o objeto novo por mais tempo, demonstrando assim memória quanto ao objeto familiar.

2.7.3 Teste de Separação de Padrão (PST)

Estudos anteriores mostraram que esta tarefa requer níveis normais de neurogênese (Jain, Yoon et al. 2012, McAvoy, Besnard et al. 2015). Este teste inclui três fases sucessivas com um intervalo entre fases de 15 minutos, ilustrado na Figura 7 (A-C). Na primeira fase deste teste os animais são habituados em um campo aberto por 5 minutos (Trial 1). Na segunda fase, 15 minutos após, coloca-se um fundo contendo um determinado padrão no campo, junto com dois objetos idênticos e deixa-se o animal explorar livremente por 5 minutos (Trial 2). A terceira fase inicia 30 minutos após a segunda, um padrão diferente é colocado no fundo da caixa com outros dois objetos idênticos, diferentes dos utilizados na fase 2, e da mesma forma permite-se o animal explorar por mais 5 minutos (Trial 3). A quarta e última fase inicia 15 minutos após a terceira, o mesmo padrão utilizado na fase 3 é mantido no fundo da caixa e um objeto da fase 2 (como objeto novo) é inserido juntamente com um objeto da fase 3 (como objeto familiar) (Trial 4). Os parâmetros medidos incluem a percentagem de tempo gasto com o objeto da fase 2 colocados no fundo com padrão utilizado na fase 3 (Upadhya, Hattiangady et al. 2016).

2.7.4 Teste de Localização de Objetos (OIPT)

Este teste envolve três fases sucessivas com um intervalo de 15 minutos entre cada fase (Fig. 8A-C). A primeira fase é a fase de habituação, onde o animal foi colocado no centro do campo aberto de uma caixa vazia para explorar livremente por 5 minutos (Trial 1). A segunda fase inicia 15 minutos após a primeira, onde quatro objetos diferentes são colocados na caixa (Trial 2). A terceira fase inicia 15 minutos após a segunda, utilizando os mesmos objetos, porém dois deles tem suas posições trocadas (Trial 3). Os parâmetros foram medidos durante a terceira fase através de rastreamento por vídeo e as análises incluem a percentagem de tempo gasto explorando os objetos que tiveram suas posições trocadas.

2.7.5 Teste de alimentação relacionada à depressão (ERDT)

Este teste examina os níveis de depressão e motivação para se alimentar após privação de comida por 24 horas. Esse teste foi adaptado a partir do teste de supressão de alimento (NSFT, do inglês *Novelty-Suppressed Feeding Test*) previamente descrito (Samuels e Hen 2011, Powell, Fernandes et al. 2012). Por outro lado, ratos com depressão demoram a chegar perto da comida ou levam mais tempo para comer. Neste teste, toda comida foi removida das gaiolas dos animais por 24 horas, porém água foi provida durante o período de jejum. Após 24 horas, poucos pellets de comida foram colocados em um pedaço de filtro de papel posicionado em um dos quatro cantos da gaiola em que o animal vive e cada animal foi colocado em um canto oposto à comida, podendo explorar por 5 minutos. Os pellets de comida fresca foram trocados para cada rato para eliminar qualquer problema relacionado a odores. A latência da primeira mordida na ração foi medida e comparada entre os grupos. O animal era excluído caso não mordesse a comida dentro dos 5 minutos de teste. Em condições normais, os animais saudáveis rapidamente se locomovem em direção aos pellets de ração para come-los. Entretanto, os animais com comportamento depressivo levam mais tempo para se dirigir à comida, ou apenas cheiram a comida, mas não a consomem (Upadhya, Hattiangady et al. 2016).

2.7.6 Teste de preferência por sacarose (SPT)

Para analisar a anedonia (perda da capacidade de sentir prazer em atividades prazerosas em condições normais), foi empregado o teste de preferência por sacarose (SPT). Este teste avalia a disfunção de humor em roedores medindo a perda ou redução da preferência por líquidos doces como a solução de sacarose (Snyder, Soumier et al. 2011, Baptista, Saur et al. 2015). Em condições normais, animais saudáveis tendem a mostrar preferência por beber sacarose à água normal. Por outro lado, animais com comportamento depressivo costumam consumir água normal e sacarose em proporções similares. No primeiro dia os animais foram treinados para adaptação à sacarose por 24 horas. Animais foram alojados em gaiolas individuais com livre acesso a duas garrafas idênticas cada uma contendo 100 mL de sacarose 1% e ração provida *ad libitum*. No segundo dia, alocados nas mesmas gaiolas, os animais tiveram livre acesso a duas garrafas, uma contendo 100 mL de

sacarose 1% e a outra contendo 100 mL de água e ração provida ad libitum. No terceiro dia, os animais foram privados de água e comida, permanecendo em jejum por 22 horas. No quarto e último dia, a preferência por sacarose foi avaliada após 22 horas de jejum. Os animais tiveram livre acesso a duas garrafas, uma contendo 100 mL de sacarose 1% e a outra contendo 100 mL de água por duas horas. Decorridas duas horas de teste, as garrafas foram removidas das gaiolas e o consumo de água e sacarose foram mensurados. Após o teste, os animais foram imediatamente colocados de volta a suas condições normais de alojamento, com acesso livre à ração e água. A taxa de preferência por sacarose foi calculada através da seguinte fórmula: $\text{consumo de sacarose} / (\text{consumo de água} + \text{consumo de sacarose}) \times 100$ (Upadhya, Hattiangady et al. 2016).

2.8 PROCESSAMENTO DO TECIDO

Diferentes marcações de imunohistoquímica foram feitas para verificar se o transplante de hiPSC-NSC promove maior restrição nas mudanças epileptogênicas e inflamação no hipocampo epilético. Após o término de todos os testes comportamentais (aos 4-5 meses pós-transplante), os ratos foram perfundidos com PFA 4% para coleta de tecidos cerebrais. Os cérebros foram coletados, pós-fixados em PFA 4% overnight e criopreservados utilizando 10-30% de solução de sacarose. Após a criopreservação, fatias de 30 micrômetros de espessura foram feitas através de cortes coronais no hipocampo utilizando o criostato e foram coletadas em série em uma placa de 24 poços contendo tampão de fosfato (PB) conforme descrito em outros estudos (Rao, Hattiangady et al. 2005, Hattiangady e Shetty 2012, Kodali, Parihar et al. 2015). Utilizando a técnica de free-floating, um conjunto de fatias (cada 10^a-20^a fatia) de todos os grupos foi processado para diferentes marcações.

2.9 ANÁLISES IMUNOHISTOLÓGICAS

2.9.1 Análise da sobrevivência das hNSC transplantadas

As fatias seriadas (cada 10^a fatia) do cérebro dos animais transplantados com as hNSC foram processadas com um marcador de antígeno nuclear humano (HNA, do inglês *Human Nuclear Antigen*) para a identificação das células diferenciadas derivadas das hNSC transplantadas. Para o protocolo, foi utilizado um anticorpo monoclonal anti-HNA (1:200, Millipore), como descrito em outros estudos (Upadhya, Hattiangady et al. 2016). As fatias permaneceram em placas de 24 poços e foram tratadas com tampão fosfato-salino (PBS, do inglês *Phosphate-Buffered Saline*) contendo 20% de metanol e 3% de peróxido de hidrogênio para remover a peroxidase endógena; após as fatias foram lavadas apenas em PBS (1,5 mL) e incubadas em solução de bloqueio por 30 minutos em temperatura ambiente (0,5 mL); em seguida, as fatias foram incubadas overnight a 4°C com o anticorpo primário (0,5 mL); para finalizar, as fatias foram lavadas 3 vezes com PBS (1,5 mL cada vez) e incubadas com o anticorpo secundário (0,5 mL) por 1 hora em temperatura ambiente, e então foram lavadas e incubadas com complexo avidina-biotina (ABC, do inglês *Avidin-Biotin Complex*; Vector Laboratories, Inc.) por 1 hora em temperatura ambiente. A reação à peroxidase foi visualizada com a utilização de solução Vector SG (Vector Laboratories, Inc.) como o cromogênio, e as fatias foram lavadas uma vez em água destilada e três vezes em PBS; em seguida, as fatias foram montadas e desidratadas com álcool etílico graduado e contracoradas utilizando a solução de Nuclear Fast Red (Vector Laboratories, Inc.). Células positivas para HNA foram analisadas em fatias seriadas por toda a extensão antero-posterior do hipocampo utilizando o método de contagem por fracionador óptico no sistema Stereo Investigator (MicroBrightField Inc., Williston, VT), o qual consiste em uma câmera digital de vídeo (Optronics Inc.) ligada a um microscópio Nikon E600 (Rao e Shetty 2004, Hattiangady, Kuruba et al. 2011, Upadhya, Hattiangady et al. 2016).

