

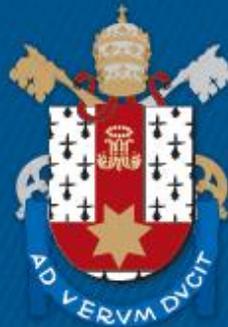
ESCOLA DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

DANIELE VIEIRA DA SILVA

O EIXO BAÇO-CÉREBRO NA EPILEPSIA EXPERIMENTAL E NO  
TRATAMENTO COM CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA APÓS  
*O STATUS EPILÉPTICUS*

Porto Alegre  
2019

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul

DANIELE VIEIRA DA SILVA

**O EIXO BAÇO-CÉREBRO NA EPILEPSIA EXPERIMENTAL E NO  
TRATAMENTO COM CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA APÓS  
*O STATUS EPILÉPTICUS***

Tese de Doutorado apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança, da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

ORIENTADOR: DR. JADERSON COSTA DA COSTA

Porto Alegre

2019

## Ficha Catalográfica

D111e da Silva, Daniele Vieira

O eixo baço-cérebro na epilepsia experimental e no tratamento com células mononucleares de medula óssea após o status epiléptico / Daniele Vieira da Silva . – 2019.

147.

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

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa DaCosta.

1. Baço. 2. cérebro. 3. epilepsia. 4. inflamação. 5. memória. I. DaCosta, Jaderson Costa. II. Título.

DANIELE VIEIRA DA SILVA

**O EIXO BAÇO-CÉREBRO NA EPILEPSIA EXPERIMENTAL E NO  
TRATAMENTO COM CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA APÓS  
*O STATUS EPILÉPTICUS***

Tese de Doutorado apresentada como requisito para  
obtenção do grau de Doutora pelo Programa de Pós-  
Graduação em Pediatria e Saúde da Criança, da Faculdade de  
Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande  
do Sul.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Ana Paula Duarte- PUCRS

---

Prof. Dr. Guido Lenz - UFRGS

---

Profa. Dr Lucas Porcello Schilling..- PUCRS

---

Dr. Thiago Viola PUCRS (Suplente)

PORTO ALEGRE

2019

*Aos meus pais Maria Elena, e Cicero.  
Aos meus irmãos Daiane, Cicero Junior e Denise.  
E ao meu companheiro de sempre Diego.*

*“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu.  
Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos,  
lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”.*

*(Paulo Beleki)*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Dr. Jaderson Costa, tenho o meu mais profundo agradecimento por sempre tentar passar um pouco de toda a sua sabedoria. Sua orientação ao longo dos estudos foi muito importante para a realização desta etapa.

Agradeço a Zaquer Costa que sempre me auxiliou muito durante todo o doutorado e mais do que nunca no final desta etapa. Sempre com muita boa vontade, paciência e dedicação.

Aos colegas do laboratório de neurociências, em especial Simone Salamoni, Ricardo Breda e Daniela Abreu por estarem sempre dispostos a ajudar. Agradeço aos alunos de pós-doc do laboratório, Gabriele Zanirati, Pamela Azevedo e Ângela Zanata. Ao Daniel Marinowic que sempre se empenhou no auxílio das técnicas usadas no trabalho e além de tudo sempre esteve disposto a explicar sobre os “assuntos moleculares”.

Agradeço aos ICs do laboratório Paula, Fernanda, Allan, Isadora, e Eduardo e aos demais que passaram pelo laboratório neste período, por além de serem sempre prestativos em ajudar nos experimentos e muito ajudaram com seu carinho e amizade. Um agradecimento ao Gutierre Neves que está comigo deste o início desta caminhada, nosso IC mais antigo no laboratório e que merece um agradecimento muito especial. E ao Ricardo Bertinato que me acompanhou no último ano, mas cumpriu um papel de grande importância com uma dedicação e interesse admirável, muito obrigada por tudo. Além disso, agradeço ao Ismael por sempre ter um obro amigo e sempre pronto a ajudar no trabalho com muito empenho. E pela amizade e carinho do Felipe Fortes.

A professora Célia Carlini, eu agradeço pelos grandes ensinamentos e conversas que me fizeram muito bem nesta caminhada. Ao seu grupo, com quem construí uma grande amizade, agradeço a Michele Domingues minha grande amiga de sempre e companheira de toda essa caminhada. Ângela Piovesan, Karine Kappaun, Natalia Callai, Carlos Gabriel, Kiyu Higuchi, Tiago Carrazoni, e aos demais alunos do Laneurotox que sempre me acolheram em seu grupo de amigas com muito carinho.

Ao professor Ivan Izquierdo e todo o grupo do centro de memória em especial Cristiane Furini e Jociane Myskiw e os demais alunos sempre dispostos a auxiliar das tarefas dos testes de memória realizados em seu laboratório.

Ao laboratório de biologia molecular, agradeço em especial a professora Denise Cantarelli pelo apoio e ensinamentos e a todos os seus alunos em especial Ricardo Zalevski, que sempre ajudou muito quando precisei.

A professora Rita Mattiello, que desde o mestrado me trouxe muitos ensinamentos com muito carinho e firmeza. A Carla Rothmann, mais que a secretária da pós-graduação, foi amiga, profissional e me apoiou tantas vezes. Agradeço a todos os professores que ajudaram na minha formação.

A toda a equipe Cembe, eu agradeço pelo empenho em sempre manter tudo em ordem e fazer todo o possível para ajudar nos momentos de transição que ocorreram. Em especial eu agradeço Priscila, Regina, Douglas e Jaqueline que não pouparam esforços em ajudar.

Agora um agradecimento para pessoas da minha família, e amigos próximos, não tenho como aqui citar todos, porém agradeço a cada um que fez parte da minha formação pessoal e acadêmica, compreendendo os momentos em que eu estive ausente e pelo carinho, pelas palavras de consolo e motivação. Muito obrigada a cada um de vocês! No entanto preciso citar minha mãe Maria Elena por ensinar sua força, pelo meu pai Cicero que hoje nos observa de um lugar mais distante, mas sua energia continua em nós. Aos meus irmãos Daiane, Junior e Denise por suas amizades e parcerias de sempre, com vocês aprendo a ser uma pessoa melhor todos os dias. Ao Diego, que chamar só de marido ficaria vazio frente a toda a importância que ele sempre teve na minha vida desde o colégio, muito obrigada pela paciência, companheirismo e compreensão de sempre. Aos amigos mais próximos Thais, Letícia e Francine e a tantos outros que não tenho como citar aqui. A vera, pelo apoio imensurável em toda a minha vida, a minha vó Geni que com sua humildade sempre se mostrou interessada em entender o meu trabalho, aos meus tios e primos. A Mariana e Josué meus cunhados e amigos que a vida me deu. Agradeço a todos pelo apoio!

## RESUMO

A epilepsia, afeta mais de 65 milhões de pessoas em todo o mundo. Recentemente tem sido demonstrado que as células mononucleares da medula óssea (CMMO) exercem efeito anti-inflamatório no sistema nervoso central e periférico em estudos com modelos experimentais de epilepsia. Como o baço é um órgão central da imunidade celular e humoral e influencia direta ou indiretamente o sistema nervoso central. No primeiro capítulo investigou-se em animais esplenectomizados, submetidos ao protocolo de pilocarpina e tratados com células mononucleares de medula óssea (CMMO) a biodistribuição das células transplantadas, avaliou-se a expressão de fatores inflamatórios e ainda a memória espacial nos diferentes grupos. Para atender os objetivos, foi utilizado o protocolo de pilocarpina (320mg/kg) para a indução de *status epilepticus* (SE) em ratos Wistar machos esplenectomizados sete dias antes do SE. As CMMO foram extraídas da medula óssea de ossos longos de camundongos C57Bl/6 transgênicos EGFP<sup>+</sup> e a separação foi realizada por gradiente de Ficoll. O transplante de CMMO (100 µL contendo 1x10<sup>7</sup> células EGFP<sup>+</sup>) foi realizado pela veia da cauda uma hora após o protocolo de pilocarpina nos animais que entraram em SE. Nos tempos de 12 e 24 horas após o transplante os ratos foram eutanasiados para a obtenção de amostras (cérebro, pulmão, fígado, rins e baço). Tanto a biodistribuição das células EGFP<sup>+</sup> quanto a expressão dos fatores inflamatórios (Interleucina -1β, TNF-α, AIF-1 e Interleucina-10) foram avaliados com o uso do qRT-PCR. A memória espacial dos animais foi avaliada através do labirinto aquático de Morris (LAM) dez dias após o SE. O resultado deste estudo mostrou que o as células injetadas pela veia da cauda foram encontradas no baço, fígado e rim de animais tratados com o baço e no fígado e rim de animais tratados sem o baço. Vimos ainda que tratamento com as CMMO foi capaz de diminuir as citocinas pró-inflamatórias no tecido cerebral e no baço dos animais submetidos ao SE e também a esplenectomia apresentou um papel anti-inflamatório semelhante ao das CMMO na expressão de citocinas cerebrais nas primeiras 12 horas. No entanto para a terapia com CMMO a esplenectomia nos animais com SE, prejudicou a eficácia do tratamento perante a resposta inflamatória e no teste do LAM, onde os animais tratados e esplenectomizados com SE não desempenharam bem a tarefa proposta no teste. O que reflete em falha na capacidade de aprendizagem e consolidação da memória espacial bem como é vista em ratos com SE sem o tratamento. A partir destes dados, no segundo capítulo, nos propomos a investigar qual o papel do baço no desenvolvimento da epilepsia. O objetivo foi investigar a importância do baço na epileptogênese avaliando a frequência de crises, a memória, o

comportamento depressivo e a expressão de fatores inflamatórios no tecido cerebral em dois modelos de epilepsia do lobo temporal (pilocarpina e ácido caínico (KA)). O projeto contou com ratos Wistar machos jovens que foram esplenectomizados sete dias antes dos protocolos de SE (pilocarpina (100mg/kg a cada 30min.) e ácido caínico (KA) (5mg/kg a cada hora). Durante os protocolos de SE, foram avaliadas a latência para a primeira crise, presença de SE, número de crises e mortalidade durante o SE. Na fase crônica da doença (50 dias após o SE) os ratos foram filmados por sete dias (24h/dia). O paradigma do reconhecimento de objetos (RO) foi realizado na semana seguinte ao vídeo monitoramento para testar memória de curta duração. E o teste do nado forçado foi realizado na semana após o RO. A coleta do tecido cerebral para a análise de expressão dos fatores inflamatórios a partir de qRT-PCR foi efetuada após a finalização de todos os testes. Sendo assim, os resultados do nosso segundo estudo revelou que a esplenectomia reduz a latência para primeira crise neste protocolo de pilocarpina e não influenciou na porcentagem de animais com SE, no número de crises e mortalidade durante o SE. Porém no protocolo de KA a esplenectomia aumentou a latência de crises, reduziu a porcentagem de animais que entraram em SE, diminuiu o número de crises e a porcentagem de animais com mortalidade durante o SE. Na fase crônica a frequência de crises não foi alterada pela esplenectomia nos animais dos grupos com pilocarpina e KA. E a duração das crises também não teve diferenciação pela esplenectomia nos dois modelos. A memória de reconhecimento de objetos foi prejudicada nos ratos epiléticos dos dois modelos, entretanto nos ratos epiléticos e esplenectomizados os ratos apresentaram melhor desempenho no teste em ambos os modelos. Todos os ratos epiléticos apresentaram comportamento depressivo perante os resultados do nado forçado e a esplenectomia não mostrou influencia no teste do nado forçado. A expressão de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em tecido cerebral nos ratos submetidos ao protocolo de pilocarpina foi mais alta em relação aos animais do protocolo de KA e não houve diferença entre os grupos com baço e sem baço. A expressão de AIF-1 foi negativa no tecido cerebral dos ratos de todos os grupos deste estudo. E a expressão em tecido cerebral de IL-10 apresentou um aumento nos ratos epiléticos esplenectomizados nos dois modelos experimentais. Com base nos resultados do nosso estudo foi possível reconhecer que o baço apresenta envolvimento tanto na terapia celular na fase aguda do SE, quanto no processo de epileptogênese nos dois modelos de epilepsia.

