



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

DANIELE VIEIRA DA SILVA

**ORIENTADOR:** PROFESSOR DOUTOR JADERSON COSTA DA COSTA

**PAPEL DO BAÇO NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA CEREBRAL EM  
MODELO EXPERIMENTAL DE EPILEPSIA EM RATOS TRATADOS COM  
CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA**

Porto Alegre, 2015.

---



---

DANIELE VIEIRA DA SILVA

PAPEL DO BAÇO NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA CEREBRAL EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE EPILEPSIA EM RATOS TRATADOS COM CÉLULAS  
MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA

Dissertação de Mestrado em Pediatria e Saúde da Criança do Curso de Pós-Graduação da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul-PUCRS como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Saúde da Criança.

**ORIENTADOR:** PROFESSOR DOUTOR JADERSON COSTA DA COSTA

Porto Alegre

2015

---

## DADOS DE CATALOGAÇÃO

**S586p** Silva, Daniele Vieira da

Papel do baço na resposta inflamatória cerebral em modelo experimental de epilepsia em ratos tratados com células mononucleares de medula óssea / Daniele Vieira da Silva. - Porto Alegre: PUCRS, 2015.

64 f. il. ; tab.

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança.

1. EPILEPSIA. 2. BAÇO. 3. RESPOSTA INFLAMATÓRIA. 4. PILOCARPINA. 5. CITOCINAS. 6. MEMÓRIA. 7. ESTUDO DE CARÁTER EXPERIMENTAL. I. Costa, Jaderson Costa da. II. Título.

**CDD** 616.8  
**CDU** 616.853(043.3)  
**NLM** WL 385

Isabel Merlo Crespo  
Bibliotecária CRB 10/1201

---

**DANIELE VIEIRA DA SILVA**

**PAPEL DO BAÇO NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA CEREBRAL EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE EPILEPSIA EM RATOS TRATADOS COM CÉLULAS  
MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA**

Dissertação de Mestrado em Pediatria e Saúde da Criança do  
Curso de Pós-Graduação da Pontifícia Universidade Católica do  
Rio Grande do Sul – PUCRS como parte dos requisitos para a  
obtenção do título de Mestre em Saúde da Criança.

Aprovada em : \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.

Banca examinadora

---

Magda Lahorgue Nunes

---

Zaquer Suzana Munhoz Costa Ferro

Porto Alegre

2015

---

## Dedicatória

---

*Dedico esta dissertação à minha família que em nenhum momento me deixou desistir...*

---

## Agradecimentos

---

Agradeço primeiramente aos meus familiares e amigos próximos. Meus pais Maria Elena e **Cícero**, pois sempre estiveram presentes em toda a minha educação, me passando a importância de batalhar e buscar sempre o seu melhor nunca esquecendo do respeito ao próximo. Agradeço a toda a minha família, meus irmãos Daiane, Cicero Junior e Denise, meu noivo Diego e minha tia Vera que estiveram presentes em todos os momentos do mestrado, apoiando sempre, e entendendo a minha falta em momentos que precisava me ausentar. Minha mãe e Denise acordadas até tarde ajudando a etiquetar os meus tubinhos de amostras. Ao Diego com sua paciência em estar sempre a postos para ajudar e sempre compreensivo. Enfim a toda a minha família agradeço imensamente.

Aos colegas de laboratório que sempre me deram apoio. Em especial Simone, Daniela e Ricardo, que nunca negaram nenhum tipo de ajuda, seja profissional ou de amizade. Michelle, que foi muito importante nessa jornada, tanto como um ombro amigo apoiando nos experimentos e vídeos. Demais colegas que sempre se mostraram dispostos a ajudar, Denis sempre solícito, Daniel que prontamente sempre esteve lá para ajudar e até mesmo na última hora se propôs ajudar com o PCR. Aos alunos de iniciação científica que foram essenciais para a execução do trabalho em especial Ismael, e Geraldine. Não posso deixar de citar e agradecer o apoio de Sílas, Barbara, Gabriela, Willians, Victória, Raiza, Juliana e demais alunos de Iniciação científica.

Agradeço ao Centro de memória que foi de grande importância para o desenvolvimento do testes. A todos os trabalhadores do centro, professor Ivan Izquierdo, Cristiane, Jociane, Caroline, Sheila e Bianca que em especial me deram apoio dentro do centro sempre que precisei.

Meus agradecimentos à professora Maria Martha que foi importantíssima com sua dedicação e paciência em me auxiliar. Ao seu aluno de Doutorado Rodrigo Bracini que me ajudou no teste de ELISA.

Ao Fabrício que desde o início, desde a elaboração do projeto me deu seu total apoio. A Gianina e Samuel que mesmo um pouquinho de longe sempre estavam atentos e dispostos a ajudar. A Zaquer pelo apoio, e auxílio.

Não poderia deixar de agradecer a secretária da pós graduação em pediatria Carla, que me ajudou muito durante todo o mestrado com muita atenção e dedicação, a secretária do

---

Instituto de pesquisas biomédicas, Elis que também sempre foi muito atenciosa nos auxílios prestados.

Ao professor Jaderson Costa da Costa agradeço pela sua sabedoria e orientações transmitidas ao longo do curso.

A todos o meu, muito obrigada!



“Os homens pensam que a epilepsia é divina meramente porque não a compreendem. Se eles denominassem divina qualquer coisa que não compreendem, não haveria fim para as coisas divinas.”