2.9.2 Análise da diferenciação das hNSC transplantadas no hipocampo

Para analisar a diferenciação das células transplantadas no hipocampo foi executada dupla imunofluorescência, conforme descrito em estudos anteriores (Hattiangady e Shetty 2012, Shetty e Hattiangady 2013, Upadhyay, Hattiangady et al. 2016). Para isso, foi aplicado parcialmente o mesmo protocolo descrito acima, utilizando a marcação de HNA. As fatias foram mantidas em placas de 24 poços e tratadas com PBS contendo 20% metanol e 3% peróxido de hidrogênio para remover a peroxidase endógena; após as fatias foram lavadas em PBS (1,5 mL) e incubadas em solução de bloqueio por 30 minutos em temperatura ambiente (0,5 mL); em seguida, as fatias foram incubadas overnight a 4°C contendo o anticorpo primário (HNA, 1:200; Millipore; 0,5 mL). Por fim, as fatias foram lavadas três vezes com PBS (1,5 mL cada vez) e incubadas com anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (1:500, Invitrogen; 0,5 mL) por 1 hora em temperatura ambiente. Aqui, nós observamos as células positivas para HNA co-localizadas com diferentes marcadores, como o antígeno nuclear neurônio específico (NeuN, do inglês *Neuron-Specific Nuclear Antigen*; 1:1000; Millipore) para neurônios maduros; ácido gama-aminobutírico (GABA, do inglês *Gamma-AminoButyric Acid*, 1:5000; Sigma) para neurônios GABAérgicos; proteína glial fibrilar ácida (GFAP, do inglês *Glial Fibrillary Acidic Protein*; 1:1000, Sigma) para astrócitos e NSCs; NG2 (do inglês *Neural-glia antigen 2*; 1:500, Millipore) para células precursoras de oligodendrócitos e NSCs, Ki-67 (1:10.000; Vector Laboratories) para proliferação celular e Fator de transcrição de ligação no octâmero 4 (Oct-4, do inglês *Octamer-Binding Transcription Factor 4*; 1:10,000, Millipore) para pluripotência. Para esses marcadores foram utilizados os anticorpos secundários Alexa Fluor 594 (1:500, Invitrogen). Para analisar cada marcador, três fatias representativas de cada grupo (n=5) foram processadas e analisadas no microscópio confocal. Em cada fatia foram selecionadas no máximo 10 áreas do hipocampo para contagem de células com dupla marcação. Os resultados foram expressos como percentagens.

2.9.3 Análise quantitativa de novos neurônios DCX+ na zona subgranular (SGZ-GCL) e hilo

Para a visualização dos novos neurônios, foi utilizada a marcação com doublecortina (DCX do inglês *Doublecortin*), a qual é uma proteína associada a microtúbulos e é expressa por neurônios imaturos e/ou em diferenciação, sendo considerada um marcador endógeno de neurogênese (Rao e Shetty 2004, Ming e Song 2005). As fatias foram tratadas com PBS contendo 20% metanol e 3% peróxido de hidrogênio; após as fatias foram lavadas em PBS e incubadas em solução bloqueio por 30 minutos em temperatura ambiente; em seguida, foram incubadas overnight em 4°C com o anticorpo primário anti-DCX (1:250, Santa Cruz Biotechnology); então, as fatias foram lavadas três vezes com PBS e incubadas contendo o anticorpo secundário IgG biotilado (1:400, Vector Laboratories, Inc.) por 1 hora em temperatura ambiente; após, as fatias foram lavadas e incubadas com complexo ABC (Vector Laboratories, Inc.) por 1 hora em temperatura ambiente. A reação cromogênica foi visualizada usando a solução Vector SG (Vector Laboratories, Inc.), e as fatias foram lavadas uma vez com água destilada e três vezes em PBS. Após, as fatias foram montadas e desidratadas gradualmente em álcool etílico e contracoradas para marcação nuclear usando a solução de Nuclear Fast Red (Vector Laboratories, Inc.), conforme descrito em estudos anteriores do grupo (Rao e Shetty 2004, Rao, Hattiangady et al. 2005).

Os novos neurônios marcados com DCX foram contados através do método fracionador óptico na camada de células granulares da zona subgranular (SGZ-GCL, do inglês *Subgranular Zone-Granular Cell Layer*) para todos os grupos e no hilo (DH, do inglês *Dentate Hilus*) para grupos epiléticos tratados e não-tratados (n=6/grupo) (Rao, Hattiangady et al. 2005, Rao, Hattiangady et al. 2006, Hattiangady, Kuruba et al. 2011). Todas as contagens utilizaram cada 15ª fatia, e foram visualizadas por todo o hipocampo no sistema Stereo Investigator (Microbright eld Inc.) que consiste em uma câmera digital de vídeo (Optronics Inc.) conectada a um microscópio Nikon E600.

2.9.4 Análise quantitativa de interneurônios NPY+ e PV+ no hipocampo

O procedimento utilizado para a imunohistoquímica de interneurônios GABAérgicos que expressam o neuropeptídeo Y (NPY, do inglês *Neuropeptide Y*) ou a proteína ligante de cálcio, parvalbumina (PV, do inglês *Parvalbumin*) foi descrito em publicações anteriores do grupo (Shetty e Turner 1998, Hattiangady, Rao et al. 2005, Megahed, Hattiangady et al. 2014). As fatias são tratadas com PBS contendo 20% de metanol e 3% peróxido de hidrogênio; após, as fatias foram lavadas em PBS e incubadas em solução bloqueio por 30 minutos em temperatura ambiente; em seguida, as fatias foram incubadas overnight a 4°C contendo anticorpo primário anti-NPY (1:10,000; Millipore) e anti-PV (1:2000; Sigma). No próximo dia, as fatias foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com o anticorpo secundário IgG biotilado (1:500, Vector Laboratories Inc.) por 1 hora em temperatura ambiente; as fatias foram lavadas e incubadas com complexo avidina-biotina (ABC; Vector Laboratories, Inc.) por 1 hora em temperatura ambiente; a reação à peroxidase foi visualizada por reação cromogênica utilizando solução Vector SG (Vector Laboratories, Inc.) para NPY e solução diaminobenzidina (DAB) para PV. As fatias foram lavadas uma vez em água destilada e três vezes em PBS; em seguida, todas as fatias foram montadas e desidratadas gradualmente com álcool etílico e fatias NPY foram contracoradas para coloração nuclear vermelha utilizando a solução de Nuclear Fast Red (Vector Laboratories, Inc.). Todas as contagens foram realizadas a cada 20ª fatia do hipocampo via quantificação do número total de interneurônios positivos para NPY e PV no giro dentado (DG) do hipocampo para todos os grupos (n=6/grupo) utilizando o método fracionador óptico como descrito em estudos anteriores (Rao e Shetty 2004, Hattiangady, Kuruba et al. 2011, Kuruba, Hattiangady et al. 2011, Megahed, Hattiangady et al. 2014).