Palavras chave: Baço, cérebro, epilepsia, inflamação, memória

## ABSTRACT

In epilepsy, the most common serious neurological disorder, affects more than 65 million people worldwide. Several investigations in both humans and animals have shown the effectiveness of bone marrow mononuclear cells (BMMC) as a therapy. The role of spleen is to regulate the immune system, as it is the central organ of cellular and humoral immunity and direct or indirectly influences the central nervous system. At the first chapter the objective of this work was to investigate in splenectomized animals, that had undergone the pilocarpine protocol and treated with Bone Marrow Mononuclear Cells (BMMC), the biodistribution of the transplanted cells, to evaluate inflammatory factors expression and spacial memory along the different groups. In order to achieve these objectives, the pilocarpine protocol (320 mg/kg) was used to induce *status epilepticus* (SE) in male wistar rats that were splenectomized seven days prior to SE. The BMMC were extracted from the Bone Marrow of long bones of C57B1/6 EGFP<sup>+</sup> transgenic mice and the separations accomplished through Ficoll gradient. BMMC transplant was performed by injecting a 100  $\mu$ L suspensions containing  $1 \times 10^7$  EGFP<sup>+</sup> cells at the tail vein of animals that presented SE one hour after the pilocarpine protocol. 12 and 24 hours after the cell transplant animals were euthanized for brain, lung, liver, kidneys and spleen sampling. Both EGFP<sup>+</sup> cells biodistribution and inflammatory factors expression (Interleukin 1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , AIF-1 and Interleukin 10) were assessed through qRT-PCR. Spacial memory was assessed through Morris Water Maze (MWM) ten days after SE. The result of this first study demonstrated that cells injected at the tail vein were found in the spleen. We further found that BMMC treatment was capable of diminishing pro-inflammatory cytokines at brain and spleen tissues of animals submitted to SE. Also splenectomy played an anti-inflammatory role similar to the BMMC transplant at brain cytokines expression throughout the first 12 hours. However splenectomy seemed to have impaired BMMC therapy on animals submitted to SE. Splenectomized animals developed more inflammation and did worse on MWM test. These findings suggest failure on learning and spacial memory consolidation abilities as seen on SE animals without BMMC treatment. From these data we proposed to investigate the spleen's role on epilepsy development. The objective of the second study was to investigate the importance of the spleen in epileptogenesis evaluating crisis frequency, memory, depressive behavior and brain tissue inflammatory factors expression in two temporal lobe epilepsy models (pilocarpine and kainic acid (KA)). For this project male Wistar rats were splenectomized seven days before pilocarpine (100 mg/kg) and KA (5 mg/kg per hour) SE protocols. During SE

protocols the first crisis latency, SE presence and number of deaths were evaluated. At the chronic phase (50 days after SE), rats were filmed 24 h/day during seven days. The object recognition paradigm (OR) was performed one week next to video monitoring to evaluate short term memory. The forced swimming test was carried out one week after OR. Brain tissues were sampled for inflammatory factor expression analysis assays from qRT-PCR after all tests were finished. Therefore, data from our second study revealed that splenectomy reduced the latency to the first seizure in this pilocarpine protocol and did not influence at the percentage of SE animals, number of seizures and mortality during SE. However, in KA protocol splenectomy seemed to increase both seizure latency and the mortality percentage during SE. At chronic phase, seizure frequency was not modified by splenectomy in both pilocarpine and KA groups. Seizure duration remained unchanged by splenectomy in both models. Object recognition memory was impaired on SE animals from both protocols, though splenectomized animals showed better performance at this memory task in both protocols. On forced swimming test, epileptic animals displayed depressive-like behavior and splenectomy did not influence forced swimming results. IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  expression levels on brain tissue from SE rats that underwent the pilocarpine protocol was higher when compared to those animals from KA protocol and no difference was observed among groups with and without spleen. AIF-1 expression on brain tissue was negative on rats from all the studied groups. And the brain tissue expression of IL-10 was higher on epileptic splenectomized animals from both SE models. Based on the results of our study it was possible to understand that the spleen plays a role not only on cellular therapy and acute SE phase but also on the epileptogenic process on both epilepsy models.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIF-1	Fator inflamatório de aloenxerto-1
AVC	Acidente vascular cerebral
BLPA	Bainha linfóide periarteriolar
CA	Cornos de Amon
CCUH	Célula de cordão umbilical humano
CERs	Crises espontâneas e recorrentes
CMMO	Células mononucleares de medula óssea
CTH	Células tronco hematopoiéticas
CTM	Células tronco mesenquimais
DAEs	Drogas antiepilépticas
DAMP	Padrão molecular associado ao dano (do inglês <i>Damage associated molecular patterns</i> )
EEG	Eletroencefalograma
EGFP <sup>+</sup>	Proteína verde fluorescente (do inglês <i>Enhanced green fluorescent protein</i> )
ELT	Epilepsia do lobo temporal
ENV	Estimulação do nervo vago
GABA	Ácido Gama Aminobutírico (do inglês <i>Gama aminobutyric acid</i> )
HMGB1	Proteína de alta mobilidade do grupo-1 (do inglês <i>High mobility group box-1</i> )
HPA	Eixo hipotálamo hipófise
ILAE	International League Against Epilepsy
IL-10	Interleucina-10
IL-1 $\beta$	Interleucina 1- $\beta$
IL-6	Interleucina-6
KA	Ácido Caínico (do inglês <i>Kaïníc Ácid</i> )
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1 (do inglês <i>Monocyte Chemoattractant protein-1</i> )
NLR	Receptores do tipo Nod (do inglês <i>Nod-like- Receptors</i> )

NLRP3	Receptores do tipo Nod com PYD 3 (do inglês <i>Nod-like Receptors-PYD 3</i> )
PBS	Tampão Fosfato Salina
PFA	Paraformolaldeído
PILO	Pilocarpina
PRR	Receptores de reconhecimento padrão (do inglês <i>Pattern Recognition Receptor</i> )
RT-q-PCR	Transcriptase reversa- quantitativa da Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>reverse transcription-quantitative- polymerase chain reation</i> )
SE	Estado do mal epiléptico (do inglês <i>Status epilepticus</i> )
SNC	Sistema nervoso central
TLR	Receptores do tipo Toll (do inglês <i>Toll-like Receptors</i> )
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose tumoral- $\alpha$ (do inglês <i>Tumoral necrosis fator-<math>\alpha</math></i> )
ZM	Zona marginal (do baço)

## **Lista de figuras do referencial teórico**

- Figura 1: Imagem com a estrutura do hipocampo (página 20).
- Figura 2: Esquema mostrando o sistema imune esplênico (página 28).
- Figura 3: Hipocampos corados por tionina representando a morte neuronal no modelo de pilocarpina (página 32).
- Figura 4: Hipocampos de camundongos após o KA corados com Cressil Violeta (página 34).

## **Lista de figuras do Capítulo I:**

- Figura 1: Esquema descritivo do experimento de cultura de macrófagos (página 43).
- Figura 2: Esquema contendo o delineamento experimental do projeto agudo (página 46).
- Figura 3: Dados coletados durante o SE (página 51).
- Figura 4: Expressão relativa dos genes por qRT-PCR no cérebro de ratos Wistar (página 54).
- Figura 5: Gráfico em radar das expressões gênicas do tecido cerebral (página 57).
- Figura 6: Expressão relativa dos genes por qRT-PCR no baço de ratos Wistar (página 59).
- Figura 7: Gráfico em radar das expressões gênicas do tecido esplênico (página 61).
- Figura 8: Níveis de citocinas no sobrenadante de cultura de macrófagos esplênicos (página 62).
- Figura 9: Teste do Labirinto aquático de Morris (página 66).

## **Lista de figuras do Capítulo II:**

- Figura 1: Delineamento experimental do projeto crônico (página 81).
- Figura 2: Dados sobre o SE foram coletados durante a aplicação dos protocolos de pilocarpina e ácido caínico do projeto (página 87).
- Figura 3: Monitoramento de crises espontâneas e recorrentes (página 88).
- Figura 4: Paradigma de reconhecimento de objetos (página 89).
- Figura 5: Teste de nado forçado (página 90).
- Figura 6: Expressão gênica de fatores inflamatórios qRT-PCR no hipocampo de ratos (página 91).

### **Lista de figuras do Capítulo III:**

- Figura 1: esquema demonstrando a nossa hipótese sobre o efeito da pilocarpina relacionado ao eixo baço-cérebro (página 98).
- Figura 2: Esquema mostrando a nossa hipótese a respeito do efeito da pilocarpina no cérebro de animais esplenectomizados (página 99).
- Figura 3: Esquema demonstrando a nossa hipótese sobre efeito do ácido caínico em relação ao eixo baço-cérebro (página 100).
- Figura 4: Esquema que mostra a hipótese formulada sobre o efeito do ácido caínico no cérebro de animais esplenectomizados (página 100).

### **Lista de tabelas do Referencial teórico:**

- Tabela 1: Escala de Racine (página 34).

### **Lista de tabelas do capítulo I:**

- Tabela 1: tabela de Primers usados no qRT-PCR (página 42).
- Tabela 2: Quadro com descrição dos grupos experimentais (página 49).
- Tabela 3: Resultado do teste de biodistribuição de CMMO (página 52).

### **Lista de tabelas do capítulo II:**

- Tabela 1: Tabela com os grupos experimentais do projeto crônico (página 84).

## APRESENTAÇÃO

**Após a introdução e referencial teórico, o trabalho foi dividido em três capítulos.**

### **Capítulo I** – Projeto 15/00480- Fase aguda

Avaliação da biodistribuição de células mononucleares de medula óssea em ratos esplenectomizados e submetidos ao *status epilepticus* induzido por pilocarpina.

### **Capítulo II** - Projeto 7839 (2017-0012) - Fase crônica

Avaliar a importância do baço na epileptogênese e na resposta inflamatória nos modelos epilepsia de pilocarpina e de ácido caínico em ratos wistar.

### **Capítulo III**- Conclusão geral do trabalho

\*Cada capítulo irá apresentar: hipótese, objetivos, metodologias, resultados e discussão.

## Índice

1-Introdução.....	13
2 Referencial teórico.....	15
2.1. Aspectos históricos: Epilepsia.....	15
2.2 A epilepsia nos dias de hoje.....	17
2.3 Epilepsia do lobo temporal (ELT).....	18
2.4 Epilepsia e neuroinflamação.....	20
2.5 Tratamento.....	22
2.6 Terapia celular.....	24
3 O baço.....	25
3.1 Relação do baço com doenças do SNC.....	28
4 Modelos Experimentais.....	30
4.1 Pilocarpina (PILO).....	31
4.2 Ácido caínico (KA).....	32
5 Classificação comportamental da intensidade das crises.....	33
<b>Capítulo I</b> .....	<b>35</b>
1 Hipótese.....	36
2 Objetivo.....	37
2.1 Objetivos específicos.....	37
3 Questões éticas.....	38
4 Material e métodos.....	38
4.1 Animais.....	38
4.2 Esplenectomia.....	39
4.3 Protocolo de pilocarpina.....	39
4.4 Preparação de células.....	40
4.5 Terapia celular.....	40
4.6 Análise de Biodistribuição.....	40

4.7 Curva de Contaminação com DNA .....	41
4.8 Extração de RNA e RT-q-PCR.....	41
4.9 Obtenção e cultura de células do baço.....	42
4.10 Análise de citocinas pró e anti-inflamatórias do sobrenadante da cultura celular	43
4.11 Labirinto aquático de Morris .....	44
5 Análise estatística: .....	44
6. Delineamento experimental .....	45
7. Grupos experimentais .....	47
7.1 Naive.....	47
7.2 Sham .....	47
7.3 Esplenec .....	47
7.4 CMMO.....	48
7.5 Esplenec/CMMO .....	48
7.6 Pilo.....	48
7.7 Pilo/esplenec .....	48
7.8 Pilo/CMMO .....	49
7.9 Pilo/Esplenec/CMMO.....	49
8. Resultados.....	50
8.1 A influencia da esplenectomia nos parâmetros de crise durante o protocolo de pilocarpina. ....	50
<b>8.2 Biodistribuição das CMMO .....</b>	<b>52</b>
8.3 Fatores inflamatórios expressos no cérebro.....	52
8.4 Fatores inflamatórios expressos no baço .....	58
8.5 Cultura de macrófagos .....	61
8.6 A memória espacial em ratos.....	65
9 Discussão .....	67
Capítulo II.....	73

1 Hipótese .....	74
2 Objetivo .....	75
2.1 Objetivos específicos .....	75
Nos ratos esplenectomizados e submetidos ao SE por pilocarpina ou ácido caínico:..	75
3 Questões éticas.....	76
4 Material e métodos .....	76
4.1 Animais.....	76
4.2 Esplenectomia.....	77
4.3 Protocolo de pilocarpina .....	77
4.4 Protocolo de Ácido Caínico.....	78
4.5 Vídeo monitoramento .....	78
4.6 Tarefa de reconhecimento de objetos .....	78
4.7 Nado Forçado.....	79
4.8 Extração de RNA e RT-q-PCR.....	80
5 Delineamento experimental: .....	80
6 Grupos experimentais .....	82
6.1 Grupo Naive.....	82
6.2 Grupo Sham .....	82
6.3 Grupo Esplenec.....	82
6.4 Grupo Pilo.....	82
6.5 Grupo Pilo/Esplenec .....	83
6.6 Grupo KA .....	83
6.7 Grupo KA/Esplenec.....	83
7 Análise estatística .....	85
8 Resultados.....	86
8.1 Parâmetros analisados durante o SE.....	86
8.2 Vídeo monitoramento .....	87

8.3 Reconhecimento de objetos .....	88
8.4 Nado forçado .....	89
8.5 Expressão de fatores inflamatórios .....	90
9 Discussão .....	92
Capítulo III: .....	96
1. Considerações finais .....	97
2. Conclusão .....	102
Referências: .....	104
Artigo original .....	115
Anexos.....	142

## 1-Introdução

A epilepsia é altamente prevalente na população em geral, afeta pessoas de todas as classes sociais, todas as idades interferindo significativamente de maneira negativa na qualidade de vida das pessoas com esta síndrome. Em países desenvolvidos a prevalência é de 5-8 pessoas a cada 1000 e em países em desenvolvimento a prevalência aumenta, sendo 10 casos a cada 1000 pessoas (Moshé, Perucca et al. 2015). As diferenças podem ser justificadas devido ao aumento de fatores de risco para epilepsia, como infecções, e qualidade nos atendimentos de pré-natal e pós-natal (Moshé, Perucca et al. 2015). Existem mais de 40 tipos de epilepsia e a classificação da doença é realizada com base na avaliação do perfil de crises, o local de foco epileptogênico e responsividade do paciente aos fármacos.