Hipócrates

---



## RESUMO:

---

A epilepsia compreende uma categoria de síndromes que se caracterizam por crises espontâneas e recorrentes (CERs), que são resultados de disparos elétricos intensos, sincronizados e rítmicos de populações neuronais no sistema nervoso central (SNC) e de excitabilidade excessiva, na ausência de condição tóxica-metabólica ou febril.<sup>1, 2, 3</sup> Pesquisas experimentais mostram que a indução do Status Epiléptico (SE) em roedores provoca reação inflamatória cerebral pronunciada envolvendo as células endoteliais, glia e neurônios.<sup>4, 5</sup> Nosso grupo mostrou que a administração de células da medula óssea por via intravenosa depois da indução do SE por lítio-pilocarpina é capaz de reduzir as CERs, melhorar a função cognitiva e modular a produção de citocinas pró-inflamatórias.<sup>6, 7</sup> O baço é importante na indução da resposta inflamatória cerebral e também é um alvo importante para a intervenção de células-tronco.<sup>8</sup> A esplenectomia antes do acidente vascular cerebral (AVC) reduz significativamente o tamanho do infarto no cérebro.<sup>9</sup> Foi também demonstrado que no modelo da pilocarpina, a esplenectomia diminuiu a gravidade das crises, o tempo para o início do SE, e a taxa de mortalidade causada pelo SE.<sup>10</sup> O objetivo do presente trabalho é investigar a importância da interação entre células mononucleares da medula óssea (CMMO) e o baço em ratos epiléticos. Como resultado do trabalho nossos animais tratados com as CMMO apresentaram melhor capacidade de reter a memória no teste do LAM quando comparados aos animais tratados sem o baço. Além disso, nesses animais o tratamento não teve o potencial de reduzir as taxas de IL-1  $\beta$  no soro e nem de aumentar os níveis de IL-10 no soro e no hipocampo de ratos tratados e sem o baço. Concluindo, o trabalho sugere que o baço possa estar envolvido modulando a cascata inflamatória no efeito terapêutico promovido pelo transplante de CMMO.

**Palavras chave:** Epilepsia, Baço, Resposta Inflamatória, Pilocarpina, Citocinas, Memória

---

## ABSTRACT:

---

### ***THE ROLE OF SPLEEN IN THE CEREBRAL INFLAMMATORY RESPONSE IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF EPILEPSY IN RATS TREATED WITH BONE MARROW MONONUCLEAR CELLS***

Epilepsy comprehends a category of syndromes characterized by spontaneous and recurrent crises (SRCs), which are a result of intense electric activity, synchronized and rhythmic of neuronal populations of the central nervous system (CNS), and of excessive excitability in the absence of a toxic-metabolic condition or fever<sup>1, 2, 3</sup>. Experimental studies have shown that SE induction in rodents provokes pronounced inflammatory cerebral reaction involving endothelial cells, glia, and neurons<sup>4, 5</sup>. Our group has shown that intravenous bone marrow cells administration following lithium-pilocarpine SE induction reduces SRCs, improves cognitive function, and modulates the production of pro-inflammatory cytokines<sup>6, 7</sup>. The spleen is important to induce cerebral inflammatory response and also is an important target for stem cell intervention therapies<sup>8</sup>. Splenectomy before a cerebrovascular accident (CVA) significantly reduces the infarction size in the brain<sup>9</sup>. Moreover, it has been demonstrated that in the pilocarpine model splenectomy decreases the severity of crises, the time to SE onset, and the mortality rate caused by SE<sup>10</sup>. The aim of the present work was investigating the importance of the interaction between bone marrow mononuclear cells (BMC) and the spleen in epileptic rats. As a result, the animals treated with BMC presented a better capability of memory retrieval in the Morris aquatic maze (MAM) when compared to the treated animals without the spleen. Besides, the treatment did not present the potential of reducing the levels of IL-1  $\beta$  or of increasing the levels of IL-10 in the serum and hippocampus of treated rats without the spleen. In conclusion, the work suggests that the spleen could be involved in the therapeutic effect promoted by BMC transplant.

**Keywords:** Epilepsy, Spleen, Inflammatory Response, Pilocarpine, Cytokines, Memory

---

## LISTA DE SIGLAS:

---

- CERs=Crises espontâneas e recorrentes
- SNC=Sistema nervoso central
- EEG=Eletroencefalograma
- SE=Status epiléptico
- ELT=Epilepsia do lobo temporal
- CA=Cornos de amon
- GABA=Ácido gama-aminobutírico
- CMMO=Células mononucleares de medula óssea
- PILO=Pilocarpina
- IL-1 $\beta$ =Interleucina -1 $\beta$
- IL-6=Interleucina-6
- IL-8=Interleucina-8
- MCP-1=Proteína Quimiotática de Monócitos-1
- BHE=Barreira hemato-encefálica
- AVC=Acidente vascular cerebral
- MPO=Marcador de Neutrófilo
- CCUH=Células de cordão Umbilical humano
- NK=Célula Natural Killer
- NLR= Receptor de ligação de nucleotídeos contendo domínio com sequência repetida de resíduos do aminoácido leucina
- ASC= Domínio de recrutamento de caspases
- DAMP=Padrão molecular associado ao perigo
- NLRP3= NLR com um domínio efetor de pirina (PYD) e uma proteína3
-

## SUMÁRIO

---

<b>CAPITULO I .....</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
JUSTIFICATIVA.....	19
HIPÓTESE .....	20
OBJETIVOS.....	21
OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	21
REFERÊNCIAS.....	22
<b>CAPITULO II.....</b>	<b>27</b>
<b>ARTIGO DE REVISÃO.....</b>	<b>27</b>
RESUMO.....	28
ABSTRACT.....	29
Lista de abreviaturas.....	30
INTRODUÇÃO.....	31
DESENVOLVIMENTO.....	32
CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS.....	39
<b>CAPITULO III.....</b>	<b>43</b>
<b>ARTIGO ORIGINAL.....</b>	<b>43</b>
RESUMO.....	44
ABSTRACT.....	45
INTRODUÇÃO.....	46
METODOLOGIA.....	47
RESULTADOS.....	51
DISCUSSÃO.....	55
REFERÊNCIAS.....	59
CONCLUSÃO GERAL.....	63

---

---

## **1. Disposição do trabalho:**

---

**Capítulo I-** Introdução ao tema, objetivos e justificativa do trabalho.

**Capítulo II-** Artigo de revisão que aborda o eixo entre o baço e o cérebro, e sua importância na resposta inflamatória cerebral.