2.9.5 Análise quantitativa das estruturas GFAP e IBA-1 no hipocampo

A metodologia utilizada para a imunohistoquímica de GFAP e a molécula adaptadora ligante de cálcio ionizada (IBA-1, do inglês *Ionized calcium binding adaptor molecule 1*) foi relatada em estudos anteriores do grupo (Shetty, Zaman et al. 2005, Kodali, Parihar et al. 2015). As fatias foram tratadas com PBS contendo 20% metanol e 3%

peróxido de hidrogênio; após, as fatias foram lavadas em PBS e incubadas em solução bloqueio por 30 minutos em temperatura ambiente; depois, foram incubadas overnight a 4°C com anticorpo primário anti-GFAP (1:3000; Dako) e anti-IBA-1 (1:1000; Millipore). No outro dia, as fatias foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com os anticorpos secundários IgG biotinizados (1:200, Vector Laboratories Inc.) por uma hora em temperatura ambiente. As fatias foram lavadas e incubadas em solução com complexo avidina-biotina (ABC; Vector Laboratories, Inc.) por 1 hora em temperatura ambiente; e então, a reação à peroxidase foi visualizada com a utilização de solução Vector SG (Vector Laboratories, Inc.) como o cromogênio, e as fatias foram lavadas uma vez com água destilada e três vezes em PBS. Em seguida, as fatias foram montadas e desidratadas gradualmente em álcool etílico e contracordadas para coloração nuclear vermelha utilizando solução de Nuclear Fast Red (Vector Laboratories, Inc.). As áreas ocupadas por astrócitos GFAP+ foram medidas por áreas fracionadas de tecido dentro das subáreas do DH, CA1 e CA3 do hipocampo e os elementos microgliais IBA-1+ foram medidos nas subáreas do GCL, DH, CA1 e CA3 do hipocampo, conforme descrito em estudos anteriores (Shetty, Rao et al. 2004, Parihar, Hattiangady et al. 2013). As imagens microscópicas das diferentes regiões do hipocampo foram capturadas através de lentes objetivas 20x e 40x em um microscópio Nikon E600 equipado com uma câmera digital de vídeo conectada a um computador. Cada imagem foi salva em escala de cinza, em arquivos no formato bitmap e abertas no software Image J. Foi utilizado um valor limite que mantinha todos os elementos imunomarcados de GFAP+ e IBA-1+ e o threshold foi selecionado para gerar uma imagem. A partir daí um comando de análise foi selecionado no programa para medir a área ocupada pelas estruturas GFAP+ e IBA-1+ (das áreas fracionadas) das imagens binárias. Os cálculos foram feitos separadamente para cada região hipocampal para cada animal em todos os grupos experimentais (n=6-7).

2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparações que envolvem três ou mais grupos foi utilizado ANOVA de uma via seguida do teste de post-hoc Newman-Keuls com comparações múltiplas. O teste t de Student foi aplicado quando as comparações envolviam somente dois grupos.

Os dados foram expressos como média \pm SEM e um valor P menor que 0,05 foi considerado como estatisticamente significativo.

3. REFERÊNCIAS

- Abdanipour, A., T. Tiraihi and J. Mirnajafi-Zadeh (2011). "Improvement of the pilocarpine epilepsy model in rat using bone marrow stromal cell therapy." Neurol Res **33**(6): 625-632.
- Acharya, M. M., B. Hattiangady and A. K. Shetty (2008). "Progress in neuroprotective strategies for preventing epilepsy." Prog Neurobiol **84**(4): 363-404.
- Aimone, J. B., W. Deng and F. H. Gage (2011). "Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation." Neuron **70**(4): 589-596.
- Andrews-Zwilling, Y., A. K. Gillespie, A. V. Kravitz, A. B. Nelson, N. Devidze, I. Lo, S. Y. Yoon, N. Bien-Ly, K. Ring, D. Zwilling, G. B. Potter, J. L. Rubenstein, A. C. Kreitzer and Y. Huang (2012). "Hilar GABAergic interneuron activity controls spatial learning and memory retrieval." PLoS One **7**(7): e40555.
- Andrioli, A., L. Alonso-Nanclares, J. I. Arellano and J. DeFelipe (2007). "Quantitative analysis of parvalbumin-immunoreactive cells in the human epileptic hippocampus." Neuroscience **149**(1): 131-143.
- Aronica, E., E. A. van Vliet, O. A. Mayboroda, D. Troost, F. H. da Silva and J. A. Gorter (2000). "Upregulation of metabotropic glutamate receptor subtype mGluR3 and mGluR5 in reactive astrocytes in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy." Eur J Neurosci **12**(7): 2333-2344.
- Babb, T. L., W. R. Kupfer, J. K. Pretorius, P. H. Crandall and M. F. Levesque (1991). "Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata." Neuroscience **42**(2): 351-363.
- Ben-Ari, Y. (2006). "Seizures beget seizures: the quest for GABA as a key player." Crit Rev Neurobiol **18**(1-2): 135-144.
- Blumcke, I., H. Beck, A. A. Lie and O. D. Wiestler (1999). "Molecular neuropathology of human mesial temporal lobe epilepsy." Epilepsy Res **36**(2-3): 205-223.
- Brites, D. and A. Fernandes (2015). "Neuroinflammation and Depression: Microglia Activation, Extracellular Microvesicles and microRNA Dysregulation." Front Cell Neurosci **9**: 476.
- Carpentino, J. E., N. W. Hartman, L. B. Grabel and J. R. Naegele (2008). "Region-specific differentiation of embryonic stem cell-derived neural progenitor transplants into the adult mouse hippocampus following seizures." J Neurosci Res **86**(3): 512-524.
- Choi, M., S. Ahn, E. J. Yang, H. Kim, Y. H. Chong and H. S. Kim (2016). "Hippocampus-based contextual memory alters the morphological characteristics of astrocytes in the dentate gyrus." Mol Brain **9**(1): 72.
- Chu, K., M. Kim, K. H. Jung, D. Jeon, S. T. Lee, J. Kim, S. W. Jeong, S. U. Kim, S. K. Lee, H. S. Shin and J. K. Roh (2004). "Human neural stem cell transplantation reduces spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus in adult rats." Brain Res **1023**(2): 213-221.