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é um dos tipos de epilepsia existentes e o paciente desenvolve crises no sistema límbico temporal comprometendo a memória e cognição, outro agravante da ELT é o difícil controle das crises através dos fármacos disponíveis (Hoppe, Elger et al. 2007). Na ELT o dano neuronal pode ser a causa da epilepsia (fase aguda) (Angeleri, Majkowski et al. 1999, Pagni and Zenga 2006), seguido da epileptogênese, uma série de eventos que transformam o cérebro, tornando-o epiléptico (fase latente) (Engel, Babb et al. 1989). Após o período de epileptogênese o cérebro passa a apresentar crises espontâneas e recorrentes (CERs) fase (fase crônica) (Cavalheiro, Leite et al. 1991).

Uma emergência médica denominada com o termo “*Status epilépticos*” (SE), é um período no qual ocorrem uma série de crises convulsivas ou uma crise suficientemente prolongada em um curto espaço de tempo, levando a um estado epiléptico (Gastaut 1973).

A neuroinflamação na epilepsia desempenha um papel importante no desenvolvimento e manutenção das crises. Existem ainda questionamentos sobre o início da crise gerar a inflamação, ou a inflamação gerar a primeira crise. Sabe-se que após o SE a expressão de citocinas e fatores inflamatórias aumentam no tecido cerebral. E na fase crônica a presença de elementos inflamatórios ainda é encontrada em tecido cerebral (Vezzani, Balosso et al. 2012).

No primeiro capítulo, este estudo dá continuidade a outras investigações com células mononucleares da medula óssea (CMMO) na fase aguda, e no segundo capítulo, aborda investigações sobre a fase crônica da epilepsia experimental. Os dados apresentados aqui estão inseridos na linha de pesquisa sobre os efeitos das CMMO na epilepsia do nosso laboratório de neurociências da PUCRS. A partir do estudo inicial (Ferro 2008), vários experimentos vêm se

desenvolvendo no nosso laboratório e de forma significativa vamos construindo uma melhor interpretação e compreensão sobre esta terapia no modelo de epilepsia (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). Nos estudos desenvolvidos foi observado, por imunofluorescência que as células injetadas pela veia caudal, chegavam em pequena quantidade ao cérebro, porém migravam e permaneciam no baço. No primeiro capítulo deste trabalho foi investigado se a migração de células para o baço apresentava alguma relevância para o tratamento de CMMO em ratos após o SE desenvolvido pelo protocolo de pilocarpina (fase aguda). No segundo capítulo desta pesquisa foi investigado o efeito da esplenectomia em dois modelos experimentais de epilepsia, ácido cáínico e pilocarpina (fase crônica).

A pilocarpina é um agonista colinérgico que atua nos receptores muscarínicos (Turski, Cavalheiro et al. 1983, Cavalheiro, Leite et al. 1991). Enquanto que o ácido cáínico possui um mecanismo de ação envolvendo os receptores de cainato no hipocampo (Avoli, D'Antuono et al. 2002, Lévesque and Avoli 2013). O baço apresenta inervação simpática eferente (Bonaz, Picq et al. 2013), e possui receptores colinérgicos nos neurônios pós-ganglionares simpáticos do gânglio celíaco que seguem pelo nervo esplênico, a ativação do nervo esplênico aumenta os níveis de acetilcolina no baço (Pavlov, Parrish et al. 2009, Vida, Peña et al. 2011). Devido às relações do baço, com o sistema colinérgico optamos por estudar o modelo de ácido cáínico e pilocarpina para investigar se a esplenectomia tem influência na epileptogênese.

## 2 Referencial teórico

### 2.1. Aspectos históricos: Epilepsia

A epilepsia é uma síndrome neurológica que afeta, hoje, cerca de 65 milhões de pessoas no mundo (Moshé, Perucca et al. 2015). A epilepsia tem sido associada, ao longo da história da humanidade, as causas místicas, que oscilam desde as sagradas até as demoníacas. O conceito grego da epilepsia referia-se sobre a natureza sobrenatural das crises, nesta época acreditava-se que a epilepsia era uma “doença sagrada”. Por volta de 400 a.C. com o surgimento das escolas médicas, Hipócrates afirmou que em pacientes com epilepsia a causa estava localizada no cérebro (Masia and Devinsky 2000).

As descrições mais antigas sobre a epilepsia são de origem babilônica onde toda a atividade médica e médicos estavam sob a proteção direta dos deuses e a doença era a punição divina (García-Albea 1999). As primeiras descrições conhecidas sobre epilepsia correspondem a textos de escritos cuneiformes compilados entre os anos 1067 e 1046 a.C. que estão incluídos no livro chamado Sakikku, considerado como o livro de todas as doenças. Neste livro, a epilepsia foi chamada *antashube* ou *antasubba*, um termo cuja tradução significa "doença caindo" (Temkin 1971, Eadie and Bladin 2001). Avicena um grande médico persa na Idade de Ouro do Islã (início da época medieval), contribuiu em vários campos da medicina, incluindo a neurologia (Pearce 1998, Masia and Devinsky 2000). A sua obra mais famosa foi o “Livro da Cura”, que é uma enciclopédia filosófica e científica, e o “Cânone da Medicina”, nos seus relatos ele descreve que os pacientes epiléticos apresentavam crises e também apresentavam sintomas periféricos como desconfortos gástricos e febre. Ele acreditava em uma relação entre o cérebro e outros órgãos do corpo, como estômago, baço e fígado (Dadmehr, Amini-Behbahani et al. 2018).

Os antigos gregos pensavam que apenas um Deus poderia jogar as pessoas no chão, privá-las de seus sentidos, produzir convulsões e trazê-los de volta para a vida. E assim, a epilepsia passou a ser chamada de a "Doença sagrada". Em torno de 400 a. C. para Hipócrates (460- 357 a. C.) a epilepsia era um desequilíbrio dos humores e era considerada hereditária, porque estava no cérebro, um cérebro transbordando com um catarro: "quando a fleuma passa por dentro dos vasos sanguíneos do corpo, isso faz com que ocorra um ataque (Temkin 1971). E foi ele que desmistificou a doença como sagrado: “Isto não é nem mais divino nem mais sagrado do que qualquer outra doença” (Riggs and Riggs 2005).

Posteriormente, durante a idade média os avanços dos aspectos clínicos e teóricos sobre a epilepsia permaneceram estáticos. Este foi um tempo de feiticeiros, nesta época as mulheres com epilepsia foram rotuladas como bruxas, e muitas foram trancadas, queimadas ou enterradas vivas (Masia and Devinsky 2000).

Na idade Moderna, grandes avanços ocorreram sobre a etiologia, classificações e tratamentos. O médico belga Andréas Vesalius (1514-1564), considerado o pai da anatomia, foi quem reconheceu a epilepsia focal. Após esse período foram surgindo hipóteses sobre ser conceituado que o cérebro é principal órgão envolvido nas crises epiléticas, sobre os mecanismos, e possíveis causas que pudessem levar as crises epiléticas (da Mota Gomes 2006). O Inglês Thomas Willis, considerado o pai da neurologia, em suas publicações (1664 e 1672), centra esta doença no cérebro, e afirma que as crises epiléticas são o resultado de uma violenta explosão química (Pestronk, Cornblath et al. 1988). Samuel Tissot, 1770, definiu a epilepsia como uma doença que interfere com os sentidos e é acompanhada por convulsões com vários graus de gravidade que afetam muitas partes do corpo (Karbowski 1997).

Os estudos sobre epilepsia foram possíveis graças aos trabalhos de John Hughlings-Jackson (1834-1912) comumente apelidado de “Pai da epilepsia”, foi um neurofilósofo e pensador que devido ao seu trabalho revolucionou as teorias da fisiopatologia e da epilepsia (Eadie 2007) numa época em que ainda se desconhecia a base eletroquímica da transmissão nervosa (Chaudhary, Rodionov et al. 2012). Examinando em necropsia as regiões do sistema nervoso lesadas em muitos tipos de epilepsia focal, Jackson estabeleceu as correlações entre as regiões lesadas e os tipos de epilepsia. Ele acreditava que a convulsão era o resultado característico de uma descarga excessiva e desordenada de certas regiões do encéfalo. Jackson definiu a epilepsia como “uma descarga súbita, excessiva e rápida da substância cinzenta” (Franky 2004). Os fundamentos da Escola de Jackson foi o impulso para Victor Horsley dar início as primeiras cirurgias de epilepsia por volta dos anos 1880 (Feindel 1995, Wichert-Ana, Carlotti Júnior et al. 2003). Em 1825, Bouchet e Cazauvieih investigaram uma forma de epilepsia localizada no lobo temporal, que ficou conhecida como esclerose mesial hipocampal (Eadie and Bladin 2001). Em 1880 Sommer constatou que no hipocampo ocorria morte ou atrofia de neurônios de CA1 e que era a causa das crises convulsivas; por isso, essa região hipocampal ficou conhecida como setor de Sommer. Assim como, a astrogliose está associada a esses fenômenos. De fato, essa gliose reacionária confere um aspecto duro e firme do hipocampo, daí o nome esclerose hipocampal atribuído por Bouchet e Cazauvieih (Steinhäuser and Seifert 2002). Em 1929 Hans Berger e Carmichel registraram correntes elétricas do encéfalo humano, o que eles chamaram de eletroencefalograma. Além disso, eles descreveram

as ondas lentas 3 Hz como crises de ausência, conseguiram gravar crises tônico-clônicas generalizadas, confirmando os conceitos de Jackson ao registrarem a atividade elétrica no córtex cerebral (Tyler 1984). Todos estes e muitos outros estudos que não foram citados aqui contribuíram para uma melhor compreensão das patologias subjacentes ao sistema nervoso e abriram caminho para o que hoje se conhece sobre a epilepsia.

## 2.2 A epilepsia nos dias de hoje.

A epilepsia, a partir da nova classificação internacional da epilepsia e síndromes epiléticas é considerada uma doença e não mais uma síndrome (International League Against Epilepsy- ILAE) (Falco-Walter, Scheffer et al. 2018). A epilepsia compreende manifestações clínicas apresentadas como crises espontâneas e recorrentes (CERs) (Bear, Connors et al. 2008). As CERs 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 tóxico-metabólica ou febril (de Graaf and Kayed 1973, Rogawski and Porter 1990, McNamara 1994). As crises, nos pacientes são acompanhadas por padrões de eletroencefalograma (EEG) de grande amplitude e frequência e podem refletir em um desequilíbrio da excitação e da inibição sináptica do encéfalo, ou interconexões excitatórias excessivamente intensas ou densas (Bear, Connors et al. 2008).

O *Status Epiléticos* (SE) é caracterizado por crises epiléticas prolongadas e repetidas em intervalos curtos e é um caso de emergência neurológica grave em pacientes com epilepsia (de Graaf and Kayed 1973, Sander and Hart 1999, Kirmani, FAES et al. 2018). A etiologia da doença abrange muitos fatores incluindo tumores cerebrais, trauma encefálico, disfunção metabólica, infecções no SNC, doença vascular, convulsões febris ou por fatores desconhecidos (Engel, Babb et al. 1989, Sander and Hart 1999). Sendo basicamente envolvidos três fatores causais: predisposição individual, presença de lesão epileptogênica cerebral e alterações bioquímicas ou elétricas cerebrais (Sander and Hart 1999).

A epilepsia é caracterizada pelo local do foco epilético no cérebro e pelo padrão de crises apresentadas pelo paciente. Aspectos comportamentais de uma crise dependem dos neurônios envolvidos e dos padrões de atividade destes. Crises cerebrais podem ser generalizadas, envolvendo todo o córtex e ambos os hemisférios ou parciais envolvendo somente uma área circunscrita do córtex (da Silva and Cavalheiro 2004, Bear, Connors et al. 2008). Crises parciais são anatomicamente bem marcadas, se iniciarem em uma pequena região

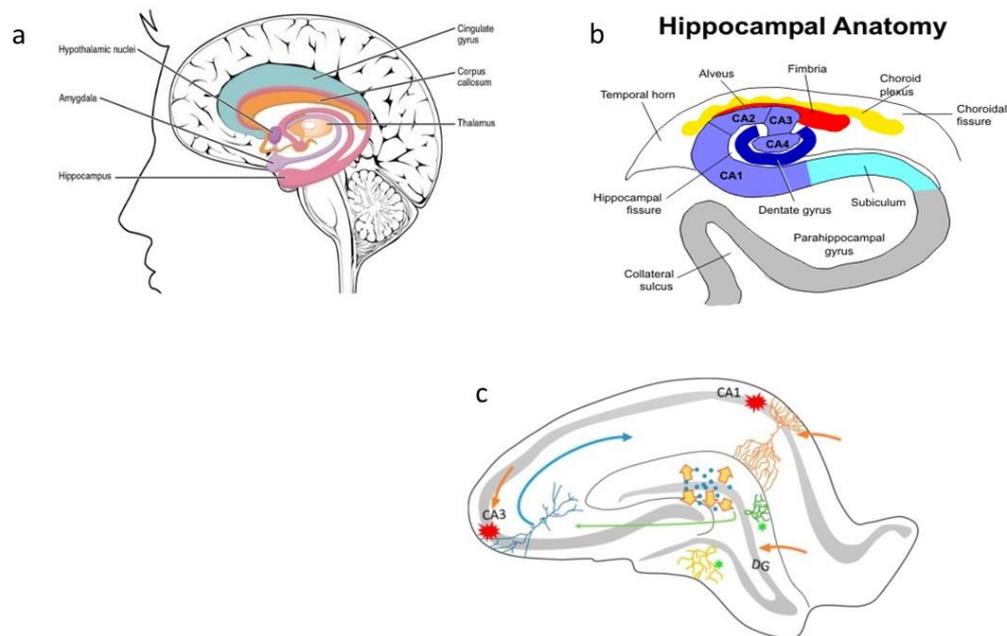
do córtex motor podem causar movimentos clônicos de parte de um membro (Fisher, Boas et al. 2005). Se iniciarem em uma área sensorial, podem dar uma sensação anormal ou aura, podendo ser auras bem definidas como o *dejavú* (sensação de que algo já aconteceu) ou alucinações podendo envolver o córtex dos lobos temporais, incluindo o hipocampo e a amígdala, prejudicando a memória, o pensamento, e a consciência, assim como odores singulares ou luzes cintilantes que podem ocorrer. As crises parciais podem espalhar-se de forma incontável e se tornarem crises generalizadas. Em crises generalizadas a maioria dos neurônios corticais estão envolvidos, levando a perturbação por vários minutos (da Silva and Cavalheiro 2004, Bear, Connors et al. 2008). Durante a crise a consciência é perdida, e os músculos podem ser comandados por padrão de atividade tônica (contração muscular) ou clônica (relaxamento muscular-espasmos rítmicos) ou pelos dois padrões tendo um perfil de crise tônico-clônica (da Silva and Cavalheiro 2004, Bear, Connors et al. 2008). Existem cerca de quarenta tipos descritos de epilepsia, 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 (Falco-Walter, Scheffer et al. 2018). Dentre os diversos tipos de epilepsia o tipo mais comum é a epilepsia do lobo temporal (ELT), que acomete cerca de 70% dos pacientes e que frequentemente representa um distúrbio refratário ao tratamento sendo essa taxa de cerca de 30% (Boison and Steinhäuser 2018).