**Capítulo III-** Artigo original com os resultados do projeto.

---

---

***CAPITULO I***

---

**INTRODUÇÃO**

---



## 2. Introdução ao tema

---

### 2.1 Epilepsia

Estima-se que 50 milhões de pessoas tenham epilepsia no mundo.<sup>11</sup> Sendo até 100 casos por 100 mil pessoas em países em desenvolvimento.<sup>12, 13</sup> A epilepsia compreende uma categoria de síndromes que se caracterizam por crises espontâneas e recorrentes (CERs), que são resultantes de disparos elétricos, sincronizados e rítmicos de populações neuronais no sistema nervoso central (SNC) e de excitabilidade excessiva, na ausência de condição tóxico-metabólica ou febril.<sup>3, 14, 15</sup> As crises epiléticas podem ou refletir um desequilíbrio da excitação e da inibição sináptica do encéfalo, ou interconexões excitatórias excessivamente intensas ou densas. Cerca de 7 a 10% da população terá pelo menos uma crise durante a vida, porém somente quando essas crises são espontâneas e recorrentes, a condição é conhecida como epilepsia.<sup>16</sup>

As crises epiléticas prolongadas e repetidas em intervalos curtos são características do *status epilepticus* (SE) que é uma complicação grave.<sup>14</sup> Cerca de 10% das crianças ou adultos que tenham uma crise espontânea, ou um diagnóstico recente de epilepsia, apresentam o quadro de SE, sendo o SE mais comum em crianças do que em adultos e ainda mais frequente em crianças menores de 2 anos de idade.<sup>17</sup> São descritos diversos tipos de epilepsia, somando em torno de 40 tipos distintos, que constam no quadro de classificação internacional da epilepsia e síndromes epiléticas. A classificação é feita a partir de dados como o tipo de crise, idade do início da crise, sinais clínicos ou neurológicos, padrões eletroencefalográficos e prognóstico.<sup>15, 18</sup> O mais comum e que frequentemente representa um distúrbio refratário ao tratamento é a epilepsia do lobo temporal (ELT).<sup>19</sup> Uma das formas da ELT é aquela onde ocorre comprometimento das estruturas temporais mesiais notadamente do hipocampo, (esclerose hipocampal). As principais considerações desta são <sup>20</sup> **I**) Lesões do sistema límbico temporal, principalmente no hipocampo, na amígdala, parahipocampo e no córtex entorrinal são responsáveis pelos principais sintomas de crises parciais, complexas, recorrentes e com generalizações secundárias (crises tônico clônicas) menos frequentes.<sup>21, 22 23</sup> **II**) É comum haver um fator que de início à ELT, (lesão precipitante inicial) como trauma por exemplo.<sup>24</sup> **III**) Outra característica marcante para a ELT é o período de latência, um período onde ocorre uma fase sem crises desde a ocorrência do fator desencadeante até a instalação da ELT

---

propriamente dita. **IV)** Esclerose hipocampal, na região de cornos de amon (CA) e região mesial. A atrofia do hipocampo é marcada por perda neuronal e gliose.<sup>25</sup>

O desenvolvimento da epilepsia pode ter muitas causas incluindo tumores cerebrais, trauma encefálico, disfunção metabólica, infecções no SNC, doença vascular e convulsões febris.<sup>12, 14</sup> Sendo basicamente envolvidos três fatores causais, predisposição individual, presença de lesão epileptogênica cerebral e alterações bioquímicas ou elétricas cerebrais.<sup>26</sup>

## ***2.2 Tratamento***

O tratamento existente para epilepsia é sintomático, ou seja, não apresenta caráter curativo, apenas controla as crises, melhorando a qualidade de vida dos pacientes. Fármacos antiepilépticos podem refrear a excitabilidade de diversas maneiras. Por exemplo, os barbitúricos e os benzodiazepínicos prolongam as ações inibitórias de Ácido gama-aminobutírico (GABA). A fenitoína e carbamazepina diminuem a tendência de certos neurônios dispararem potenciais de ação de alta frequência.<sup>16</sup> Entretanto cerca de 30% dos pacientes tornam-se refratários aos medicamentos, sendo candidatos à intervenção cirúrgica. No entanto o risco de perda de funções cerebrais limita o número de pacientes que podem receber este tratamento.<sup>27</sup>

Portanto a busca e o aperfeiçoamento de novas terapêuticas são essenciais para a vida dos pacientes que convivem com epilepsia.

## ***2.3 Terapia celular***

As células-tronco têm como principal característica a capacidade, tanto de se autorregenerar quanto de se diferenciar. Fazem parte de uma unidade natural do desenvolvimento embrionário e da reparação tecidual. E constituem um subconjunto de células imaturas indiferenciadas e não especializadas.<sup>28</sup> A medula óssea é uma fonte permanente de células-tronco adultas.<sup>29</sup> A fração mononuclear da medula óssea contém dois tipos de populações celulares: hematopoéticas e mesenquimais. Essas populações celulares podem estar envolvidas com a liberação de citocinas e fatores de crescimento envolvidos no processo de reparação natural.<sup>30</sup>

A terapia celular é uma estratégia em potencial para o tratamento de doenças neurológicas como epilepsia, apresentando efeito terapêutico nessa síndrome.<sup>6, 7, 31-33</sup> O efeito terapêutico deste tratamento tem sido explicado pela capacidade das células-tronco liberarem

---



fatores tróficos e citocinas que estão envolvidas no reparo e na regeneração tecidual.<sup>34-37</sup> Nosso grupo mostrou que a administração de células mononucleares da medula óssea (CMMO) por via intravenosa depois da indução do SE por pilocarpina é capaz de reduzir a frequência de Crises espontâneas e recorrentes, melhorar a função cognitiva dos animais com epilepsia crônica além de modular a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) e anti-inflamatória (IL-10).<sup>33, 36</sup>

#### **2.4 Modelo experimental- Pilocarpina**

Existem muitos modelos de epilepsia experimental em animais. Dentre estes os modelos mais bem estabelecidos induzem uma cascata de eventos moleculares e estruturais que resultam em modificações nas propriedades neuronais intrínsecas, tornando essas redes neuronais epileptogênicas.<sup>38</sup>

Modelo experimental com pilocarpina inicialmente descrito por Turski e colaboradores.<sup>39</sup> é dentre os modelos in vivo existentes, o que mais se aproxima da ELT. Um estado comportamental crônico similar a ELT humana é causada pela administração sistêmica de pilocarpina em roedores, que inicialmente leva ao SE, e após um período livre de crises, a uma condição crônica determinada pelas CERs.<sup>40</sup> A pilocarpina (PILO) é extraída de folhas de *Pilocarpus microphyllus* e *Pilocarpus jaborandi*, árvores sul americanas é um agonista colinérgico, que a partir da ativação de muitos neurônios durante o *status epilépticos* ocorre uma ativação secundária do sistema glutamatérgico e assim, excitotoxicidade no hipocampo e demais estruturas. O dano neuronal excito tóxico agudo associado a outras alterações moleculares leva a morte neuronal, reorganização sináptica, sinaptogênese e neurogênese no hipocampo, assim como mudanças nas propriedades eletrofisiológicas neuronais.<sup>40</sup>