- Costa-Ferro, Z. S., B. S. Souza, M. M. Leal, C. M. Kaneto, C. M. Azevedo, I. C. da Silva, M. B. Soares, R. Ribeiro-dos-Santos and J. C. Dacosta (2012). "Transplantation of bone marrow mononuclear cells decreases seizure incidence, mitigates neuronal loss and modulates pro-inflammatory cytokine production in epileptic rats." Neurobiol Dis **46**(2): 302-313.
- Costa-Ferro, Z. S., A. S. Vitola, M. F. Pedroso, F. B. Cunha, L. L. Xavier, D. C. Machado, M. B. Soares, R. Ribeiro-dos-Santos and J. C. DaCosta (2010). "Prevention of seizures and reorganization of hippocampal functions by transplantation of bone marrow cells in the acute phase of experimental epilepsy." Seizure **19**(2): 84-92.
- Cunningham, M., J. H. Cho, A. Leung, G. Savvidis, S. Ahn, M. Moon, P. K. Lee, J. J. Han, N. Azimi, K. S. Kim, V. Y. Bolshakov and S. Chung (2014). "hPSC-derived maturing GABAergic interneurons ameliorate seizures and abnormal behavior in epileptic mice." Cell Stem Cell **15**(5): 559-573.
- de Lanerolle, N. C., T. S. Lee and D. D. Spencer (2010). "Astrocytes and epilepsy." Neurotherapeutics **7**(4): 424-438.
- De Sarro, G., E. Russo, G. Ferreri, B. Giuseppe, M. A. Flocco, E. D. Di Paola and A. De Sarro (2004). "Seizure susceptibility to various convulsant stimuli of knockout interleukin-6 mice." Pharmacol Biochem Behav **77**(4): 761-766.
- Deng, W., J. B. Aimone and F. H. Gage (2010). "New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory?" Nat Rev Neurosci **11**(5): 339-350.
- Detour, J., H. Schroeder, D. Desor and A. Nehlig (2005). "A 5-month period of epilepsy impairs spatial memory, decreases anxiety, but spares object recognition in the lithium-pilocarpine model in adult rats." Epilepsia **46**(4): 499-508.
- Devinsky, O. (2004). "Therapy for neurobehavioral disorders in epilepsy." Epilepsia **45 Suppl 2**: 34-40.
- Devinsky, O., A. Vezzani, S. Najjar, N. C. De Lanerolle and M. A. Rogawski (2013). "Glia and epilepsy: excitability and inflammation." Trends Neurosci **36**(3): 174-184.
- Eid, T., N. Tu, T. S. Lee and J. C. Lai (2013). "Regulation of astrocyte glutamine synthetase in epilepsy." Neurochem Int **63**(7): 670-681.
- Engel, J., Jr. (1996). "Introduction to temporal lobe epilepsy." Epilepsy Res **26**(1): 141-150.
- Engel, J., Jr. (2001). "A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology." Epilepsia **42**(6): 796-803.
- Frick, L. R., K. Williams and C. Pittenger (2013). "Microglial dysregulation in psychiatric disease." Clin Dev Immunol **2013**: 608654.
- Fu, L. Y. and A. N. van den Pol (2007). "GABA excitation in mouse hilar neuropeptide Y neurons." J Physiol **579**(Pt 2): 445-464.
- Gernert, M., K. W. Thompson, W. Loscher and A. J. Tobin (2002). "Genetically engineered GABA-producing cells demonstrate anticonvulsant effects and long-term transgene

expression when transplanted into the central piriform cortex of rats." Exp Neurol **176**(1): 183-192.

Gibbons, M. B., R. M. Smeal, D. K. Takahashi, J. R. Vargas and K. S. Wilcox (2013). "Contributions of astrocytes to epileptogenesis following status epilepticus: opportunities for preventive therapy?" Neurochem Int **63**(7): 660-669.

Gross, C. G. (2000). "Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma." Nat Rev Neurosci **1**(1): 67-73.

Haarman, B. C., R. F. Riemersma-Van der Lek, J. C. de Groot, H. G. Ruhe, H. C. Klein, T. E. Zandstra, H. Burger, R. A. Schoevers, E. F. de Vries, H. A. Drexhage, W. A. Nolen and J. Doorduyn (2014). "Neuroinflammation in bipolar disorder - A [(11)C]-(R)-PK11195 positron emission tomography study." Brain Behav Immun **40**: 219-225.

Hallbergson, A. F., C. Gnatenco and D. A. Peterson (2003). "Neurogenesis and brain injury: managing a renewable resource for repair." J Clin Invest **112**(8): 1128-1133.

Hattiangady, B., A. Bates, S. Shin, B. Shuai, X. Rao, M. C. Vemuri and A. K. Shetty (2015). "hiPSC-derived NSC grafting intervention early after hippocampus injury preserves memory and mood function and reduces the occurrence of seizures." Society for Neuroscience meeting abstracts, Chicago, USA.

Hattiangady, B., R. Kuruba, V. K. Pahirar and A. K. Shetty (2010). "Intrahippocampal grafting of NSCs after status epilepticus eases both spontaneous seizures & cognitive dysfunction in a rat model of temporal lobe epilepsy." Soc Neurosci Abstr.

Hattiangady, B., R. Kuruba and A. K. Shetty (2011). "Acute Seizures in Old Age Leads to a Greater Loss of CA1 Pyramidal Neurons, an Increased Propensity for Developing Chronic TLE and a Severe Cognitive Dysfunction." Aging Dis **2**(1): 1-17.

Hattiangady, B., V. Mishra, M. Kodali, B. Shuai, X. Rao and A. K. Shetty (2014). "Object location and object recognition memory impairments, motivation deficits and depression in a model of Gulf War illness." Front Behav Neurosci **8**: 78.

Hattiangady, B., M. S. Rao and A. K. Shetty (2004). "Chronic temporal lobe epilepsy is associated with severely declined dentate neurogenesis in the adult hippocampus." Neurobiol Dis **17**(3): 473-490.

Hattiangady, B., M. S. Rao and A. K. Shetty (2008). "Grafting of striatal precursor cells into hippocampus shortly after status epilepticus restrains chronic temporal lobe epilepsy." Exp Neurol **212**(2): 468-481.

Hattiangady, B., M. S. Rao, G. A. Shetty and A. K. Shetty (2005). "Brain-derived neurotrophic factor, phosphorylated cyclic AMP response element binding protein and neuropeptide Y decline as early as middle age in the dentate gyrus and CA1 and CA3 subfields of the hippocampus." Exp Neurol **195**(2): 353-371.

Hattiangady, B., M. S. Rao, V. Zaman and A. K. Shetty (2006). "Incorporation of embryonic CA3 cell grafts into the adult hippocampus at 4-months after injury: effects of combined neurotrophic supplementation and caspase inhibition." Neuroscience **139**(4): 1369-1383.

- Hattiangady, B. and A. K. Shetty (2010). "Decreased neuronal differentiation of newly generated cells underlies reduced hippocampal neurogenesis in chronic temporal lobe epilepsy." Hippocampus **20**(1): 97-112.
- Hattiangady, B. and A. K. Shetty (2011). "Neural stem cell grafting in an animal model of chronic temporal lobe epilepsy." Curr Protoc Stem Cell Biol **Chapter 2**: Unit2D 7.
- Hattiangady, B. and A. K. Shetty (2012). "Neural stem cell grafting counteracts hippocampal injury-mediated impairments in mood, memory, and neurogenesis." Stem Cells Transl Med **1**(9): 696-708.
- Hill, A. S., A. Sahay and R. Hen (2015). "Increasing Adult Hippocampal Neurogenesis is Sufficient to Reduce Anxiety and Depression-Like Behaviors." Neuropsychopharmacology **40**(10): 2368-2378.
- Howell, O. W., K. Doyle, J. H. Goodman, H. E. Scharfman, H. Herzog, A. Pringle, A. G. Beck-Sickinger and W. P. Gray (2005). "Neuropeptide Y stimulates neuronal precursor proliferation in the post-natal and adult dentate gyrus." J Neurochem **93**(3): 560-570.
- Hu, H., J. Gan and P. Jonas (2014). "Interneurons. Fast-spiking, parvalbumin(+) GABAergic interneurons: from cellular design to microcircuit function." Science **345**(6196): 1255263.
- Jain, S., S. Y. Yoon, L. Zhu, J. Brodbeck, J. Dai, D. Walker and Y. Huang (2012). "Arf4 determines dentate gyrus-mediated pattern separation by regulating dendritic spine development." PLoS One **7**(9): e46340.
- Jessberger, S., R. E. Clark, N. J. Broadbent, G. D. Clemenson, Jr., A. Consiglio, D. C. Lie, L. R. Squire and F. H. Gage (2009). "Dentate gyrus-specific knockdown of adult neurogenesis impairs spatial and object recognition memory in adult rats." Learn Mem **16**(2): 147-154.
- Jing, M., T. Shingo, T. Yasuhara, A. Kondo, T. Morimoto, F. Wang, T. Baba, W. J. Yuan, N. Tajiri, T. Uozumi, M. Murakami, M. Tanabe, Y. Miyoshi, S. Zhao and I. Date (2009). "The combined therapy of intrahippocampal transplantation of adult neural stem cells and intraventricular erythropoietin-infusion ameliorates spontaneous recurrent seizures by suppression of abnormal mossy fiber sprouting." Brain Res **1295**: 203-217.
- Jo, S., O. Yarishkin, Y. J. Hwang, Y. E. Chun, M. Park, D. H. Woo, J. Y. Bae, T. Kim, J. Lee, H. Chun, H. J. Park, D. Y. Lee, J. Hong, H. Y. Kim, S. J. Oh, S. J. Park, H. Lee, B. E. Yoon, Y. Kim, Y. Jeong, I. Shim, Y. C. Bae, J. Cho, N. W. Kowall, H. Ryu, E. Hwang, D. Kim and C. J. Lee (2014). "GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease." Nat Med **20**(8): 886-896.
- Klapstein, G. J. and W. F. Colmers (1997). "Neuropeptide Y suppresses epileptiform activity in rat hippocampus in vitro." J Neurophysiol **78**(3): 1651-1661.
- Klausberger, T., L. F. Marton, J. O'Neill, J. H. Huck, Y. Dalezios, P. Fuentealba, W. Y. Suen, E. Papp, T. Kaneko, M. Watanabe, J. Csicsvari and P. Somogyi (2005). "Complementary roles of cholecystokinin- and parvalbumin-expressing GABAergic neurons in hippocampal network oscillations." J Neurosci **25**(42): 9782-9793.