### **2.3 Epilepsia do lobo temporal (ELT)**

O lobo temporal é uma região do cérebro envolvida em funções cognitivas, linguagem e memória. Nas estruturas profundas deste lobo, encontramos a amígdala e o hipocampo. As primeiras descobertas sobre a função hipocampal surgiram através da observação dos pacientes. Alois Alzheimer (1864-1915), um neuroanatomista alemão, que observou no hipocampo mudanças morfológicas especificamente associadas a uma forma de demência amnésica (Squire 2004). Em 1950, a importância do hipocampo na memória foi demonstrada por Scoville e Milner ao estudar o paciente H.M., que desenvolveu amnésia anterógrada global após remoção cirúrgica bilateral dos lobos temporais inferiores. Desde então, centenas de publicações contribuíram para o conhecimento do papel do hipocampo na construção da memória de eventos complexos, ou memória episódica (Squire 2004). Na maioria dos casos o desenvolvimento da ELT clássica é idêntica em aproximadamente 80% dos pacientes e o foco

epiléptico está associado a alterações hipocampais (Mathern, Adelson et al. 2002, Pitkänen and Sutula 2002). Tem sido reportado que pacientes com ELT apresentam prejuízo da memória, alterações comportamentais como depressão, ansiedade e psicoses e déficits cognitivos em decorrência do dano hipocampal (Hoppe, Elger et al. 2007). Do ponto de vista anatomopatológico a esclerose hipocampal é caracterizada pela perda neuronal, principalmente nas células do setor de Sommer (CA1) e dos neurônios da região hilar, com gliose, relativa preservação de CA2, subiculum e giro denteado (Babb, Wilson et al. 1987) (Figura 1). Ocorrendo também uma reorganização axonal, dispersão de células granulares, brotamento de fibras musgosas, e neurogênese na camada molecular do giro dentado (Berkovic, Andermann et al. 1991, Gloor and Guberman 1997, Buckmaster and Haney 2012, Lévesque and Avoli 2013). Além disso, lesões do sistema límbico temporal são responsáveis pelos principais sintomas de crises parciais, complexas, recorrentes e com generalizações secundárias (Mathern, Giza et al. 1999, Bartolomei, Khalil et al. 2005, Curia, Longo et al. 2008, Zhong, Ren et al. 2016).

Em pacientes após uma lesão inicial precipitante, (febre, trauma, AVC, infecção, etc.) que leva a ocorrência das primeiras crises, é a primeira fase (fase aguda). Seguido de uma fase silenciosa (cl clinicamente, sem crises), onde ocorrem muitos remodelamentos teciduais: perda neuronal, gliose, reorganização sináptica inflamação, neurogênese, migração neuronal, e outras manifestações anatomopatológicas estes participam da epileptogênese, ou seja, o desenvolvimento progressivo de hiperexcitabilidade (epileptogênese). E uma terceira fase da ELT onde surgem as CERs (fase crônica) (Mathern, Adelson et al. 2002, Curia, Longo et al. 2008).



**Figura 1:** O hipocampo. (a) Representação da localização do hipocampo em cérebro humano e (b) anatomia do hipocampo humano com suas regiões demarcadas. (c) Representação esquemática da organização estrutural do hipocampo de ratos. Sabe-se que o hipocampo é conectado ao córtex entorrinal através de diferentes circuitos anatômicos que foram bem descritos. Particularmente, a via perforante se projeta do GD e do CA3 para o CA1 (setas verdes e azuis). Uma das características deste circuito é a sua direcionalidade entre as diferentes camadas neuronais. O DG, CA3 e as camadas apicais de CA1 (setas laranjas) projetam-se principalmente através das camadas superficiais do córtex entorrinal (II e III). Evidências têm relatado que o hipocampo é altamente vulnerável à perda de células por meio de atividade convulsiva, particularmente nos subcampos CA1 e CA3 (marcas vermelhas). A dispersão de células granulares dentadas (setas amarelas) e brotamento axonal intenso (asteriscos) são comuns no processo de epileptogênese. Essas mudanças estruturais afetam a organização e a função dos circuitos do hipocampo e contribuem para o estabelecimento da ELT (Jarero-Basulto, Gasca-Martínez et al. 2018, Anatomyinfo 2018 ).

## 2.4 Epilepsia e neuroinflamação

A neuroinflamação está presente em diversas doenças do SNC. Uma delas é a epilepsia. Infecção, inflamação e fatores inflamatórios como citocinas podem contribuir para a predisposição e ocorrência de crises relacionadas com o dano cerebral (Aarli 1993, Jankowsky and Patterson 2001, Vezzani and Granata 2005, Ravizza, Boer et al. 2006). Nós e outros pesquisadores demosramos que a administração de drogas convulsivantes em roedores provocam neuroinflamação, envolvendo as células endoteliais, gliais e neurônios (Vezzani and Granata 2005, Oby and Janigro 2006). Neuroinflamação 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 (De Simoni, Perego et al. 2000, Gorter, van Vliet et al. 2006). Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e IL-1R (receptor), 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 (41-47). A IL-1 beta e IL-1R (receptor) apresentam seus níveis aumentados no cérebro após as crises (Ravizza, Boer et al. 2006). Além disso, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 apresentam expressões aumentadas na microglia e nos astrócitos do tecido epiléptico, podendo levar ao recrutamento do sistema imune inato (Vezzani and Granata 2005). Estudos do nosso laboratório, em modelo agudo e crônico da epilepsia experimental demonstraram um aumento de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Costa-Ferro, Souza et al. 2012) no tecido cerebral e no soro desses animais.

Sabe-se também, que as microglias e as células gliais podem ser ativadas e secretarem citocinas inflamatórias no microambiente (Cohen and Schwartz 1999). As microglias ativadas apresentam características como, alterações hipertróficas, expressão aumentada de moléculas de superfície e liberação de substâncias biologicamente ativas e pode desempenhar um papel fundamental na coordenação da resposta inflamatória do SNC, notadamente como sua ativação precede a infiltração de células imunológicas periféricas (Schwab and Bartholdi 1996, Schroeter, Jander et al. 1999). Na epilepsia, as micróglias podem estar envolvidas na expressão de citocinas que auxiliam na geração de crises, na regulação da atividade neuronal, no processo de neurogênese, na aquisição de memória e aprendizado, na plasticidade sináptica e em outros fatores cerebrais importantes (Vezzani, Balosso et al. 2012, Eyo, Murugan et al. 2017). Um dos fatores expressos pela microglia é o fator inflamatório aloenxerto-1, AIF-1. Fator que é um bioativo, marcador de microglia por compartilhar sequências de aminoácidos idênticas com o AIF-1 humano (Kuschel, Deininger et al. 2000). E por ser constitutivamente expressa por células dendríticas (CD) de órgãos linfocitários e macrófagos teciduais (Schluesener, Seid et al. 1998, Chen, Kelemen et al. 2004, Rana and Musto 2018).

Moléculas endógenas próprias do SNC podem se originar durante a neuroinflamação. Estas moléculas podem alertar e atrair células imunes para o local danificado, são padrões moleculares associados a danos (DAMP- Damage-associated molecular patterns). Os DAMPs têm receptores próprios que estão em uma classe de receptores de reconhecimento padrão (PRR). Receptores *Toll-like* (TLR), receptores *Nod-like* (NLR) são exemplos de PRR (Paiva-Oliveira, Silva et al. 2012). Os DAMPs são liberados no espaço extracelular por células mortas ou células doentes no tecido cerebral. Exemplos de DAMPs são ácidos nucleicos, nucleotídeos, proteínas e lipídeos. Entre as proteínas do SNC classificadas como DAMP e que ativam PRR estão a HMGB1 (*High mobility group box-1*) esta proteína está envolvida em uma série de cascatas inflamatórias sendo uma das primeiras a entrar em ação frente a um dano. Uma família de proteínas chamadas NLR também está relacionada ao início da resposta inflamatória em

especial o tipo NLRP3 que está relacionada ao aumento de crises e no cérebro é expresso primeiramente na microglia. Auxilia na formação de inflamassomas, que são complexos multiproteicos essenciais para iniciar uma cascata inflamatória. Existem diversos tipos de inflamassomas e sua ação depende da sua formação proteica. O tipo de inflamassoma gerado a partir de NLRP3 é responsável pela produção de IL-1 $\beta$  e pode regular a formação de HMGB1. Juntas IL-1 $\beta$  e HMGB1 regulam a formação de outros fatores inflamatórios como IL-6 (Somera-Molina, Robin et al. 2007, Van Gassen, De Wit et al. 2008, Paiva-Oliveira, Silva et al. 2012).

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. Assim, a interação entre leucócitos e células endoteliais vasculares modulam as CERs em modelo roedor de ELT (Fabene, Mora et al. 2008).

A relação exata entre os fatores inflamatórios sistêmicos e patologias do SNC não são bem conhecidos tanto do ponto de vista do cérebro quanto do sistema imune (Offner, Subramanian et al. 2006, Riazi, Galic et al. 2010). Sabe-se que interações entre leucócitos e células endoteliais modulam as CERs em ratos submetidos ao modelo de ELT (Fabene, Mora et al. 2008). Foi demonstrado que as células granulares do giro dentado passam por uma grande mudança morfológica na ELT, estas mudanças foram associadas a subpopulação F4/80 (macrófagos derivados de fagócitos mononucleares periféricos). Assim como, Zanotti e colaboradores (2011) demonstraram que a injeção sistêmica e contínua (10 dias) de lipossomas de clodronato em camundongos, induziu uma redução entre 60-85% das células F4/80 no baço (Zattoni, Mura et al. 2011). No entanto, a respectiva contribuição de células imunes periféricas e residentes no cérebro para a epileptogênese é pouco compreendida (Fabene, Mora et al. 2008, Marchi, Johnson et al. 2011).

## 2.5 Tratamento

As drogas antiepilépticas (DAEs) são amplamente utilizadas no tratamento da epilepsia e a história das medicações anticonvulsivantes data do século passado. Em 1857, Locock reconheceu a ação anticonvulsiva do bromo e, em 1912, Hauptmann, a do fenobarbital (Klitgaard 2005). Toman e Taylor em 1945 concluíram que, não era possível desenvolver um antiepiléptico que controlasse todas as formas de crises e que fosse útil para todos os epiléticos.

Dados de pacientes epilepticos sugerem que, embora as drogas antiepilépticas sejam eficazes na supressão de convulsões, elas não alteram o processo epileptogênico subjacente (Temkin 2001).

Aproximadamente 30-40% dos pacientes, as crises ocorrem em diferentes graus de intensidade frente ao tratamento com drogas antiepilépticas. Alguns pacientes têm convulsões debilitantes, qualificando-se como tendo epilepsia "refratária" (Kwan and Brodie 2006). Assim, o tratamento com drogas antiepilépticas pode, na melhor das hipóteses, apenas melhorar a gravidade ou a frequência das crises. Para esses pacientes refratários ao tratamento medicamentoso, a cirurgia para epilepsia é uma opção, contudo ainda existe uma parcela considerável (20-30% dos candidatos) que não se beneficiará dessa opção por serem ineleáveis ao tratamento cirúrgico. Para tais pacientes terapias como a estimulação do nervo vago (ENV) podem trazer benefícios (Penry and Dean 1990). O nervo vago é o maior nervo craniano e inclui fibras A e B mielinizadas e fibras C não mielinizadas. Cerca de 80-90% de suas fibras são aferentes, predominantemente visceral, codificando informações sensoriais sem dor, e emergem de, ou convergem para, núcleos: o núcleo dorsal do nervo vago, o núcleo ambíguo, o núcleo do trato solitário e o núcleo espinhal trigeminal (Schachter and Saper 1998). A ENV foi primeiramente sugerida por Corning em 1880 (Lanska 2002), e em 1938 Bailey e Bremer descreveram que a estimulação do nervo vago poderia sincronizar a atividade no córtex orbital (Bailey and Bremer 1938). Em 1988 ocorreu o primeiro implante de estimulador vagal em humanos, e foi aprovado pelo FDA em 1997 (Penry and Dean 1990). Entretanto, sua eficácia é controversa, na versão de 2018 da Cochrane foi definido que ENV poderia ser usado como um tratamento neuro-modulador de longo prazo com o uso concomitante de DAEs (Panebianco, Rigby et al. 2015).