#### **2.5 Epilepsia e inflamação**

A relação entre epilepsia e sistema imune vem recebendo mais atenção nos últimos anos. Pesquisa clínica e experimental sugerem que infecção, inflamação e fatores inflamatórios como citocinas podem contribuir para a predisposição e ocorrência de crises relacionadas com o dano cerebral.<sup>41-45,4, 46-48</sup>

Estudos experimentais têm mostrado que a indução do SE em roedores através do estímulo elétrico de regiões límbicas do cérebro ou sistêmica, como administração de drogas convulsivantes, provocam reação inflamatória cerebral pronunciada envolvendo as células

endoteliais, glia e neurônios.<sup>4,5</sup> A inflamação cerebral induzida pelo SE é detectável em níveis significativos durante a fase de epileptogênese que antecede o início das CERs, mas é também encontrada no tecido epiléptico crônico.<sup>49, 50</sup> Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-8 (IL-8), TNF- $\alpha$  e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) são rapidamente reguladas no encéfalo depois do SE.<sup>43,51</sup> IL-2, tem papel importante na regulação de Células T.<sup>52</sup> Citocinas Pro-inflamatórias como IL-1 beta e TNF-alfa no cérebro podem influenciar aspectos normais de transmissão neuronal.<sup>49, 53-57</sup> Costa-ferro mostrou que as CMMO tem a capacidade de reduzir a frequência de crises e reduz os níveis de IL-1 $\beta$  e aumenta os níveis de IL-10.<sup>6, 33</sup> O efeito benéfico do transplante esta associado aos efeitos indiretos, como modulação de fatores tróficos e de fatores inflamatórios.<sup>58</sup>

Estes fatores inflamatórios promovem a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais vasculares, comprometendo a função da barreira hemato-encefálica (BHE) permitindo a infiltração no encéfalo de neutrófilos, monócitos, macrófagos e linfócitos T. A interação entre leucócitos e células endoteliais vasculares modulam as CERs em um modelo roedor de ELT.<sup>59</sup> Estratégias experimentais para bloquear a inflamação sistêmica no SNC reduzem a duração do SE e a frequência de crises.<sup>60, 61</sup>

Assim como na epilepsia a inflamação no cérebro pós-isquêmico em modelos de AVC vem sendo estudado, mas não esta bem caracterizada. Além disso, um estudo experimental com camundongos em modelo de AVC resultou na diminuição das células imunes em órgãos da periferia e diminuição da secreção de TNF-alfa e IFN-gama que contribuiu para uma infecção sistêmica espontânea, uma das causas de morte em pacientes com AVC.<sup>62</sup> Este estudo sugere que exista uma relação entre resposta inflamatória sistêmica (órgãos linfóides) e cerebral. Diversas manifestações do sistema nervoso central, como febre, atividade locomotora reduzida, comportamento doentio são atribuídos a ativação neuronal durante inflamação periférica.<sup>63</sup> Em outras palavras doenças inflamatórias da periferia são relacionadas com o aparecimento da resposta inflamatória no cérebro e são geradas de maneiras semelhantes.<sup>64</sup>

Entretanto a relação exata entre estes fatores inflamatórios sistêmicos e patologias do SNC não são bem conhecidos tanto do ponto de vista do cérebro quanto do sistema imune.<sup>65</sup>

---

## ***2.6 Relação do baço com doenças do SNC***

O baço é dividido em duas regiões com função e morfologias diferentes a polpa vermelha é responsável por filtrar e remover do sangue células mortas, velhas ou com alguma anormalidade, possui também a função de armazenamento de ferro, eritrócitos e plaquetas. A polpa branca atua como órgão linfóide é subdividida em Bainha Linfóide Periarteriolar, folículos e zona marginal. O baço contém um quarto dos linfócitos do corpo e é responsável por iniciar a resposta imune.<sup>66-68</sup> A retirada do baço por meio cirúrgico pode ser necessário no caso de complicações na clínica, e na pesquisa experimental vem sendo usada como ferramenta de estudo deste órgão. Evidências vêm surgindo sobre a existência de alguma relação entre o baço e o SNC, mas os fatores envolvidos ainda não estão bem claros.

A esplenectomia antes do acidente vascular cerebral (AVC) reduz significativamente o tamanho do infarto no cérebro.<sup>69</sup> O baço pode responder ao AVC liberando células imunes para a corrente sanguínea que consequentemente migram para o cérebro e promovem resposta inflamatória secundária, aumentando a neurodegeneração. Isto pode explicar o fato da lesão diminuir com a esplenectomia antes do AVC explica Craig (2008). Além disso, foram detectadas menos células marcadas por MPO (marcador de neutrófilo) em cérebros de animais que passaram por AVC, após a esplenectomia quando comparados aos animais que não passaram pela cirurgia. Sugerindo que as células antes encontradas no cérebro eram derivadas do baço.<sup>69</sup> Estudos prévios têm demonstrado alteração da função esplênica depois do AVC e um aumento da circulação de citocinas pró-inflamatórias.<sup>65, 70-72</sup> Processos imune/inflamatórios do baço são potenciais alvos terapêuticos para diminuir a inflamação cerebral gerada pelo AVC.<sup>73</sup>

Um mecanismo de ação que pode estar envolvido no aumento do volume do infarto cerebral após o AVC é a ativação do sistema nervoso simpático resultando em contração do baço e uma liberação de células vermelhas e brancas do sangue.<sup>74</sup> Esta contração provoca a liberação de células do sistema imunológico, que são atraídos para o cérebro por quimiocinas induzidas pelo acidente vascular cerebral. Estas células imunes periféricas podem estar agindo para aumentar a neuroinflamação e posteriormente, a neurodegeneração.<sup>75, 76</sup> Dados mostram que a infiltração de células como monócitos/macrófagos tem importante papel na neuroinflamação e podem ser fatores necessários para a ativação da micróglia.<sup>54, 73</sup> Isto é consistente com outros relatos que mostram uma resposta esplênica ativa no acidente vascular cerebral em ratos.<sup>65, 72</sup>