- Kobayashi, M. and P. S. Buckmaster (2003). "Reduced inhibition of dentate granule cells in a model of temporal lobe epilepsy." J Neurosci **23**(6): 2440-2452.
- Kodali, M., V. K. Parihar, B. Hattiangady, V. Mishra, B. Shuai and A. K. Shetty (2015). "Resveratrol prevents age-related memory and mood dysfunction with increased hippocampal neurogenesis and microvasculature, and reduced glial activation." Sci Rep **5**: 8075.
- Koh, M. T., R. P. Haberman, S. Foti, T. J. McCown and M. Gallagher (2010). "Treatment strategies targeting excess hippocampal activity benefit aged rats with cognitive impairment." Neuropsychopharmacology **35**(4): 1016-1025.
- Kuruba, R., B. Hattiangady, V. K. Parihar, B. Shuai and A. K. Shetty (2011). "Differential susceptibility of interneurons expressing neuropeptide Y or parvalbumin in the aged hippocampus to acute seizure activity." PLoS One **6**(9): e24493.
- Kuruba, R., B. Hattiangady and A. K. Shetty (2009). "Hippocampal neurogenesis and neural stem cells in temporal lobe epilepsy." Epilepsy Behav **14 Suppl 1**: 65-73.
- Leal, M. M., Z. S. Costa-Ferro, B. S. Souza, C. M. Azevedo, T. M. Carvalho, C. M. Kaneto, R. H. Carvalho, R. R. Dos Santos and M. B. Soares (2014). "Early transplantation of bone marrow mononuclear cells promotes neuroprotection and modulation of inflammation after status epilepticus in mice by paracrine mechanisms." Neurochem Res **39**(2): 259-268.
- Lewis, D. A., A. A. Curley, J. R. Glausier and D. W. Volk (2012). "Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia." Trends Neurosci **35**(1): 57-67.
- Li, T., G. Ren, D. L. Kaplan and D. Boison (2009). "Human mesenchymal stem cell grafts engineered to release adenosine reduce chronic seizures in a mouse model of CA3-selective epileptogenesis." Epilepsy Res **84**(2-3): 238-241.
- Long, Q., B. Qiu, K. Wang, J. Yang, C. Jia, W. Xin, P. Wang, R. Han, Z. Fei and W. Liu (2013). "Genetically engineered bone marrow mesenchymal stem cells improve functional outcome in a rat model of epilepsy." Brain Res **1532**: 1-13.
- Loscher, W. (2002). "Current status and future directions in the pharmacotherapy of epilepsy." Trends Pharmacol Sci **23**(3): 113-118.
- Luscher, B., Q. Shen and N. Sahir (2011). "The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder." Mol Psychiatry **16**(4): 383-406.
- Malberg, J. E., A. J. Eisch, E. J. Nestler and R. S. Duman (2000). "Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus." J Neurosci **20**(24): 9104-9110.
- Marin, O. (2012). "Interneuron dysfunction in psychiatric disorders." Nat Rev Neurosci **13**(2): 107-120.
- McAvoy, K., A. Besnard and A. Sahay (2015). "Adult hippocampal neurogenesis and pattern separation in DG: a role for feedback inhibition in modulating sparseness to govern population-based coding." Front Syst Neurosci **9**: 120.
- Megahed, T., B. Hattiangady, B. Shuai and A. K. Shetty (2014). "Parvalbumin and neuropeptide Y expressing hippocampal GABA-ergic inhibitory interneuron numbers decline in a model of Gulf War illness." Front Cell Neurosci **8**: 447.

- Miltiadous, P., G. Kouroupi, A. Stamatakis, P. N. Koutsoudaki, R. Matsas and F. Stylianopoulou (2013). "Subventricular zone-derived neural stem cell grafts protect against hippocampal degeneration and restore cognitive function in the mouse following intrahippocampal kainic acid administration." Stem Cells Transl Med **2**(3): 185-198.
- Ming, G., L. Song, H. (2005). "Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system." Annu. Rev. Neurosci **28**: 223–250.
- Mirriane, M. M. and S. E. Tsirka. (2011). "A Functional Role for Microglia in Epilepsy." Clinical and Genetic Aspects of Epilepsy, Dr. Zaid Afawi (Ed.), InTech.
- Murray, A. J., M. U. Woloszynowska-Fraser, L. Ansel-Bollepalli, K. L. Cole, A. Foggetti, B. Crouch, G. Riedel and P. Wulff (2015). "Parvalbumin-positive interneurons of the prefrontal cortex support working memory and cognitive flexibility." Sci Rep **5**: 16778.
- Orr, A. G., E. C. Hsiao, M. M. Wang, K. Ho, D. H. Kim, X. Wang, W. Guo, J. Kang, G. Q. Yu, A. Adame, N. Devidze, D. B. Dubal, E. Masliah, B. R. Conklin and L. Mucke (2015). "Astrocytic adenosine receptor A2A and Gs-coupled signaling regulate memory." Nat Neurosci **18**(3): 423-434.
- Parihar, V. K., B. Hattiangady, R. Kuruba, B. Shuai and A. K. Shetty (2011). "Predictable chronic mild stress improves mood, hippocampal neurogenesis and memory." Mol Psychiatry **16**(2): 171-183.
- Parihar, V. K., B. Hattiangady, B. Shuai and A. K. Shetty (2013). "Mood and memory deficits in a model of Gulf War illness are linked with reduced neurogenesis, partial neuron loss, and mild inflammation in the hippocampus." Neuropsychopharmacology **38**(12): 2348-2362.
- Patrylo, P. R., A. N. van den Pol, D. D. Spencer and A. Williamson (1999). "NPY inhibits glutamatergic excitation in the epileptic human dentate gyrus." J Neurophysiol **82**(1): 478-483.
- Perera, T. D., S. Park and Y. Nemirovskaya (2008). "Cognitive role of neurogenesis in depression and antidepressant treatment." Neuroscientist **14**(4): 326-338.
- Perez, E. L., F. Lauritzen, Y. Wang, T. S. Lee, D. Kang, H. P. Zaveri, F. A. Chaudhry, O. P. Ottersen, L. H. Bergersen and T. Eid (2012). "Evidence for astrocytes as a potential source of the glutamate excess in temporal lobe epilepsy." Neurobiol Dis **47**(3): 331-337.
- Pirttila, T. J., A. Manninen, L. Jutila, J. Nissinen, R. Kalviainen, M. Vapalahti, A. Immonen, L. Paljarvi, K. Karkola, I. Alafuzoff, E. Mervaala and A. Pitkanen (2005). "Cystatin C expression is associated with granule cell dispersion in epilepsy." Ann Neurol **58**(2): 211-223.
- Powell, T. R., C. Fernandes and L. C. Schalkwyk (2012). "Depression-Related Behavioral Tests." Curr Protoc Mouse Biol **2**(2): 119-127.
- Racine, R. J. (1972). "Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **32**(3): 281-294.
- Rao, M. S., B. Hattiangady, A. Abdel-Rahman, D. P. Stanley and A. K. Shetty (2005). "Newly born cells in the ageing dentate gyrus display normal migration, survival and neuronal fate choice but endure retarded early maturation." Eur J Neurosci **21**(2): 464-476.