A busca e o aperfeiçoamento de novas terapêuticas para pacientes com epilepsia são essenciais. Novas estratégias terapêuticas precisam ser desenvolvidas e, nesse contexto, nos últimos anos a terapia celular surge como um dos tratamentos potenciais das doenças que acometem o SNC (Dharmasaroja 2009). Nesta última década, o nosso grupo tem estudado o efeito das células mononucleares da medula óssea (CMMO) no modelo experimental da epilepsia (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) e em estudos com pacientes epiléticos (estudos Fase I e Fase II, de segurança e de efeito terapêutico)(DaCosta, Portuguez et al. 2016). Os dados clínicos demonstram que a terapia com CMMO efetivamente reduziram as CERs com melhora significativa nos padrões de EEG, assim como, as funções

cognitivas e neurológicas nos pacientes participantes do estudo (DaCosta, Portuguez et al. 2016).

## 2.6 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 (Morrison, Shah et al. 1997). A medula óssea é uma fonte permanente de células-tronco adultas (Körbling and Estrov 2003). As células-tronco hematopoiéticas que residem na medula óssea têm como função mediar à produção de linhagens mielóides e linfóides. A medula óssea é, na realidade, uma fonte permanente de células-tronco pluripotentes (CMMO), que podem originar não somente linhagens celulares hematopoiéticas (CTH) e mesenquimais (CTM), mas também células de vasos sanguíneos (musculares lisos e endoteliais), e em linhagens embriologicamente mais distantes, tais como hepatócitos e células do sistema nervoso (Korbling and Estrov 2003). As CMMO também se mostram capazes de reduzir a resposta inflamatória (Chamberlain, Fox et al. 2007), e foi demonstrado que as CTM podem secretar citocinas como  $\text{INF-}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{TGF}\beta$ , IL-4 e IL-6 (Karnoub, Dash et al. 2007).

As CTMs, conhecidas também como células tronco esqueléticas, células estromais ou ainda células estromais mesenquimais, são células multipotentes capazes de se diferenciar em várias linhagens como osteogênica, condrogênica, adipogênica, dentre outras, além de possuir alta viabilidade e capacidade de auto renovação com senescência limitada (Asari, Furukawa et al. 2012, Yang and Rosenberg 2016). Essas células podem ser encontradas em vários órgãos e a sua quantidade pode variar de acordo com o local. Dentre os principais sítios de CTM tem-se o sistema nervoso central, pele (Gurevitch, Kurkalli et al. 2003, Pombero, Garcia-Lopez et al. 2016), sangue periférico, fígado (Liu, Zhuge et al. 2009), trato gastrointestinal (Presnell, Petersen et al. 2002), sistema nervoso periférico, pâncreas (Mayhall, Paffett-Lugassy et al. 2004), vasos sanguíneos, coração (Beltrami, Barlucchi et al. 2003), córnea, músculo esquelético (Jiang, Jahagirdar et al. 2002), líquido amniótico, sangue do cordão umbilical e placenta (Bobis, Jarocho et al. 2006), medula óssea e o tecido adiposo (Barry and Murphy 2004) (Murphy et al., 2003). Em doenças neurológicas muitos protocolos pré-clínicos já mostraram benefício da terapia celular em modelos animais de isquemia (Chopp and Li 2002, Chen, Kelemen et al. 2004) e doença de Parkinson (Lindvall and Björklund 2004).

No nosso laboratório foi investigado o efeito do transplante intravenoso das CMMO em ratos com epilepsia aguda e crônica, nestes estudos nossos dados mostraram que as CMMO diminuíram os níveis das citocinas pró-inflamatória (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6), aumentaram a expressão de IL-10 no cérebro e no soro dos animais que receberam as CMMO (Costa-Ferro, Souza et al. 2012). Mostramos também que os animais tratados com CMMO tiveram uma menor perda dos neurônios hipocâmpais e uma diminuição das células gliais. Ao mesmo tempo aumento significativo de células que expressavam DCX, um marcador de novos neurônios. Os animais epiléticos apresentaram uma redução significativa das crises recorrentes espontâneas e mantiveram a atividade de LTP (Costa-Ferro, Vitola et al. 2010, Costa-Ferro, Souza et al. 2012, Leal, Costa-Ferro et al. 2014), melhoraram a memória espacial (Venturin, Greggio et al. 2011) e modularam fatores tróficos (Zanirati, Azevedo et al. 2015). Nosso protocolo clínico, demonstrou que o tratamento em pacientes epiléticos que receberam uma dose de CMMO, reduziram suas crises em mais de 50%, assim como melhoraram os scores nos testes de memória e aprendizado (DaCosta, Portuguese et al. 2016).

### **3 O baço**

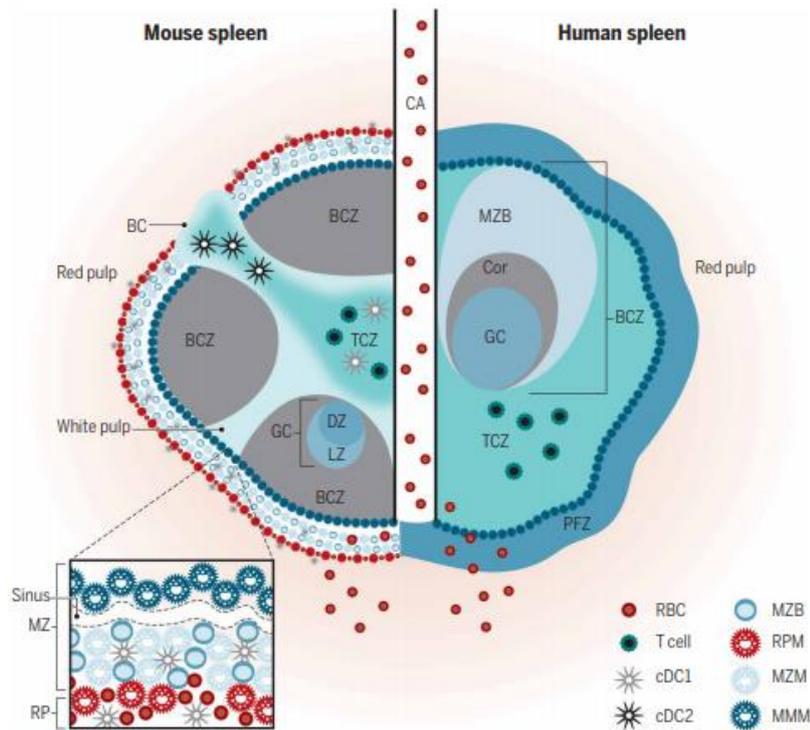
O baço é o segundo órgão imune mais importante do corpo humano, sendo a medula óssea o primeiro mais importante (Jung, Levesque et al. 2017). Nas primeiras fases da vida humana o baço é o responsável pela hematopoese passando essa função para a medula óssea após o nascimento (Cesta 2006). O baço tem uma dupla função, e duas subdivisões anatômicas dentro dele, a polpa branca e polpa vermelha, apresentados na figura 2. A polpa vermelha do baço assume a função de filtração do sangue, armazenamento de ferro, eritrócitos e plaquetas. E a polpa branca tem a função de produzir e liberar células brancas contendo um quarto dos linfócitos do corpo e é responsável por iniciar a resposta imune (Kuper, De Heer et al. 2002, Nolte, Hamann et al. 2002, Balogh, Horváth et al. 2004). Anatomicamente no corpo, o baço está localizado na região esquerda da cavidade abdominal, atrás do estômago e pouco acima do rim esquerdo na região da 11<sup>o</sup> e 12<sup>o</sup> costelas (Mebius and Kraal 2005). O baço tem coloração vermelho escuro e possui peso e aparência diferentes entre as espécies e pode ter seu tamanho e volume alterados em decorrência de certas patologias. (Kuper, De Heer et al. 2002, Nolte, Hamann et al. 2002, Balogh, Horváth et al. 2004, Cesta 2006, Suttie 2006). É um órgão envolto por uma cápsula composta por um denso tecido fibroso, fibras elásticas e musculatura lisa. A capsula envolve e penetra no baço com extensões chamadas de trabéculas que além de ajudar

na sustentação do órgão levam dentro delas os vasos sanguíneos que entram e saem do baço. Seu interior é composto por elementos vasculares, linfáticos, nervosos e celulares (Jung, Levesque et al. 2017). Nos ratos o peso natural do baço é de aproximadamente 0,02% do peso corporal e nos humanos pesa em torno de 150g. (Mebius and Kraal 2005, Cesta 2006).

A polpa branca é a porção linfoide do órgão. Os principais componentes da polpa branca são bainha linfoide periarteriolar (BLPA) que é caracterizada por conjuntos celulares de linfócitos T que circundam artérias que entram no baço como uma camada protetora. A zona marginal (ZM), que fica entre a polpa vermelha a BLPA e desempenha um importante papel no processamento de antígenos (Cesta 2006). Os folículos linfáticos estão presentes na BLPA e são regiões onde ocorre a proliferação de linfócitos B, ao longo dos folículos linfáticos encontram-se os centros germinativos (região com maior densidade de células) que são regiões com grande quantidade de linfócitos mitóticos e ficam localizados no centro dos folículos linfáticos (Kuper, De Heer et al. 2002, Nolte, Hamann et al. 2002, Balogh, Horváth et al. 2004). Os folículos linfáticos respondem a estimulação antigênica que tornam os linfócitos ativos e promovem o aumento da região folicular linfática, tornando o organismo adaptado a vários estímulos antigênicos (Lewis, Williams et al. 2019).

A única forma para o sangue e seus componentes entrarem no baço é através da artéria esplênica (Jung, Levesque et al. 2017). As artérias envoltas pela BLPA seguem seu trajeto pelos centros germinativos da polpa branca até chegarem à polpa vermelha onde encontram a circulação aberta, uma peculiaridade deste órgão. Chegando à polpa vermelha as arteríolas sofrem modificações, primeiro tornam-se retilíneas como “cerdas de uma escova” e passam a ser chamadas de arteríolas peninciladas (Mebius and Kraal 2005, Suttie 2006). Além do formato, modificam também sua estrutura, perdem suas túnicas musculares e entram na circulação aberta onde existem espaços teciduais e sítios chamados de sinusóides (seios venosos) circundados por células fagocíticas (macrófagos). Os sinusóides são drenados por vasos trabeculares esplênicos originados da veia esplênica. A circulação aberta do baço é a região onde ocorre a filtração do sangue, as células são capturadas e é realizada a separação dos eritrócitos senescentes, hemácias com patógenos ou células velhas (mais de 120 dias). Os macrófagos são responsáveis por filtrar, fagocitar e metabolizar o ferro e nutrientes restantes da fagocitose destas células (Mebius and Kraal 2005). Os cordões esplênicos (cadeia de linfócitos), células esplênicas e eritrócitos são intimamente ligados aos seios esplênicos formando redes de circulação aberta e fechada. Essas características fazem do baço um órgão filtrador potente, sendo que o sangue só volta para a corrente sanguínea, através da veia esplênica após passar por esse rigoroso filtro (Cesta 2006, Suttie 2006, Lewis, Williams et al. 2019).

Além das características gerais das polpas branca e vermelha do baço é importante falar sobre a inervação simpática do baço, o fluxo sanguíneo do baço é principalmente controlado por nervos adrenérgicos que são abundantes em órgãos linfoides (Jung, Levesque et al. 2017). Os nervos simpáticos entram no baço e tem um formato de espiral circundando as artérias esplênicas, além disso, neurotransmissores simpáticos contribuem para controlar o tráfego e mobilização de células e antígenos nesses órgãos. As fibras nora-adrenérgicas não se limitam a inervação das estruturas vasculares, mas também penetram na polpa branca onde estabelecem contato próximo com células linfóides principalmente linfócitos T (Jung, Levesque et al. 2017). Os linfócitos T e outras células imunes possuem receptores adrenérgicos sendo sensíveis a neurotransmissores simpáticos. Assim, a estimulação aguda do sistema nervoso leva a mobilização de células imunes do baço para a corrente sanguínea (Vida, Peña et al. 2011). Essa liberação de células do baço para a corrente sanguínea tem uma grande importância no momento de um dano ao organismo, um processo semelhante a um “bombeamento” ocorre devido à estimulação dos nervos simpáticos do baço (Handforth, DeGiorgio et al. 1998). Em relação a estimulação colinérgica no baço, ela ocorre de maneira indireta pois os nervos parassimpáticos não entram no baço como ocorre com os nervos simpáticos. No entanto, existem nervos simpáticos pós-sinápticos no baço que expressam acetilcolina e atuam em receptores muscarínicos de musculatura lisa dos vasos sanguíneos, apresentando comportamento semelhante ao do sistema parassimpático (Brandon and Rand 1961, Rosas-Ballina, Ochani et al. 2008). Além disso macrófagos esplênicos possuem receptor de acetilcolina  $\alpha 7$ -nicotínico ( $\alpha 7nAChR$ ), esta via confere uma ligação parassimpática formando um eixo inflamatório ligado ao sistema colinérgico chamada de via colinérgica anti-inflamatória (CAP). A CAP regula a liberação de fatores inflamatórios por macrófagos com a atuação de dois neurônios um pré-ganglionar originado no núcleo motor dorsal do nervo vago e um pós-ganglionar originado no plexo celíaco que se estende a região esplênica e passa a ser chamado de nervo esplênico. Sendo assim, a estimulação colinérgica no baço é indireta. (Lewis, Williams et al. 2019 ; Pavlov and Tracey 2015).