---

A relação entre o baço e a epilepsia ainda não está bem estabelecida. Em modelo de epilepsia induzida por ácido cáinico a atividade metabólica dos esplenócitos está aumentada podendo estar relacionada ao aumento de atividade de macrófagos.<sup>77</sup> Além disso, foi demonstrado que no modelo da pilocarpina, a esplenectomia diminuiu a gravidade das crises, o tempo para o início do SE, e a taxa de mortalidade causada pelo SE. A anatomia das células do baço é comprometida após administração de pilocarpina, onde uma mudança anatômica consiste na desorganização dos folículos e baixa distinção entre as duas polpas do baço, branca e vermelha, no mesmo trabalho foi encontrado um aumento de células T presentes no baço após o SE induzido pela administração de pilocarpina.<sup>10</sup>

Estudos experimentais com isquemia cardíaca e cerebral, além de epilepsia, mostram que células mononucleares da medula óssea são encontradas no baço durante vários dias após o transplante.<sup>33, 78, 79</sup> O baço é importante na indução da resposta inflamatória cerebral e também é um alvo importante para a intervenção de células-tronco.<sup>8</sup> Células de cordão umbilical humano (CCUH), transplantadas em ratos, 24 horas depois da isquemia, foram retidas no baço e foi constatada uma redução de 60% da área infartada. Este estudo também mostrou que as células foram encontradas somente no hemisfério infartado e no baço. O transplante de CCUH não só diminuiu os níveis de citocinas pró-inflamatórias como também aumentou os níveis de citocinas anti-inflamatórias com IL-10.<sup>72</sup> O fato de os níveis de citocinas pró-inflamatórias estar diminuído leva a uma redução do dano neuronal. Tratamentos que tenham um efeito similar ao das CCUH para bloquear a resposta esplênica podem ser excelentes candidatos a terapia para doenças do SNC segundo Ajmo e colaboradores (2008).<sup>73</sup>

## ***2.7 Baço e imunomodulação cerebral***

Estudos *in vivo*, *in situ* e *in vitro* evidenciam que algumas substâncias são liberadas pelo baço e tem relação direta com o SNC. As terminações nervosas do baço são responsáveis pela produção e liberação de fatores humorais como cortisol e adrenalina.<sup>80, 81</sup> Outros fatores como neuropeptídeo Y, substância P e opióides são produzidos ao longo dos nervos esplênicos e transportados via axônio até a terminação nervosa.<sup>82, 83</sup> Estudos imuno histoquímicos mostram uma íntima associação entre as terminações nervosas com linfócitos e macrófagos. Muitas das células imunes encontradas e produzidas no baço têm receptores para agentes adrenérgicos, encefalinas, endorfinas entre outros. As células que possuem esses receptores são células natural killers (NK), macrófagos, linfócitos, granulócitos e monócitos. As células imunes são

---

liberadas frente alguma lesão ou estímulo interno que indique perigo, essas células são responsáveis pela liberação e estimulação de fatores inflamatórios importantes como interleucinas e inflamassomas.<sup>16, 81, 83</sup> Inflamassomas são complexos multi-proteicos que agem como uma plataforma ativadora de caspases. Os inflamassomas são constituídos por um receptor de ligação a nucleotídeo contendo domínio com sequência repetida de resíduos do aminoácido leucina (NLR), uma Proteína associada a apoptose contendo um domínio de recrutamento de caspase (ASC) e uma enzima caspase-1. Caspases são enzimas envolvidas na regulação celular, apoptose, necrose e inflamação. Os inflamassomas são formados em resposta a patógenos ou em respostas inflamatórias estéreis através de sinais como padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs). DAMPs são substâncias liberadas durante o estresse e lesão celular em respostas inflamatórias estéreis, como trauma e isquemia. Através de vias inflamatórias o inflamassoma pode ativar a produção de IL-1 $\beta$  e IL-18. Inflamassoma NLRP3 (NLR com um domínio efetor de pirina (PYD) e uma proteína3) é ativado por DAMPs e está envolvido na passagem de pró-IL-1 $\beta$  para sua forma biologicamente ativa que é a Interleucina 1- $\beta$ . Esta interleucina está intimamente relacionada ao dano induzido por resposta inflamatória e tem atividade pró convulsivante.<sup>84-87</sup>

Uma vez instalada, a resposta inflamatória causa danos e acredita-se que o baço esteja intimamente relacionado com início da resposta inflamatória cerebral e sistêmica. O baço é responsável pela liberação de interleucinas como IL-6 e IL-10, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . A modulação dessas interleucinas e citocinas ocorre a nível intracelular, por exemplo, a ligação de  $\beta$ -adrenoreceptores em linfócitos aumenta o nível intracelular de AMP cíclico o que leva ao aumento de IL-10, IL-6, IL-4 e reduz a liberação de TNF- $\alpha$ , Interferon-gama e IL-12.<sup>82</sup> Sobre a Interleucina-6 está bem estabelecido que sua produção via macrófagos é modulada pela liberação de noradrenalina. Além disso, IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  modulam o SNC direta ou indiretamente através de receptores sensoriais aferentes como o nervo vago.<sup>88</sup> Essas e outras evidências mostram que o sistema periférico tem influência sobre a inflamação no tecido nervoso.

### **3 Justificativa:**

---

A importância de conhecer melhor os fatores envolvidos no tratamento com CMMO nos animais com epilepsia aumenta a possibilidade de passar esse tratamento para a fase clínica com mais segurança podendo beneficiar pacientes com epilepsia, refratários ao

---

tratamento. As reações inflamatórias envolvidas em doenças do SNC como epilepsia ainda não estão bem esclarecidos na literatura<sup>4</sup>, trabalhos que visam entender melhor esses mecanismos são de extrema importância. Além disso, os trabalhos que envolvem epilepsia e baço são muito poucos ainda, e esse tema necessita ser mais esclarecido.