- Rao, M. S., B. Hattiangady, K. S. Rai and A. K. Shetty (2007). "Strategies for promoting anti-seizure effects of hippocampal fetal cells grafted into the hippocampus of rats exhibiting chronic temporal lobe epilepsy." Neurobiol Dis **27**(2): 117-132.
- Rao, M. S., B. Hattiangady, D. S. Reddy and A. K. Shetty (2006). "Hippocampal neurodegeneration, spontaneous seizures, and mossy fiber sprouting in the F344 rat model of temporal lobe epilepsy." J Neurosci Res **83**(6): 1088-1105.
- Rao, M. S., B. Hattiangady and A. K. Shetty (2006). "Fetal hippocampal CA3 cell grafts enriched with FGF-2 and BDNF exhibit robust long-term survival and integration and suppress aberrant mossy fiber sprouting in the injured middle-aged hippocampus." Neurobiol Dis **21**(2): 276-290.
- Rao, M. S., B. Hattiangady and A. K. Shetty (2006). "The window and mechanisms of major age-related decline in the production of new neurons within the dentate gyrus of the hippocampus." Aging Cell **5**(6): 545-558.
- Rao, M. S. and A. K. Shetty (2004). "Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus." Eur J Neurosci **19**(2): 234-246.
- Ravizza, T., B. Gagliardi, F. Noe, K. Boer, E. Aronica and A. Vezzani (2008). "Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy." Neurobiol Dis **29**(1): 142-160.
- Robel, S., S. C. Buckingham, J. L. Boni, S. L. Campbell, N. C. Danbolt, T. Riedemann, B. Sutor and H. Sontheimer (2015). "Reactive astrogliosis causes the development of spontaneous seizures." J Neurosci **35**(8): 3330-3345.
- Robel, S. and H. Sontheimer (2016). "Glia as drivers of abnormal neuronal activity." Nat Neurosci **19**(1): 28-33.
- Ruschenschmidt, C., P. G. Koch, O. Brustle and H. Beck (2005). "Functional properties of ES cell-derived neurons engrafted into the hippocampus of adult normal and chronically epileptic rats." Epilepsia **46 Suppl 5**: 174-183.
- Sahay, A., K. N. Scobie, A. S. Hill, C. M. O'Carroll, M. A. Kheirbek, N. S. Burghardt, A. A. Fenton, A. Dranovsky and R. Hen (2011). "Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation." Nature **472**(7344): 466-470.
- Samuels, B. A. and R. Hen (2011). "Neurogenesis and affective disorders." Eur J Neurosci **33**(6): 1152-1159.
- Santarelli, L., M. Saxe, C. Gross, A. Surget, F. Battaglia, S. Dulawa, N. Weisstaub, J. Lee, R. Duman, O. Arancio, C. Belzung and R. Hen (2003). "Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants." Science **301**(5634): 805-809.
- Schwaller, B., I. V. Tetko, P. Tandon, D. C. Silveira, M. Vreugdenhil, T. Henzi, M. C. Potier, M. R. Celio and A. E. Villa (2004). "Parvalbumin deficiency affects network properties resulting in increased susceptibility to epileptic seizures." Mol Cell Neurosci **25**(4): 650-663.
- Shapiro, L. A., L. Wang and C. E. Ribak (2008). "Rapid astrocyte and microglial activation following pilocarpine-induced seizures in rats." Epilepsia **49 Suppl 2**: 33-41.

- Shen, H., L. Liu, Z. Huo and Z. Lin (2010). "Hippocampal stem cell grafting-mediated recovery of injured hippocampus in the rat model of temporal lobe epilepsy." Int J Neurosci **120**(10): 647-654.
- Shetty, A. K. (2011). "Progress in cell grafting therapy for temporal lobe epilepsy." Neurotherapeutics **8**(4): 721-735.
- Shetty, A. K. (2012). Neural Stem Cell Therapy for Temporal Lobe Epilepsy. Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies. J. L. Noebels, M. Avoli, M. A. Rogawski, R. W. Olsen and A. V. Delgado-Escueta. Bethesda (MD).
- Shetty, A. K. (2014). "Hippocampal injury-induced cognitive and mood dysfunction, altered neurogenesis, and epilepsy: can early neural stem cell grafting intervention provide protection?" Epilepsy Behav **38**: 117-124.
- Shetty, A. K. and A. Bates (2016). "Potential of GABA-ergic cell therapy for schizophrenia, neuropathic pain, and Alzheimer's and Parkinson's diseases." Brain Res **1638**(Pt A): 74-87.
- Shetty, A. K. and B. Hattiangady (2007). "Concise review: prospects of stem cell therapy for temporal lobe epilepsy." Stem Cells **25**(10): 2396-2407.
- Shetty, A. K. and B. Hattiangady (2013). "Postnatal age governs the extent of differentiation of hippocampal CA1 and CA3 subfield neural stem/progenitor cells into neurons and oligodendrocytes." Int J Dev Neurosci **31**(7): 646-656.
- Shetty, A. K. and B. Hattiangady (2016). "Grafted Subventricular Zone Neural Stem Cells Display Robust Engraftment and Similar Differentiation Properties and Form New Neurogenic Niches in the Young and Aged Hippocampus." Stem Cells Transl Med **5**(9): 1204-1215.
- Shetty, A. K., B. Hattiangady and M. S. Rao (2009). "Vulnerability of hippocampal GABA-ergic interneurons to kainate-induced excitotoxic injury during old age." J Cell Mol Med **13**(8B): 2408-2423.
- Shetty, A. K., B. Hattiangady, M. S. Rao and B. Shuai (2012). "Neurogenesis response of middle-aged hippocampus to acute seizure activity." PLoS One **7**(8): e43286.
- Shetty, A. K., M. S. Rao, B. Hattiangady, V. Zaman and G. A. Shetty (2004). "Hippocampal neurotrophin levels after injury: Relationship to the age of the hippocampus at the time of injury." J Neurosci Res **78**(4): 520-532.
- Shetty, A. K. and D. A. Turner (1998). "Hippocampal interneurons expressing glutamic acid decarboxylase and calcium-binding proteins decrease with aging in Fischer 344 rats." J Comp Neurol **394**(2): 252-269.
- Shetty, A. K. and D. A. Turner (2001). "Glutamic acid decarboxylase-67-positive hippocampal interneurons undergo a permanent reduction in number following kainic acid-induced degeneration of ca3 pyramidal neurons." Exp Neurol **169**(2): 276-297.
- Shetty, A. K. and D. Upadhy (2016). "GABA-ergic cell therapy for epilepsy: Advances, limitations and challenges." Neurosci Biobehav Rev **62**: 35-47.