**Figura 2:** Esquema mostrando o sistema imune esplênico em ratos à esquerda e baço humano a direita. Evidenciando a polpa vermelha e a polpa branca e principais células do baço. Mais notadamente, a BLPA (no esquema mostrado como TCZ) em turquesa e zona folicular germinativa (BCZ) (cinza e tons de azul, e a zona marginal (PFZ) (anel externo azul escuro) (Lewis, Williams et al. 2019).

### 3.1 Relação do baço com doenças do SNC

Estudos demonstram que a esplenectomia antes da aplicação do protocolo de acidente vascular cerebral (AVC) em camundongos reduz significativamente o tamanho do infarto no cérebro. O baço pode responder ao AVC liberando células imunes para a corrente sanguínea que conseqüentemente 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. Além disso, após a esplenectomia foram detectados menos neutrófilos em cérebros de animais que passaram por AVC, quando comparados aos animais que não passaram pela cirurgia. Sugerindo que as células antes encontradas no cérebro eram derivadas do baço (Craig, Dieppe et al. 2008). Estudos prévios têm demonstrado alteração da função esplênica depois do AVC e um aumento da circulação de citocinas pró-inflamatórias (Gendron, Teitelbaum et al. 2002, Offner, Subramanian et al. 2006, Offner, Subramanian et al. 2006, Vendrame, Gemma et al. 2006). Processos imune/inflamatórios do baço são potenciais

alvos terapêuticos para diminuir a inflamação cerebral gerada pelo AVC (Ajmo, Vernon et al. 2008).

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 (Stewart and McKenzie 2002). Esta contração provoca a liberação de células do sistema imunológico pró-inflamatória, que são atraídos para o cérebro por quimiocinas induzidas pelo acidente vascular cerebral. Estas células imunes periféricas podem, então, agir para aumentar neuroinflamação e, posteriormente, a neurodegeneração (Hausmann, Berman et al. 1998, Ábrahám, Harada et al. 2002). Dados mostram que a infiltração de células como monócitos/macrófagos tem importante papel na neuroinflamação e podem ser necessárias para a ativação da microglia (Vezzani, Sperk et al. 1999, Ajmo, Vernon et al. 2008). Isto é consistente com outros relatos que mostram uma resposta esplênica ativa no AVC em ratos (Offner, Subramanian et al. 2006, Vendrame, Gemma et al. 2006).

Em modelo de epilepsia induzida por ácido caínico a atividade metabólica dos esplenócitos esta aumentada podendo estar ligado ao aumento de atividade de macrófagos (Kubera, Budziszewska et al. 2001). E foi demonstrado por Marchi e colaboradores que no modelo da pilocarpina, a esplenectomia diminuiu a severidade 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 foi encontrado também um aumento de células T presentes no baço após o SE induzido pela administração de pilocarpina (Marchi, Johnson et al. 2011).

Estudos experimentais com isquemia cardíaca, cerebral, e epilepsia, mostram que células mononucleares da medula são encontradas no baço após vários dias pós-transplante (Lee, Chu et al. 2007, Barbosa da Fonseca, Gutfilen et al. 2010, Costa-Ferro, Souza et al. 2012). Células de cordão umbilical humano (CCUH), transplantadas em ratos isquêmicos após 24 horas, ficam retidas no baço e foi constatada uma redução de 60% da área infartada. O transplante de CCUH reduziu os níveis de citocinas pró-inflamatórias e também aumentou os níveis de citocinas anti-inflamatórias como IL-10. O fato de os níveis de citocinas pró-inflamatórias estarem diminuídos leva a uma redução do dano neuronal. Sendo assim, tratamentos que tenham um efeito similar ao das CCUH para bloquear a resposta esplênica podem ser excelentes candidatos a terapia para doenças do SNC (Ajmo, Vernon et al. 2008).

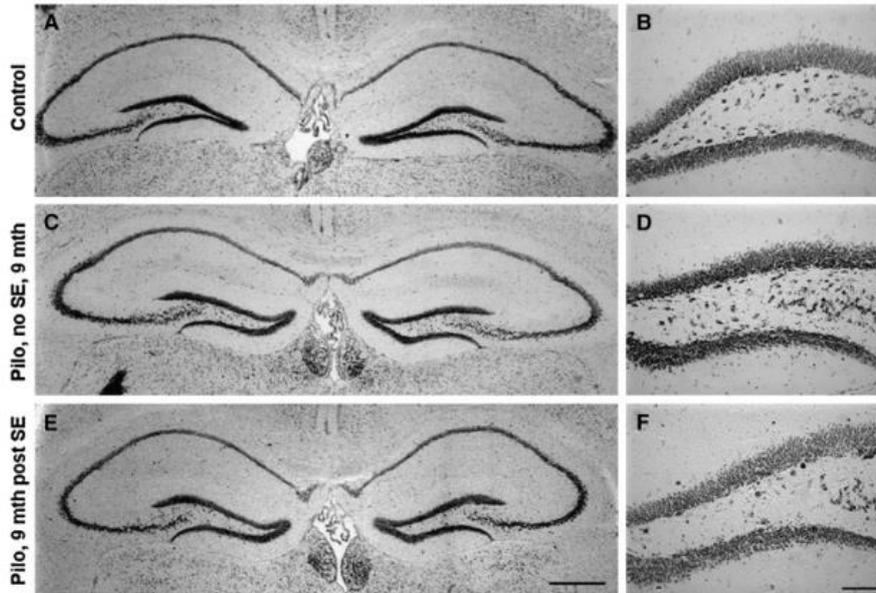
## 4 Modelos Experimentais

Os modelos experimentais que melhor representam as epilepsias parciais complexas são aqueles que induzem uma condição crônica após o SE, o qual pode ser desencadeado por estímulos químicos. O ácido caínico e a pilocarpina são os quimioconvulsivantes indicados na indução do SE, em modelo animal. Nestes modelos os achados anatomopatológicos e as consequências cognitivas da ELT são equivalentes aos encontrados em humanos (Cavalheiro, Leite et al. 1991, Zattoni, Mura et al. 2011) (Mello, Cavalheiro et al. 1993). (Figura 2 e 3)

Os modelos de pilocarpina e ácido caínico apresentam assim como na ELT humana, três períodos da doença, uma fase aguda que no modelo é o momento de indução do SE, um segundo período, uma fase silenciosa (portanto sem crises). E então, a fase crônica onde os animais passam a apresentar crises espontâneas e recorrentes. Do mesmo modo, as lesões hipocampais e do sistema límbico, os padrões elétricos encefálicos, neuroquímicos e inflamatórios são semelhantes aos apresentados em pacientes (Turski, Cavalheiro et al. 1983, Cavalheiro, Leite et al. 1991, Zhong, Ren et al. 2016).

## 4.1 Pilocarpina (PILO)

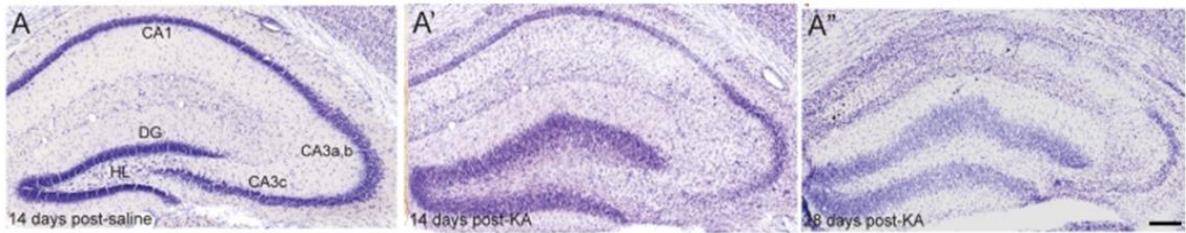
Modelo experimental com pilocarpina, foi inicialmente descrito em ratos por Turski e colaboradores (Turski, Cavalheiro et al. 1983). A pilocarpina é extraída de folhas de *Pilocarpus microphyllus* e *Pilocarpus jaborandi*, árvores sul americanas. Um agonista muscarínico que age principalmente em receptores do tipo M1 e M3 que ativam o sistema colinérgico parassimpático e age a partir da ativação de muitos neurônios durante o *SE* levando a uma ativação secundária do sistema glutamatérgico e assim, excito toxicidade no hipocampo e demais estruturas. A ativação de receptores muscarínicos nos leucócitos pode ter uma papel importante para a ictogênese no modelo de pilocarpina (Marchi, Oby et al. 2007). Sua administração intraperitoneal (ip.), gera crises motoras límbicas, com início entre 15 e 30 minutos após a injeção. Neurônios hipocampais sofrem descargas elétricas devido ao bloqueio de correntes de potássio transmembranar, o que leva o animal a um estado epiléptico onde apresenta crises recorrentes em um curto espaço de tempo (Fernandes 2013). A região hipocampal é uma das estruturas mais atingidas neste modelo, uma extensa degeneração das células piramidais pode ser detectada nas regiões de CA1, CA3 e no giro dentado conforme mostrado na figura 3 (Turski, Cavalheiro et al. 1983). Além da perda neuronal, observa-se também o brotamento supra granular de fibras musgosas do giro dentado de ratos (Mello, Cavalheiro et al. 1993), sinaptogênese e neurogênese no hipocampo, assim como mudanças nas propriedades eletrofisiológicas neuronais (Santos, Marques et al. 2000, Müller, Gröticke et al. 2009). A utilização do modelo de pilocarpina na fisiopatologia da ELT tem proporcionado avanços no entendimento dos mecanismos da patologia (Curia, Longo et al. 2008).



**Figura 3:** Hipocampos corados por tionina representando a morte neuronal no modelo de pilocarpina. (A, B), Hipocampos de camundongos controle (C, D) Hipocampo de animais que receberam pilocarpina, mas não induziram o SE e (E, F) hipocampo após 9 meses da administração de pilocarpina. B, D e F mostram a região do hilo e CA3 com ampliação maior. Observe a perda dos neurônios CA3 (CA4) e hilo em E e F. A barra da escala em E indica 500 µm para A, C e E; barra de escala em F, indica 100 µm para B, D e F. Muller C et al. 2009 (Müller, Gröticke et al. 2009).

## 4.2 Ácido caínico (KA)

O KA é uma toxina análoga ao L-glutamato com afinidade pelo receptor ionotrópico glutamatérgico do tipo cainato, foi isolado em 1953 de uma alga marinha "kaininso" ou fantasma do mar. Receptores do cainato quando ativados são permeáveis ao sódio e promovem rápida despolarização neuronal. Os receptores do tipo cainato podem ser encontrados na amígdala, gânglios basais, neocórtex bem como na região de Cornos de Amon (CA1 e CA3) do hipocampo, regiões que são mais sensíveis a excitotoxicidade do KA e assim gerar as crises no modelo (Lévesque and Avoli 2013). O uso de KA como modelo epiléptico é bem aceito, pois ele mimetiza a epilepsia do lobo temporal humana (Nadler 1981). A administração via ip. de KA em animais induz o SE, cerca de 60 minutos após sua administração, leva a um período de latência semelhante ao que ocorre na ELT em humanos e também no modelo de pilocarpina. A droga pode ser administrada também pela via hipocampal com cirurgia estereotáxica. O período de latência dura em torno de 3 a 4 semanas sem nenhum episódio convulsivo, que chamamos de epileptogênese. Transcorrido esse tempo os animais passam a apresentar CERs. Além das crises ocorre uma neurodegeneração na região hipocampal nas regiões de CA1, CA3 e estriado, mostrado na figura 4 (Sperk 1994).



**Figura 4:** Hipocampus de camundongos após o KA marcados por cressil-violeta. A) 14 dias pós injeção de salina, A') 14 dias pós injeção de KA e A'') 28 dias após injeção de KA, degeneração gradual de CA1, CA3, e neurônios hilares, juntamente com a dispersão de células granulares. Imagem adaptada de Zattoni et al, 2011. (Zattoni, Mura et al. 2011)

## 5 Classificação comportamental da intensidade das crises

A crise convulsiva ocorre no cérebro devido a grandes quantidades de potenciais de ação sincronizados e rítmicos que refletem no corpo com espasmos musculares, perda de consciência, perda de controle esfinteriano dentre outros sintomas (Fisher, Boas et al. 2005). Racine (1972) utilizando um modelo experimental de impulsos elétricos em ratos fez testes com diversas voltagens e com diferentes tempos de intervalo entre os impulsos. A partir disto ele pode perceber a diferença de resposta muscular de cada grupo e separou os perfis de crises em cinco estágios diferentes de gravidade (Racine 1972).