#### **4 Hipótese:**

---

A epilepsia induzida pelo modelo de pilocarpina gera uma resposta inflamatória cerebral. A terapia celular reduz crises convulsivas e melhora a cognição dos animais epiléticos que foram tratados com essa terapia. Sabe-se que a terapia celular envolve uma série de mecanismos que levam a sua eficácia. Um dos mecanismos estudados é a modulação de fatores inflamatórios. Em outras doenças do SNC que tem como característica a inflamação do tecido neural como AVC, o envolvimento do baço na progressão da doença e no efeito da terapia celular é objeto de estudo. Nesse trabalho a nossa hipótese é de que as células transplantadas podem estar presentes no baço após o transplante e podem estar modulando fatores inflamatórios importantes para a prevenção ou reparação do dano cerebral gerado pela epilepsia. Através da esplenectomia podemos avaliar o papel do baço no transplante de CMMO. Através desses resultados podemos investigar o envolvimento do baço para a eficácia da terapia celular com CMMO na epilepsia induzida por pilocarpina em ratos Wistar.

---

---

## **5.Objetivo do artigo original:**

---

O objetivo do trabalho foi investigar a possível influência do baço no transplante de células mononucleares de medula óssea em ratos submetidos ao modelo experimental de epilepsia e na modulação da inflamação.

### **5.1 Objetivos específicos:**

---

Em ratos com epilepsia induzida pelo modelo de pilocarpina e tratados com células mononucleares de medula óssea (CMMO):

- 1- Verificar o desempenho cognitivo em ratos esplenectomizados com epilepsia crônica após transplante de CMMO.
  - 2- Avaliar a função do baço nos níveis de Interleucinas em ratos com epilepsia crônica e transplantados com CMMO.
-

## 7 Referências:

---

1. Gastaut H. Individualisation des epilepsies dites «benignes ou «fonctionnelles aux différents âges de la vie. Appréciation des variations correspondantes de la prédisposition épileptique à ces âges. *Revue d'Electroencéphalographie et de Neurophysiologie Clinique*. 1981;11(3):346-66.
  2. Rogawski MA. Therapeutic potential of excitatory amino acid antagonists: channel blockers and 2, 3-benzodiazepines. *Trends in pharmacological sciences*. 1993;14(9):325-31.
  3. McNamara JO. Cellular and molecular basis of epilepsy. *The journal of neuroscience*. 1994;14(6):3413-25.
  4. Vezzani A, Granata T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia*. 2005;46(11):1724-43.
  5. Oby E, Janigro D. The blood-brain barrier and epilepsy. *Epilepsia*. 2006;47(11):1761-74.
  6. Costa-Ferro ZS, Souza BS, Leal MM, Kaneto CM, Azevedo CM, da Silva IC, et al. Transplantation of bone marrow mononuclear cells decreases seizure incidence, mitigates neuronal loss and modulates pro-inflammatory cytokine production in epileptic rats. *Neurobiology of disease*. 2012;46(2):302-13.
  7. Venturin GT, Greggio S, Marinowic DR, Zanirati G, Cammarota M, Machado DC, et al. Bone marrow mononuclear cells reduce seizure frequency and improve cognitive outcome in chronic epileptic rats. *Life sciences*. 2011;89(7):229-34.
  8. Lee S-T, Chu K, Jung K-H, Kim S-J, Kim D-H, Kang K-M, et al. Anti-inflammatory mechanism of intravascular neural stem cell transplantation in haemorrhagic stroke. *Brain*. 2008;131(3):616-29.
  9. Craig P, Dieppe P, Macintyre S, Michie S, Nazareth I, Petticrew M. Developing and evaluating complex interventions: the new Medical Research Council guidance. *Bmj*. 2008;337.
  10. Marchi N, Johnson AJ, Puvenna V, Johnson HL, Tierney W, Ghosh C, et al. Modulation of peripheral cytotoxic cells and ictogenesis in a model of seizures. *Epilepsia*. 2011;52(9):1627-34.
  11. Ngugi AK, Bottomley C, Kleinschmidt I, Sander JW, Newton CR. Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach. *Epilepsia*. 2010;51(5):883-90.
  12. Sander J, Hart Y. *A epidemiologia da epilepsia*. Epilepsia: Um Guia Prático Merit-Publishing International. 1999.
  13. Engel J. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2001;42(6):796-803.
  14. de Graaf AS, Kayed KS. Epileptic seizures and EEG changes after radiculography with meglumine iothalamate (Conray) and meglumine iocarmate (Dimer-X). A case report. *Psychiatria, neurologia, neurochirurgia*. 1973;76(2):77-82. Epub 1973/03/01.
  15. Rogawski MA, Porter RJ. Antiepileptic drugs: pharmacological mechanisms and clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds. *Pharmacological Reviews*. 1990;42(3):223-86.
  16. Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. *Neurociências: desvendando o sistema nervoso* 2007.
  17. Hauser W. Status epilepticus: epidemiologic considerations. *Neurology*. 1990;40(5 Suppl 2):9-13.
  18. Engel J. ILAE classification of epilepsy syndromes. *Epilepsy research*. 2006;70(1):5-10.
  19. Wieser H-G. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia*. 2004;45(6):695.
  20. Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RS, Avoli M. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Journal of neuroscience methods*. 2008;172(2):143-57.
  21. Blümcke I, Beck H, Lie AA, Wiestler OD. Molecular neuropathology of human mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy research*. 1999;36(2):205-23.
-