- Shetty, A. K., V. Zaman and B. Hattiangady (2005). "Repair of the injured adult hippocampus through graft-mediated modulation of the plasticity of the dentate gyrus in a rat model of temporal lobe epilepsy." J Neurosci **25**(37): 8391-8401.
- Shors, T. J., G. Miesegaes, A. Beylin, M. Zhao, T. Rydel and E. Gould (2001). "Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories." Nature **410**(6826): 372-376.
- Sloviter, R. S., C. A. Zappone, B. D. Harvey, A. V. Bumanglag, R. A. Bender and M. Frotscher (2003). "'Dormant basket cell' hypothesis revisited: relative vulnerabilities of dentate gyrus mossy cells and inhibitory interneurons after hippocampal status epilepticus in the rat." J Comp Neurol **459**(1): 44-76.
- Snyder, J. S., A. Soumier, M. Brewer, J. Pickel and H. A. Cameron (2011). "Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour." Nature **476**(7361): 458-461.
- Sperk, G., T. Hamilton and W. F. Colmers (2007). "Neuropeptide Y in the dentate gyrus." Prog Brain Res **163**: 285-297.
- Thompson, K. (2009). "Transplantation of GABA-producing cells for seizure control in models of temporal lobe epilepsy." Neurotherapeutics **6**(2): 284-294.
- Turner, D. A. and A. K. Shetty (2003). "Clinical prospects for neural grafting therapy for hippocampal lesions and epilepsy." Neurosurgery **52**(3): 632-644; discussion 641-634.
- Upadhyay, D., B. Hattiangady, G. A. Shetty, G. Zanirati, M. Kodali and A. K. Shetty (2016). "Neural Stem Cell or Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived GABA-ergic Progenitor Cell Grafting in an Animal Model of Chronic Temporal Lobe Epilepsy." Curr Protoc Stem Cell Biol **38**: 2D 7 1-2D 7 47.
- Venturin, G. T., S. Greggio, D. R. Marinowic, G. Zanirati, M. Cammarota, D. C. Machado and J. C. DaCosta (2011). "Bone marrow mononuclear cells reduce seizure frequency and improve cognitive outcome in chronic epileptic rats." Life Sci **89**(7-8): 229-234.
- Vezzani, A., J. French, T. Bartfai and T. Z. Baram (2011). "The role of inflammation in epilepsy." Nat Rev Neurol **7**(1): 31-40.
- Waldau, B., B. Hattiangady, R. Kuruba and A. K. Shetty (2010). "Medial ganglionic eminence-derived neural stem cell grafts ease spontaneous seizures and restore GDNF expression in a rat model of chronic temporal lobe epilepsy." Stem Cells **28**(7): 1153-1164.
- Willner, P., R. Muscat and M. Papp (1992). "Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression." Neurosci Biobehav Rev **16**(4): 525-534.
- Yau, S. Y., A. Li and K. F. So (2015). "Involvement of Adult Hippocampal Neurogenesis in Learning and Forgetting." Neural Plast **2015**: 717958.
- Zaben, M. J. and W. P. Gray (2013). "Neuropeptides and hippocampal neurogenesis." Neuropeptides **47**(6): 431-438.
- Zanirati, G., P. N. Azevedo, D. R. Marinowic, F. Rodrigues, A. C. de Oliveira Dias, G. T. Venturin, S. Greggio, F. Simao and J. C. DaCosta (2015). "Transplantation of bone marrow mononuclear cells modulates hippocampal expression of growth factors in chronically epileptic animals." CNS Neurosci Ther **21**(5): 463-471.

Zanirati, G., B. Hattiangady, B. Shuai, J. Blair and A. K. Shetty (2015). "Subventricular zone NSC grafting into the hippocampus after status epilepticus modifies disease by curtailing epileptogenesis and inflammation." Society for Neuroscience meeting abstracts, Chicago, USA.

APÊNDICE I

Life Sciences 89 (2011) 229–234



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Life Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lifescie

Bone marrow mononuclear cells reduce seizure frequency and improve cognitive outcome in chronic epileptic rats

Gianina Teribele Venturin^{a,b}, Samuel Greggio^b, Daniel Rodrigo Marinowicz^c, Gabriele Zanirati^b, Martín Cammarota^d, Denise Cantarelli Machado^c, Jaderson Costa DaCosta^{b,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Laboratório de Neurociências, Instituto de Pesquisas Biomédicas e Instituto do Cérebro, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^c Laboratório de Terapia Celular, Instituto de Pesquisas Biomédicas e Instituto do Cérebro, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^d Centro de Memória, Instituto de Pesquisas Biomédicas e Instituto do Cérebro, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 25 January 2011
Accepted 3 June 2011

Keywords:
Temporal lobe epilepsy
Seizures
Bone marrow stem cells
Cognition

ABSTRACT

Aims: Epilepsy affects 0.5–1% of the world's population, and approximately a third of these patients are refractory to current medication. Given their ability to proliferate, differentiate and regenerate tissues, stem cells could restore neural circuits lost during the course of the disease and reestablish the physiological excitability of neurons. This study verified the therapeutic potential of bone marrow mononuclear cells (BMMCs) on seizure control and cognitive impairment caused by experimentally induced epilepsy.

Main methods: Status epilepticus (SE) was induced by lithium-pilocarpine injection and controlled with diazepam 90 min after SE onset. Lithium-pilocarpine-treated rats were intravenously transplanted 22 days after SE with BMMCs obtained from enhanced green fluorescent protein (eGFP) transgenic C57Bl/6 mice. Control epileptic animals were given an equivalent volume of saline or fibroblast injections. Animals were video-monitored for the presence of spontaneous recurrent seizures prior to and following the cell administration procedure. In addition, rats underwent cognitive evaluation using a Morris water maze.

Key findings: Our data show that BMMCs reduced the frequency of seizures and improved the learning and long-term spatial memory impairments of epileptic rats. EGFP-positive cells were detected in the brains of transplanted animals by PCR analysis.

Significance: The positive behavioral effects observed in our study indicate that BMMCs could represent a promising therapeutic option in the management of chronic temporal lobe epilepsy.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Epilepsy is a chronic neurological disorder that affects 0.5–1% of the population worldwide (Engel, 2001; Sander and Shorvon, 1996). The response to therapy in newly diagnosed cases is generally good, but up to 30% of patients cannot achieve acceptable seizure control despite adequate trials with potentially effective antiepileptic agents (Loscher, 2002). In addition, there is the risk of a large number of adverse effects, and surgical treatment is limited due to possible brain function impairments.

Temporal lobe epilepsy (TLE) is the most frequent refractory form of epilepsy in adult patients (Engel, 2001). Patients with TLE often show extensive cell loss in temporal brain areas, especially in the hippocampus; this characterizes mesial temporal sclerosis (MTS)-

associated TLE. The main physiopathological findings observed in MTS are neuronal loss, reactive gliosis, mossy fiber sprouting, dendritic injury and neurogenesis (Babb et al., 1991; Blumcke et al., 1999). Several clinical observations suggest that epilepsy is more complex than recurrent seizures alone and that progressive cognitive impairment should be included in the sequelae of refractory TLE, particularly when associated with hippocampal sclerosis (Hermann et al., 2002; Hermann et al., 2006; Oyegbile et al., 2006; Oyegbile et al., 2004).

Intense neuronal loss is intimately related to EMT and chronic epileptic activity (Blumcke et al., 1999; Blumcke et al., 1996). Thus, the replacement of cells lost during the course of disease or the replacement of physiological mediators produced by the cells may represent effective strategies in the treatment of refractory epilepsy. Transplanted stem cells could exert their effects not only by transdifferentiating but also by other means such as cell fusion, the release of trophic factors or cytokines, or even by activating endogenous neural stem cells (Terada et al., 2002).