Escala de Racine (1972)		
0-	Imobilidade	Não há presença de crises.
1-	Automatismos faciais e da boca	São sutis e podem ser difíceis de identificar.
2-	Mioclônias de cabeça e pescoço	Contrações musculares incontroláveis no pescoço causam um ligeiro a intenso distúrbio da cabeça.
3-	Clônias de patas anteriores	Movimento involuntário dos braços, ou membros anteriores devido ao aumento da estimulação muscular.
4-	Clônias de patas posteriores	Maior movimento nas pernas ou membros inferiores, elevação do corpo. Para modelos de ratos, este estágio é demonstrado pelo fato de o rato ficar em pé nas patas traseiras.
5-	Crises Tônico-clônicas. Elevação e queda do corpo.	Crises generalizadas com elevação e queda do corpo. É o estágio mais severo de crises onde o paciente tem maior chance de lesões.

**Tabela 1:** Tabela com a escala de classificação comportamental dos animais durante as crises do SE estabelecida por Racine, contendo os graus de resposta dos animais à indução de crises convulsivas (Racine 1972).

## Capítulo I

---

AVALIAÇÃO DA BIODISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE  
MEDULA ÓSSEA EM RATOS ESPLENECTOMIZADOS E SUBMETIDOS AO STATUS  
EPILEPTICUS INDUZIDO POR PILOCARPINA

## 1 Hipótese

**H0-** As células encontradas no baço após o transplante não são responsáveis pela modulação da resposta inflamatória após a lesão cerebral gerada pela pilocarpina.

**H1-** As células encontradas no baço após o transplante são responsáveis pela modulação da resposta inflamatória após a lesão cerebral gerada pela pilocarpina.

## 2 Objetivo

O objetivo é avaliar nas primeiras 48 horas a biodistribuição e os efeitos das CMMO de camundongos doadores EGFP<sup>+</sup> em ratos esplenectomizados submetidos ao SE.

### 2.1 Objetivos específicos

Em ratos com ou sem baço submetidos ao SE induzido pelo modelo de pilocarpina:

- a) Determinar se a esplenectomia influencia na indução do SE por pilocarpina;
- b) Avaliar a rota de migração das CMMO;
- c) Quantificar os fatores inflamatórios (IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, AIF-1) no tecido cerebral e tecido esplênico nos tempos: 12 horas e 24 horas após SE;
- d) Avaliar a memória espacial após 10 dias do SE.

### 3 Questões éticas

Os experimentos foram realizados com aprovação do Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da PUCRS. Com o número de aprovação 15/00480. Carta de aprovação encontra-se na seção anexos.

### 4 Material e métodos

O estudo foi realizado no Laboratório de Neurociências e Laboratório de Sinalização Celular do Instituto do cérebro do Rio Grande do Sul (Inscer) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), onde possuem todos os equipamentos necessários para a realização dos experimentos.

#### 4.1 Animais

Foram utilizados Ratos Wistar machos (40-50 dias) para indução do SE e camundongos machos C57BL/6 EGFP<sup>+</sup> que foram doadores de CMMO. Durante o experimento os animais foram mantidos no Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CeMBE) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul sob iluminação e temperatura controlados (ciclo claro e escuro 12 horas e aproximadamente 24° C) com água e ração à vontade. No estudo foram utilizados cento e setenta e dois ratos e trinta e quatro camundongos como doadores de CMMO. Os experimentos e eutanásia seguiram as diretrizes do CONCEA (CONCEA 2013) e DBCA (Brasil 2013) *Guide for Care and Use of Laboratory Animals from National Institutes of Health* (Care, Animals et al. 1985).

A determinação para o número de animais utilizados em todas as análises foi baseada em literatura científica de referência atual dentro das técnicas a serem estudadas e de acordo com a taxa de mortalidade do modelo da pilocarpina (Fabene, Mora et al. 2008, Ravizza, Gagliardi et al. 2008, Costa-Ferro, Vitola et al. 2010, Venturin, Greggio et al. 2011, Lévesque and Avoli 2013). Assim, estabeleceu-se que um número de 4 animais por grupo para cada análise de RT-q-PCR (Li, Zhao et al. 2015). A eutanásia, dos animais para a obtenção de amostras foi realizado com o mínimo de dor, medo e angústia por método químico com o uso de Isoflurano por inalação, seguido do uso da guilhotina para decapitação e retirada do cérebro dos animais e posterior retirada de amostras dos órgãos.

## 4.2 Esplenectomia

A esplenectomia foi realizada e adaptada de acordo com a descrição feita por Ajmo et al. (2008) (Ajmo, Vernon et al. 2008). Os animais foram anestesiados com Xilazina 5% (10 mg/kg ) e Quetamina 2% (75 mg/kg) posteriormente, foi realizada uma incisão cerca de 2cm da linha média dorsal no lado esquerdo da cavidade abdominal. Com uma pinça sem ponta o baço foi exposto e uma ligadura nos vasos sanguíneos foi realizada. O baço então foi removido e armazenado em -80°C. Antes da sutura final a área foi cuidadosamente observada, para verificar se havia a presença de hemorragia ou outras complicações. Os animais foram observados, tratados com analgésico Acetaminofen (1-2mg/ml na água) nas primeiras horas (Damy, Camargo et al. 2010) e mantidos aquecidos em placa de aquecimento durante o procedimento.

## 4.3 Protocolo de pilocarpina

Neste projeto foi utilizado o protocolo de indução de epilepsia pelo modelo experimental de pilocarpina (PILO) conforme descrito por Cavalheiro (Cavalheiro, Leite et al. 1991). Previamente à aplicação intraperitoneal (i.p.) de PILO na dose de 320mg/kg, foi aplicado aos animais uma injeção i.p. de metilescopolamina, na dose de 1mg/kg, com o objetivo de minimizar os efeitos colinérgicos periféricos (Zanirati, Azevedo et al. 2015). Após, os animais foram colocados em caixas de acrílico transparentes para a observação das manifestações comportamentais produzidas pela droga. Os animais foram observados por 90 minutos e classificados de acordo com a Escala de Racine (tabela 1) quanto às alterações comportamentais (Racine 1972). Considera-se, como critério de SE, a persistência de crises contínuas por no mínimo trinta minutos. Apenas foram incluídos no trabalho os animais que entraram em SE classificados como Racine 4 e 5. Noventa minutos após a instalação do SE, foi injetado 10mg/kg de diazepam (i.p.) para atenuar as crises comportamentais. Nas próximas 24 horas, os animais receberam tratamento com ração embebida em soro glicosado por via oral para reposição de sais.

#### **4.4 Preparação de células**

Para a obtenção de células foram usados como doadores, camundongos EGFP<sup>+</sup> transgênicos. Os animais EGFP<sup>+</sup> expressam a proteína verde fluorescente no citoplasma de suas células podendo ser identificadas por imunofluorescência com o uso de anticorpos ou por PCR através de primers específicos de detecção.

Os animais foram profundamente anestesiados com Xilazina e Quetamina, eutanasiados e dissecados, os ossos longos (úmero, fêmur e tíbia) foram isolados e as epífises dos ossos, cortadas para possibilitar a lavagem das cavidades ósseas. O aspirado da medula óssea foi coletado e processado entre etapas de suspensão e centrifugação. A camada de células mononucleares foi separada por gradiente de Ficoll. A Câmara de Neubauer foi usada para a contagem das células. Utilizamos alíquotas de 100 µl contendo 10<sup>7</sup>CMMO (de Paula, Pedroso et al. , Costa-Ferro, Vitola et al. 2010).

#### **4.5 Terapia celular**

A terapia celular com a fração de CMMO foi realizada através da veia da cauda, em um volume de 100µl. A metodologia foi aplicada no mesmo dia do protocolo de pilocarpina, uma hora após a aplicação do Diazepam (fase aguda) (Costa-Ferro, Vitola et al. 2010).

#### **4.6 Análise de Biodistribuição**

Após a eutanásia o cérebro, pulmão, fígado, baço e rim dos animais foram cuidadosamente retirados e congelados. Para controle positivo de DNA contendo células EGFP<sup>+</sup> usamos uma amostra de músculo gastrocnêmio de camundongos C57/BL6 EGFP<sup>+</sup> e para o controle negativo uma amostra de músculo gastrocnêmio de ratos Wistar. Resumidamente o DNA foi extraído usando TRIzol (Life Technologies). As amostras de tecido foram maceradas em uma placa contendo 300 µL de PBS seguido pela adição de 600 µL de TRIzol (Life Technologies) e 120 µL de clorofórmio (Merk) e foram homogeneizadas com o uso do Vórtex (Genie), posteriormente, centrifugadas à 12.000 xg por 10 minutos. A fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo, e adicionado um volume 0,7x de álcool isopropílico (Merk) e as amostras foram armazenadas a -20 graus Celsius por 12 horas. Na sequência, as amostras foram descongeladas e centrifugadas a 12.000 xg por 10 minutos e o sobrenadante foi

descartado. O precipitado foi ressuspenso com 40  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, livre de DNase e RNase (Life Technologies). O DNA foi quantificado utilizando o fluorômetro *Q-ubit 2.0* (Life Technologies) (Marinowic, Da Silva et al. 2016).

#### **4.7 Curva de Contaminação com DNA**

Cinco concentrações diferentes de tecido muscular de camundongos C57/BL6 EGFP+ foram usadas para contaminar as amostras de DNA usadas como controle de ratos Wistar. As concentrações usadas foram:

(10  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ): 1,000  $\text{pg}/\mu\text{L}$ , 500  $\text{pg}/\mu\text{L}$ , 100  $\text{pg}/\mu\text{L}$ , 10  $\text{pg}/\mu\text{L}$  e 1  $\text{pg}/\mu\text{L}$  (Marinowic, Da Silva et al. 2016).

#### **4.8 Extração de RNA e RT-q-PCR**

A extração de RNA das amostras do tecido do cérebro e do baço foram realizadas com o kit, *RNA SV-Total isolation system da Promega*, o protocolo foi realizado conforme as orientações do fabricante. Avaliamos os níveis de interleucina-1 $\beta$ , Interleucina-10, TNF- $\alpha$  e AIF-1 e as sequências de primers usados na técnica de qRT-PCR estão demonstrados na tabela 1. Tanto, a qualidade quanto, a quantidade do RNA total extraído foi analisada por espectrofotometria em equipamento *Q-ubit 2.0* (Life Technologies). A síntese de cDNA foi realizada utilizando kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) e amplificação utilizando *kit Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Life Technologies) conforme orientação do fabricante (Marinowic, Domingues et al. 2015).

<i>Primer</i>	<i>Sequências de Primers 5' -3'</i>	
	Forward primer	Reverse Primer
<b>AIF-1</b>	CATATGTTCTCAGGGAGATCTTGG	AGGAAGTGCTTGTTGATCCCA
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	AAAGAAGAAGATGGAAAAGCGGTT	GGGAAGTGTGCAGACTCAAACCTC
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	AGAACAGCAACTCCAGAACACCCT	ATCTCGGATCATGCTTTCCGTGCT
<b>IL-10</b>	GCCAAGCCTTGTCAGAAATGA	TTTCTGGGCCATGGGTTCTCT
<b>GAPDH</b>	TGCCACTCAGAAGACTGTGGATG	GCCTGCTTCACCACCTTCTGAT
<b>EGFP</b>	GGGCACAAGCTGGAGTACA	ATGTTGTGGCGGATCTTGA

**Tabela 1:** Tabela contendo as sequências de *primers* usados na técnica de qRT-PCR.

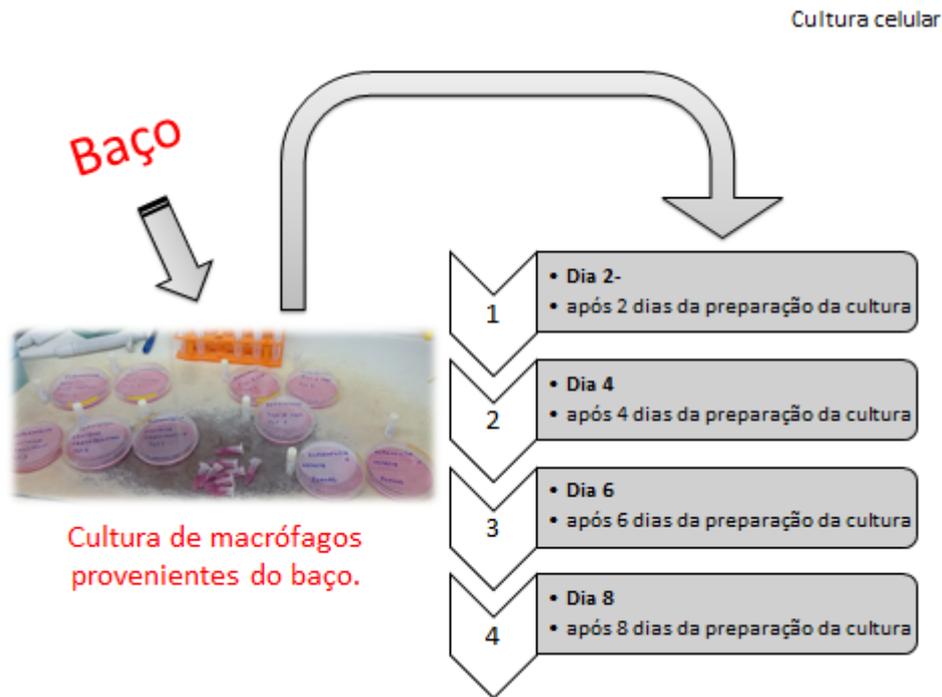
#### 4.9 Obtenção e cultura de células do baço

Para este estudo utilizamos ratos dos grupos Naive, Pilo, Pilo-CMMO e controle-CMMO, após 24 horas do SE. Os animais foram eutanasiados e o baço foi removido cirurgicamente e submetido a cultura celular de macrófagos esplênicos.