22. Avoli M, D'Antuono M, Louvel J, Köhling R, Biagini G, Pumain R, et al. Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro. *Progress in neurobiology*. 2002;68(3):167.
  23. Bartolomei F, Bosma I, Klein M, Baayen JC, Reijneveld JC, Postma TJ, et al. Disturbed functional connectivity in brain tumour patients: evaluation by graph analysis of synchronization matrices. *Clinical neurophysiology*. 2006;117(9):2039-49.
  24. Mathern GW, Babb TL, Vickrey BG, Melendez M, Pretorius JK. The clinical-pathogenic mechanisms of hippocampal neuron loss and surgical outcomes in temporal lobe epilepsy. *Brain*. 1995;118(1):105-18.
  25. Mathern GW, Babb TL, Micevych PE, Blanco CE, Pretorius JK. Granule cell mRNA levels for BDNF, NGF, and NT-3 correlate with neuron losses or supragranular mossy fiber sprouting in the chronically damaged and epileptic human hippocampus. *Molecular and chemical neuropathology*. 1997;30(1-2):53-76.
  26. Guerreiro A, Guerreiro M, Cendes F, Lopes-Cendes I, Guerreiro C. Considerações gerais. *Epilepsia*. 2000:1-10.
  27. Löscher W. Current status and future directions in the pharmacotherapy of epilepsy. *Trends in pharmacological sciences*. 2002;23(3):113-8.
  28. Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms review in stem cell biology. *Cell*. 1997;88:287-98.
  29. Körbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair—a new therapeutic concept? *New England Journal of Medicine*. 2003;349(6):570-82.
  30. Takahashi M, Li T-S, Suzuki R, Kobayashi T, Ito H, Ikeda Y, et al. Cytokines produced by bone marrow cells can contribute to functional improvement of the infarcted heart by protecting cardiomyocytes from ischemic injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2006;291(2):H886-H93.
  31. Chu M, Diele F, Plemmons R, Ragni S, editors. *Optimality, computation, and interpretation of nonnegative matrix factorizations*. SIAM Journal on Matrix Analysis; 2004: Citeseer.
  32. Shetty D, Yennello S, Souliotis G. Density dependence of the symmetry energy and the equation of state of isospin asymmetric nuclear matter. *Physical Review C*. 2007;75(3):034602.
  33. Costa-Ferro ZS, Vitola AS, Pedroso MF, Cunha FB, Xavier LL, Machado DC, et al. Prevention of seizures and reorganization of hippocampal functions by transplantation of bone marrow cells in the acute phase of experimental epilepsy. *Seizure*. 2010;19(2):84-92.
  34. Chopp M, Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *The Lancet Neurology*. 2002;1(2):92-100.
  35. Mezey É, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science*. 2000;290(5497):1779-82.
  36. Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*. 2001;105(3):369-77.
  37. Shyu W-C, Lin S-Z, Lee C-C, Liu DD, Li H. Granulocyte colony-stimulating factor for acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *Canadian Medical Association Journal*. 2006;174(7):927-33.
  38. Cavalheiro E, Leite J, Bortolotto Z, Turski W, Ikonomidou C, Turski L. Long-Term Effects of Pilocarpine in Rats: Structural Damage of the Brain Triggers Kindling and Spontaneous I Recurrent Seizures. *Epilepsia*. 1991;32(6):778-82.
  39. Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behavioural brain research*. 1983;9(3):315-35.
  40. Sanabria E, EA C. Epileptogênese: contribuição dos modelos experimentais. *Epilepsia São Paulo: Lemos Editorial*. 2000:29-57.
  41. Aarli JA. Immunological aspects of epilepsy. *Brain and Development*. 1993;15(1):41-9.
-

42. Dube G, Lehto SG, Breese NM, Baker SJ, Wang X, Matulenko MA, et al. Electrophysiological and in vivo characterization of A-317567, a novel blocker of acid sensing ion channels. *Pain*. 2005;117(1):88-96.
  43. Jankowsky JL, Patterson PH. The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae. *Progress in neurobiology*. 2001;63(2):125-49.
  44. Lukasiuk K, Dabrowski M, Adach A, Pitkänen A. Epileptogenesis-related genes revisited. *Progress in brain research*. 2006;158:223-41.
  45. Sayyah M, Javad-Pour M, Ghazi-Khansari M. The bacterial endotoxin lipopolysaccharide enhances seizure susceptibility in mice: involvement of proinflammatory factors: nitric oxide and prostaglandins. *Neuroscience*. 2003;122(4):1073-80.
  46. Ravizza T, Boer K, Redeker S, Spliet W, Van Rijen P, Troost D, et al. The IL-1 $\beta$  system in epilepsy-associated malformations of cortical development. *Neurobiology of disease*. 2006;24(1):128-43.
  47. Somera-Molina KC, Robin B, Somera CA, Anderson C, Stine C, Koh S, et al. Glial Activation Links Early-Life Seizures and Long-Term Neurologic Dysfunction: Evidence Using a Small Molecule Inhibitor of Proinflammatory Cytokine Upregulation. *Epilepsia*. 2007;48(9):1785-800.
  48. Gassen V, Koen L, De Wit M, Koerkamp MJ, Rensen MG, Van Rijen PC, et al. Possible role of the innate immunity in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 2008;49(6):1055-65.
  49. De Simoni MG, Perego C, Ravizza T, Moneta D, Conti M, Marchesi F, et al. Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. *European Journal of Neuroscience*. 2000;12(7):2623-33.
  50. Gorter JA, van Vliet EA, Aronica E, Breit T, Rauwerda H, da Silva FHL, et al. Potential new antiepileptogenic targets indicated by microarray analysis in a rat model for temporal lobe epilepsy. *The journal of neuroscience*. 2006;26(43):11083-110.
  51. Ravizza T, Gagliardi B, Noé F, Boer K, Aronica E, Vezzani A. Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of disease*. 2008;29(1):142-60.
  52. Benczik M, Gaffen SL. The interleukin (IL)-2 family cytokines: survival and proliferation signaling pathways in T lymphocytes. *Immunological investigations*. 2004;33(2):109-42.
  53. Balosso S, Maroso M, Sanchez-Alavez M, Ravizza T, Frasca A, Bartfai T, et al. A novel non-transcriptional pathway mediates the proconvulsive effects of interleukin-1 $\beta$ . *Brain*. 2008;131(12):3256-65.
  54. Vezzani A, Sperk G, Colmers WF. Neuropeptide Y: emerging evidence for a functional role in seizure modulation. *Trends in neurosciences*. 1999;22(1):25-30.
  55. Vezzani A, Moneta D, Richichi C, Aliprandi M, Burrows SJ, Ravizza T, et al. Functional role of inflammatory cytokines and antiinflammatory molecules in seizures and epileptogenesis. *Epilepsia*. 2002;43(s5):30-5.
  56. Viviani B, Bartesaghi S, Gardoni F, Vezzani A, Behrens M, Bartfai T, et al. Interleukin-1 $\beta$  enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *The journal of neuroscience*. 2003;23(25):8692-700.
  57. Wang Y, Uecker DR, Laby KP, Wilson JD, Jordan CS, Ghodoussi M, et al. Method and apparatus for performing minimally invasive surgical procedures. *Google Patents*; 2000.
  58. Agadi S, Shetty AK. Prospects of Bone Marrow Mononuclear Cells and Mesenchymal Stem Cells for Treating Status Epilepticus and Chronic Epilepsy. *Stem Cells*. 2015.
  59. Fabene PF, Mora GN, Martinello M, Rossi B, Merigo F, Ottoboni L, et al. A role for leukocyte-endothelial adhesion mechanisms in epilepsy. *Nature medicine*. 2008;14(12):1377-83.
  60. Marchi N, Fan Q, Ghosh C, Fazio V, Bertolini F, Betto G, et al. Antagonism of peripheral inflammation reduces the severity of status epilepticus. *Neurobiology of disease*. 2009;33(2):171-81.
  61. Maroso M, Balosso S, Ravizza T, Liu J, Aronica E, Iyer AM, et al. Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures. *Nature medicine*. 2010;16(4):413-9.
-