A number of cell transplantation strategies have been studied in experimental models of epilepsy (Carpentino et al., 2008; Chu et al., 2004; Gernert et al., 2002; Hattiangady et al., 2008; Huber et al., 2001;

* Corresponding author at: Laboratório de Neurociências, Instituto do Cérebro (Inscer), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Avenida Ipiranga 6690, Jardim Botânico, Prédio 60, 2º andar, sala 07, CEP 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33203250; fax: +55 51 33203312.

E-mail address: jc@pucrs.br (J.C. DaCosta).

Transplantation of Bone Marrow Mononuclear Cells Modulates Hippocampal Expression of Growth Factors in Chronically Epileptic Animals

Gabriele Zanirati,¹ Pamela Nunes Azevedo,¹ Daniel Rodrigo Marinowic,¹ Felipe Rodrigues,¹ Ana Christina de Oliveira Dias,² Gianina Teribele Venturin,³ Samuel Greggio,³ Fabrício Simão¹ & Jaderson Costa DaCosta^{1,3}

¹ PUCRS, Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul (InsCer), Instituto de Pesquisas Biomédicas, Laboratório de Neurociências e Sinalização Celular, Porto Alegre, RS, Brazil

² PUCRS, Quatro G Pesquisa & Desenvolvimento Ltda, Porto Alegre, RS, Brazil

³ PUCRS, Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul (InsCer), Centro de Pesquisa Pré Clínica, Porto Alegre, RS, Brazil

Keywords

Epilepsy; Neurotrophic factors; Pilocarpine; Stem cells.

Correspondence

Jaderson Costa DaCosta, M.D., Ph.D.,
Laboratório de Neurociências e Sinalização
Celular, Instituto do Cérebro do Rio Grande
do Sul (InsCer), Pontifícia Universidade
Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av.
Ipiranga 6690, Prédio 63, sala 205, Jardim
Botânico, CEP 90619-900, Porto Alegre, RS,
Brazil.
Tel.: +55-51-33203250;
Fax: +55-51-33203312;
E-mail: jcc@pucrs.br
Received 27 March 2014; revision 26
December 2014; accepted 27 December 2014

SUMMARY

Aims: In previous studies, transplantation of bone marrow mononuclear cells (BMMCs) in epileptic animals has been found to be neuroprotective. However, the mechanism by which the BMMCs act remains unclear. We hypothesize that BMMCs may provide neuroprotection to the epileptic brain through trophic support. To test our hypothesis, we studied the temporal expression of neurotrophins after BMMC transplantation in the epileptic rat hippocampus. **Methods:** Chronically epileptic rats were intravenously transplanted with 1×10^7 BMMCs isolated from GFP transgenic mice. Expression levels of BDNF, GDNF, NGF, VEGF, and TGF- β 1, and their receptors, were evaluated by ELISA and/or qRT-PCR analysis. **Results:** Our data revealed increased protein expression of BDNF, GDNF, NGF, and VEGF and reduced levels of TGF- β 1 in the hippocampus of transplanted epileptic animals. Additionally, an increase in the mRNA expression of BDNF, GDNF, and VEGF, a reduction in TGF- β 1, and a decrease in mRNA levels of the TrkA and TGF- β 1 receptors were also observed. **Conclusion:** The gain provided by transplanted BMMCs in the epileptic brain may be related to the ability of these cells in modulating the network of neurotrophins and angiogenic signals.

doi: 10.1111/cns.12382

Introduction

Temporal lobe epilepsy (TLE) is the most frequent form of epilepsy in adults [1]. It is characterized by the progressive occurrence of spontaneous recurrent seizures (SRS) and affects mainly the hippocampus [2]. Unfortunately, 30% of the patients become refractory to the antiepileptic drugs [3]. Surgical treatment is a therapeutic option for these patients, but it is restricted due to possible brain function sequelae.

Cellular therapy-based studies have grown exponentially in the field of epilepsy research and have shown benefits in experimental models [4–15]. We have previously reported that bone marrow mononuclear cells (BMMCs) that are intravenously transplanted reduce seizure frequency and improve cognitive deficits in chronic epileptic rats [8,13]. However, the grafted cells uptake in the brain

is low and poorly explains the benefits of the cellular treatment [7,8,13]. Trophic factors are key elements during embryogenesis [16] and together with their receptors are selectively expressed in different parts of the central nervous system (CNS) during development. It has been demonstrated that stem cells have the ability to generate a variety of growth factors both *in vitro* and *in vivo* [17–19]. Therefore, it is possible that the transplanted BMMCs could secrete and/or promote the cerebral expression of trophic factors that subsequently stimulate endogenous mechanisms of neuroprotection.

Bao et al. [20] showed that increased levels of neurotrophic factors were associated with functional improvement following transplantation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in ischemic rats. Furthermore, a large array of growth factors was shown to improve cognitive deficits and to be

Neural Stem Cell or Human Induced Pluripotent Stem Cell–Derived GABA-ergic Progenitor Cell Grafting in an Animal Model of Chronic Temporal Lobe Epilepsy

Dinesh Upadhy,^{1,2,3} Bharathi Hattiangady,^{1,2,3} Geetha A. Shetty,^{1,2,3} Gabriele Zanirati,^{1,3} Maheedhar Kodali,^{1,2,3} and Ashok K. Shetty^{1,2,3}

¹Institute for Regenerative Medicine, Texas A&M University Health Science Center College of Medicine, Temple, Texas

²Research Service, Olin E. Teague Veterans' Medical Center, Central Texas Veterans Health Care System, Temple, Texas

³Department of Molecular and Cellular Medicine, Texas A&M University Health Science Center College of Medicine, College Station, Texas

Grafting of neural stem cells (NSCs) or GABA-ergic progenitor cells (GPCs) into the hippocampus could offer an alternative therapy to hippocampal resection in patients with drug-resistant chronic epilepsy, which afflicts >30% of temporal lobe epilepsy (TLE) cases. Multipotent, self-renewing NSCs could be expanded from multiple regions of the developing and adult brain, human embryonic stem cells (hESCs), and human induced pluripotent stem cells (hiPSCs). On the other hand, GPCs could be generated from the medial and lateral ganglionic eminences of the embryonic brain and from hESCs and hiPSCs. To provide comprehensive methodologies involved in testing the efficacy of transplantation of NSCs and GPCs in a rat model of chronic TLE, NSCs derived from the rat medial ganglionic eminence (MGE) and MGE-like GPCs derived from hiPSCs are taken as examples in this unit. The topics comprise description of the required materials, reagents and equipment, methods for obtaining rat MGE-NSCs and hiPSC-derived MGE-like GPCs in culture, generation of chronically epileptic rats, intrahippocampal grafting procedure, post-grafting evaluation of the effects of grafts on spontaneous recurrent seizures and cognitive and mood impairments, analyses of the yield and the fate of graft-derived cells, and the effects of grafts on the host hippocampus. © 2016 by John Wiley & Sons, Inc.

Keywords: cell transplantation • chronic temporal lobe epilepsy • cognitive and mood impairments • GABA-ergic progenitors • glial-cell line derived neurotrophic factor • hippocampal neurogenesis • human induced pluripotent stem cells • medial ganglionic eminence • phenotypic differentiation of graft-derived cells • spontaneous recurrent seizures

How to cite this article:

Upadhy, D., Hattiangady, B., Shetty, G.A., Zanirati, G., Kodali, M., and Shetty, A.K. 2016. Neural stem cell or human induced pluripotent stem cell–derived GABA-ergic progenitor cell grafting in an animal model of chronic temporal lobe epilepsy. *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.* 38:2D.7.1-2D.7.47. doi: 10.1002/cpsc.9

UNIT 2D.7

Somatic Stem Cells

2D.7.1

Supplement 38



Current Protocols in Stem Cell Biology 2D.7.1-2D.7.47, August 2016
Published online August 2016 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).
doi: 10.1002/cpsc.9
Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Inc.