62. Prass K, Scharff A, Ruscher K, Löwl D, Muselmann C, Victorov I, et al. Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin. *Stroke*. 2003;34(8):1981-6.
  63. Simard A, Rivest S. Do pathogen exposure and innate immunity cause brain diseases? *Neurological research*. 2005;27(7):717-25.
  64. Riazi K, Galic MA, Pittman QJ. Contributions of peripheral inflammation to seizure susceptibility: cytokines and brain excitability. *Epilepsy research*. 2010;89(1):34-42.
  65. Offner H, Subramanian S, Parker SM, Wang C, Afentoulis ME, Lewis A, et al. Splenic atrophy in experimental stroke is accompanied by increased regulatory T cells and circulating macrophages. *The Journal of Immunology*. 2006;176(11):6523-31.
  66. Kuper C, De Heer E, Van Loveren H, Vos J. Immune system. *Handbook of toxicological pathology*. 2002;2:585-646.
  67. Nolte MA, Hamann A, Kraal G, Mebius RE. The strict regulation of lymphocyte migration to splenic white pulp does not involve common homing receptors. *Immunology*. 2002;106(3):299-307.
  68. Balogh P, Horváth G, Szakal AK. Immunoarchitecture of distinct reticular fibroblastic domains in the white pulp of mouse spleen. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2004;52(10):1287-98.
  69. Craig P, Dieppe P, Macintyre S, Michie S, Nazareth I, Petticrew M. Developing and evaluating complex interventions: the new Medical Research Council guidance. *BMJ: British Medical Journal*. 2008;337.
  70. Gendron A, Teitelbaum J, Cossette C, Nuara S, Dumont M, Geadah D, et al. Temporal effects of left versus right middle cerebral artery occlusion on spleen lymphocyte subsets and mitogenic response in Wistar rats. *Brain research*. 2002;955(1):85-97.
  71. Offner H, Subramanian S, Parker SM, Afentoulis ME, Vandenbark AA, Hurn PD. Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2005;26(5):654-65.
  72. Vendrame M, Gemma C, Pennypacker KR, Bickford PC, Davis Sanberg C, Sanberg PR, et al. Cord blood rescues stroke-induced changes in splenocyte phenotype and function. *Experimental neurology*. 2006;199(1):191-200.
  73. Ajmo CT, Vernon DO, Collier L, Hall AA, Garbuzova-Davis S, Willing A, et al. The spleen contributes to stroke-induced neurodegeneration. *Journal of neuroscience research*. 2008;86(10):2227-34.
  74. Stewart IB, McKenzie DC. The human spleen during physiological stress. *Sports Medicine*. 2002;32(6):361-9.
  75. Hausmann E, Berman N, Wang Y-Y, Meara JB, Wood GW, Klein RM. Selective chemokine mRNA expression following brain injury. *Brain research*. 1998;788(1-2):49.
  76. Ábrahám CS, Harada N, Deli MA, Niwa M. Transient forebrain ischemia increases the blood-brain barrier permeability for albumin in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Cellular and molecular neurobiology*. 2002;22(4):455-62.
  77. Kubera M, Budziszewska Ba, Basta-Kaim A, Zajicova A, Holan V, Lasoň Waa. Immunoreactivity in kainate model of epilepsy. *Polish journal of pharmacology*. 2001;53(5):541-6.
  78. Widimský J, Sirotiaková J. Efficacy and tolerability of rilmenidine compared with isradipine in hypertensive patients with features of metabolic syndrome. *Current Medical Research and Opinion®*. 2006;22(7):1287-94.
  79. Barbosa da Fonseca LM, Gutfilen B, Rosado de Castro PH, Battistella V, Goldenberg R, Kasai-Brunswick T, et al. Migration and homing of bone-marrow mononuclear cells in chronic ischemic stroke after intra-arterial injection. *Experimental neurology*. 2010;221(1):122-8.
  80. Blalock JE. The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunology today*. 1994;15(11):504-11.
  81. Besedovsky HO, Rey AD. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocrine reviews*. 1996;17(1):64-102.
  82. Bourne H, Weinstein Y, Melmon K, Lichtenstein L, Henney C, Shearer G. Modulation of inflammation and immunity by cyclic AMP. *Science*. 1974;184(4132):19-28.
-

83. Lundberg J, Rudehill A, Sollevi A, Fried G, Wallin G. Co-release of neuropeptide Y and noradrenaline from pig spleen in vivo: importance of subcellular storage, nerve impulse frequency and pattern, feedback regulation and resupply by axonal transport. *Neuroscience*. 1989;28(2):475-86.
  84. Paiva-Oliveira EL, Silva AC, Silva RM, Sevenini LA, Melo HA, Lagrota-Candido JM, et al. Inflamassoma e sua repercussão clínica: revisão da literatura. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*. 2012;11(1):96-102.
  85. Fukata M, Abreu MT. Pathogen recognition receptors, cancer and inflammation in the gut. *Current opinion in pharmacology*. 2009;9(6):680-7.
  86. Davis BK, Wen H, Ting JP. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annual review of immunology*. 2011;29:707.
  87. Młodzikowska-Albrecht J, Steinborn B, Zarowski M. Cytokines, epilepsy and epileptic drugs--is there a mutual influence? *Pharmacological reports: PR*. 2006;59(2):129-38.
  88. Straub RH, Westermann J, Schölmerich J, Falk W. Dialogue between the CNS and the immune system in lymphoid organs. *Immunology today*. 1998;19(9):409-13.
-