Os baços foram macerados com material estéril e foi realizado os plaqueamentos em placas de Petri 60mm. Os macrófagos foram cultivados em meio de cultura Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) suplementado com 100U/mL de penicilina (Gibco), 100U/mL de estreptomicina (Gibco) e 100 $\mu$ g/mL de gentamicina (Gibco). Após aderência overnight das células a 37°C, atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, foram coletados 2mL de meio sobrenadante de cultura celular no dia seguinte e congelado para análise posterior. Esse processo foi repetido 4 vezes, com o intervalo de 1 dia para cada coleta (Shen, Ajmo et al. 2009). Foi realizada a troca de meio em cada uma das coletas a fim de avaliar a expressão das citocinas IL-10, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 no meio sobrenadante no decorrer dos dias.

Ao fim das coletas de sobrenadantes dos consecutivos dias, foi realizada a retirada dos macrófagos da placa de cultura também para posterior análise, por dissociação enzimática, utilizando tripsina 1%. Esta solução com células foi então centrifugada em um tubo Falcon a 1500rpm por 5 min. Ao final dessa etapa as células se encontram sedimentadas no fundo do tubo, é aspirado então todo sobrenadante e as células são ressuspensas em uma solução de

soro fetal bovino (SFB) com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), armazenados em criotubos à temperatura de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Van Furth, Cohn et al. 1972, Munthe-Kaas, Berg et al. 1975, Walker, Shah et al. 2010) A figura 1 demonstra as etapas do protocolo.



**Figura 1:** Esquema descritivo do experimento de cultura de macrófagos. Após a retirada do baço a cultura foi realizada e os sobrenadantes foram coletados após dois, quatro, seis e oito dias após o dia de preparação da cultura.

#### 4.10 Análise de citocinas pró e anti-inflamatórias do sobrenadante da cultura celular

Para análise dos fatores secretados nos sobrenadantes da cultura de macrófagos, Usamos a técnica do Multiplex e utilizamos o kit Cytokine & Chemokine 22-Plex Rat ProcartaPlex. Foram quantificados os fatores IL-1 $\beta$ , TNF  $\alpha$ , IL-6 e IL-10. O protocolo foi realizado de acordo com as instruções do fabricante do kit. E a análise dos dados foi realizada por ANOVA de uma via com pós teste Tukey.

### **4.11 Labirinto aquático de Morris**

O teste de labirinto aquático de Morris é um teste de memória espacial, amplamente usado para avaliar o desempenho cognitivo em animais após o protocolo de pilocarpina. Estabelecido por Morris em 1984 (Vezzani and Viviani 2015), o teste conta com uma piscina construída em concreto com 180cm de diâmetro de 55cm de altura, e com 25cm de água a 21-24° Célcius, a sala onde o teste foi realizado, conta com iluminação padrão e pistas nas paredes para que os animais se localizem, e possam ver as pistas de qualquer ponto da piscina durante o experimento. A piscina possui os quadrantes imaginários, norte, sul, leste e oeste. Durante os treinos foi colocada uma plataforma de 20cm sob a água de modo que fique invisível ao animal (2cm abaixo d'água), mas, que permitiu ao animal subir e permanecer sobre a plataforma durante o tempo estipulado. O protocolo usado para avaliar o aprendizado da memória espacial nos animais foi de dezesseis largadas no mesmo dia, e 24 horas depois, foi realizado o teste para avaliar a consolidação desta memória. No treino o tempo disponibilizado de nado em cada largada foi de 120 segundos. O tempo que o animal levou para encontrar a plataforma sozinho foi chamado de latência de escape. Durante o treino os animais que não encontraram a plataforma após 120 minutos foram auxiliados até ela pelo experimentador. Nas largadas 1 a 4 o animal foi colocado uma vez em cada quadrante, e quando o rato encontrou a plataforma permaneceu lá por 60 segundos. Nas largadas 5 a 8 o tempo de permanência na plataforma foi de 40 segundos e nas largadas 9 a 16 o tempo de permanência na plataforma foi de 20 segundos. O tempo de latência de escape em cada largada foi cronometrado e registrado. Depois de transcorridas, 24 horas deste treino, a plataforma foi retirada e o animal foi colocado na piscina uma única vez no quadrante sul e permaneceu nadando por 60 segundos. O tempo que os animais levaram para encontrar o local onde estava a plataforma foi cronometrado e registrado. Esse valor foi chamado de latência de escape. O teste foi filmado para posterior conferência e documentação (Bonini, Da Silva et al. 2007, Fukumura, Sasaki et al. 2018)

### **5 Análise estatística:**

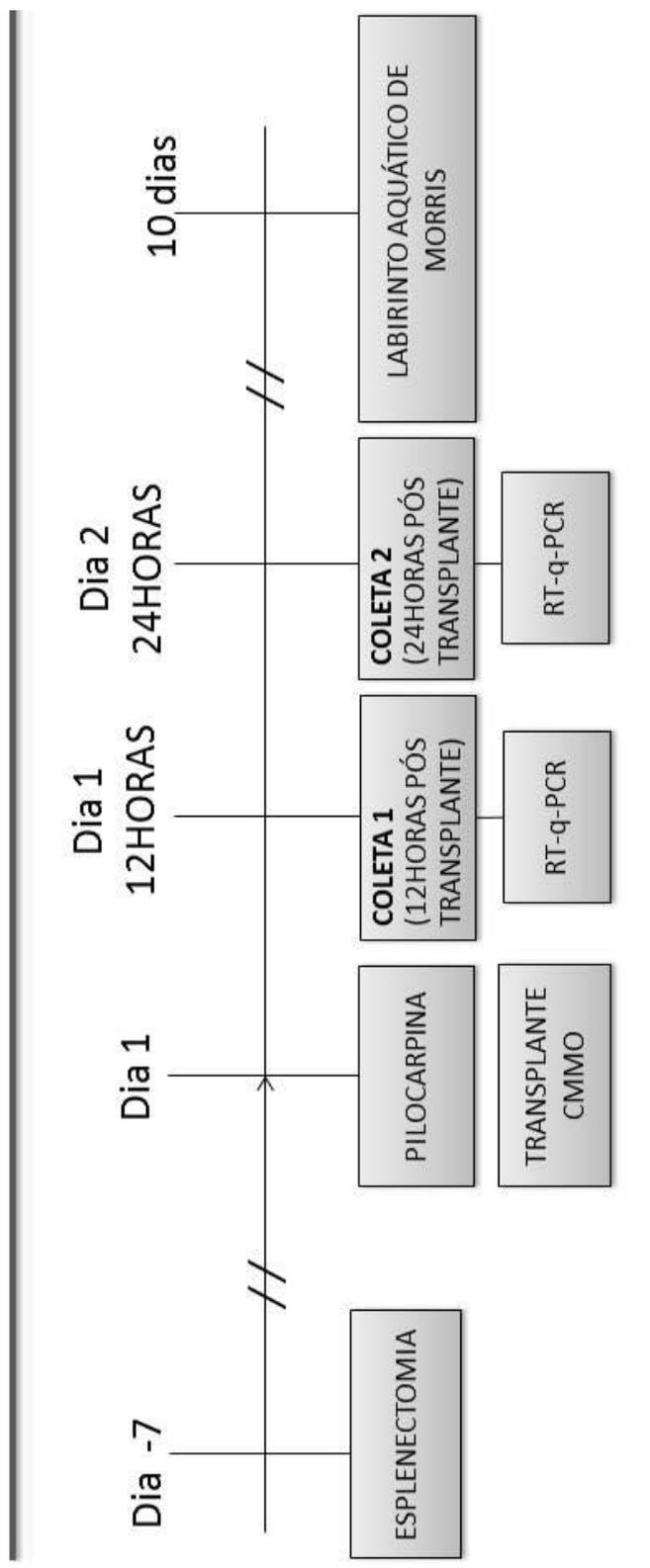
Os testes estatísticos foram realizados pelo programa Graph Pad Prism 7.0. Usamos o teste de Fisher para analisar a mortalidade e a porcentagem de animais que entraram em SE. Para a análise de latência e número de crises usamos o teste T não pareado. Para avaliar as quantidades dos fatores inflamatórios dosados nos tecidos utilizamos a Análise de Variância

(ANOVA) de uma via e aplicamos o post-hoc de Tukey. Os dados do LAM foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste de Dunnett. Foi considerado um nível de significância de  $p < 0,05$ . Todos os valores foram baseados na média  $\pm$  erro padrão.

## **6. Delineamento experimental**

O primeiro procedimento, realizado nos animais foi a esplenectomia, que ocorreu sete dias antes da pilocarpina. Os animais dos grupos tratados receberam o transplante de CMMO, 60 minutos após o final do protocolo de pilocarpina. Transcorridas 12 e 24 horas após o transplante ocorreu a primeira coleta de órgãos nos animais. As amostras destes animais foram congeladas para posterior extração de RNA para qRT/PCR. Em um terceiro grupo de animais foi realizado o teste do labirinto aquático de Morris 10 dias após o protocolo de pilocarpina. Os animais foram divididos em nove grupos experimentais. O Delineamento experimental do projeto está simplificado no esquema da figura 2.

## *Delineamento Experimental*



**Figura 2:** Esquema contendo o delineamento experimental do projeto agudo.

## **7. Grupos experimentais**

O projeto contou com nove grupos experimentais. Onde, seis desses grupos apresentam dois tempos de análise (12 e 24 horas após o transplante), são estes CMMO, Esplenec/CMMO, Pilo, Pilo/Esplenec, Pilo/CMMO, Pilo/Esplenec/CMMO. A divisão dos grupos para os tempos de eutanásia após o experimento foi de maneira randomizada.

### **7.1 Naive**

O grupo Naive, é o controle, um grupo onde os animais não passaram por nenhum tipo de intervenção. Apenas coletamos suas amostras para o teste de PCR.

### **7.2 Sham**

O grupo Sham, é o grupo controle da cirurgia. Os animais neste grupo passaram por todos os procedimentos da cirurgia de esplenectomia, mas não tiveram o baço retirado, ou seja, os animais foram anestesiados, mantidos sob observação após o procedimento, e ainda receberam Acetaminofenol após a incisão tal como os animais esplenectomizados. As amostras dos animais foram coletadas sete dias após o procedimento.

### **7.3 Esplenec**

O grupo esplenectomia, teve o baço retirado por meio de intervenção cirúrgica conforme descrito nas metodologias. Suas amostras foram coletadas para o teste de PCR.

#### **7.4 CMMO**

Os animais deste grupo receberam a terapia com CMMO pela veia da cauda com  $10^7$  células em 100  $\mu$ l e suas amostras foram retiradas nos tempos de 12 horas e 24 horas após a terapia celular. Esse grupo foi um controle do transplante de CMMO.

#### **7.5 Esplenec/CMMO**

Neste grupo os animais foram esplenectomizados e sete dias após receberam a terapia com CMMO exatamente igual aos demais tratados, e tiveram suas amostras retiradas nos tempos 12 horas e 24 horas após a terapia celular.

#### **7.6 Pilo**

O grupo Pilo foi submetido ao protocolo de pilocarpina, suas amostras foram coletadas para o teste de PCR em 12 e 24 horas após a pilocarpina.

#### **7.7 Pilo/esplenec**

Os animais deste grupo foram esplenectomizados sete dias antes do protocolo de pilocarpina. Os animais foram separados aleatoriamente em dois grupos 12 e 24 horas.

## 7.8 Pilo/CMMO

O grupo Pilo/CMMO, passou pelo protocolo de pilocarpina e uma hora após o Diazepam os animais receberam a terapia celular (CMMO) pela veia caudal. O grupo foi dividido em dois grupos e os animais foram eutanasiados 12 e 24 horas após o transplante.

## 7.9 Pilo/Esplenec/CMMO

Neste grupo os animais tiveram o baço retirado por meio de esplenectomia, transcorridos sete dias passaram pelo protocolo de pilocarpina, uma hora após o Diazepam receberam a terapia celular (CMMO) pela veia caudal. O grupo foi dividido em dois grupos e os animais foram eutanasiados 12 e 24 horas após o transplante.

<b>Grupos</b>	<b>Naive</b>	<b>Sham</b>	<b>Esplenec</b>	<b>CMMO</b>
<b>Intervenções</b>	Nenhuma intervenção.	Cirurgia controle, sem a retirada do baço.	Cirurgia para retirada do baço.	Somente Transplante de CMMO. Eutanásia 12 ou 24horas após o transplante.
<b>Grupos</b>	<b>Pilo</b>	<b>Pilo/Esplenec</b>	<b>Pilo/CMMO</b>	<b>Pilo/Esplenec/CMMO</b>
<b>Intervenções</b>	Pilocarpina Eutanásia 12 ou 24horas após o fim do protocolo de pilocarpina.	Esplenectomia e Pilocarpina. Eutanásia 12 ou 24horas após o fim do protocolo de pilocarpina.	Pilocarpina e transplante de CMMO. Eutanásia 12 ou 24horas após o transplante.	Esplenectomia, pilocarpina e transplante de CMMO. Eutanásia 12 ou 24horas após o transplante.

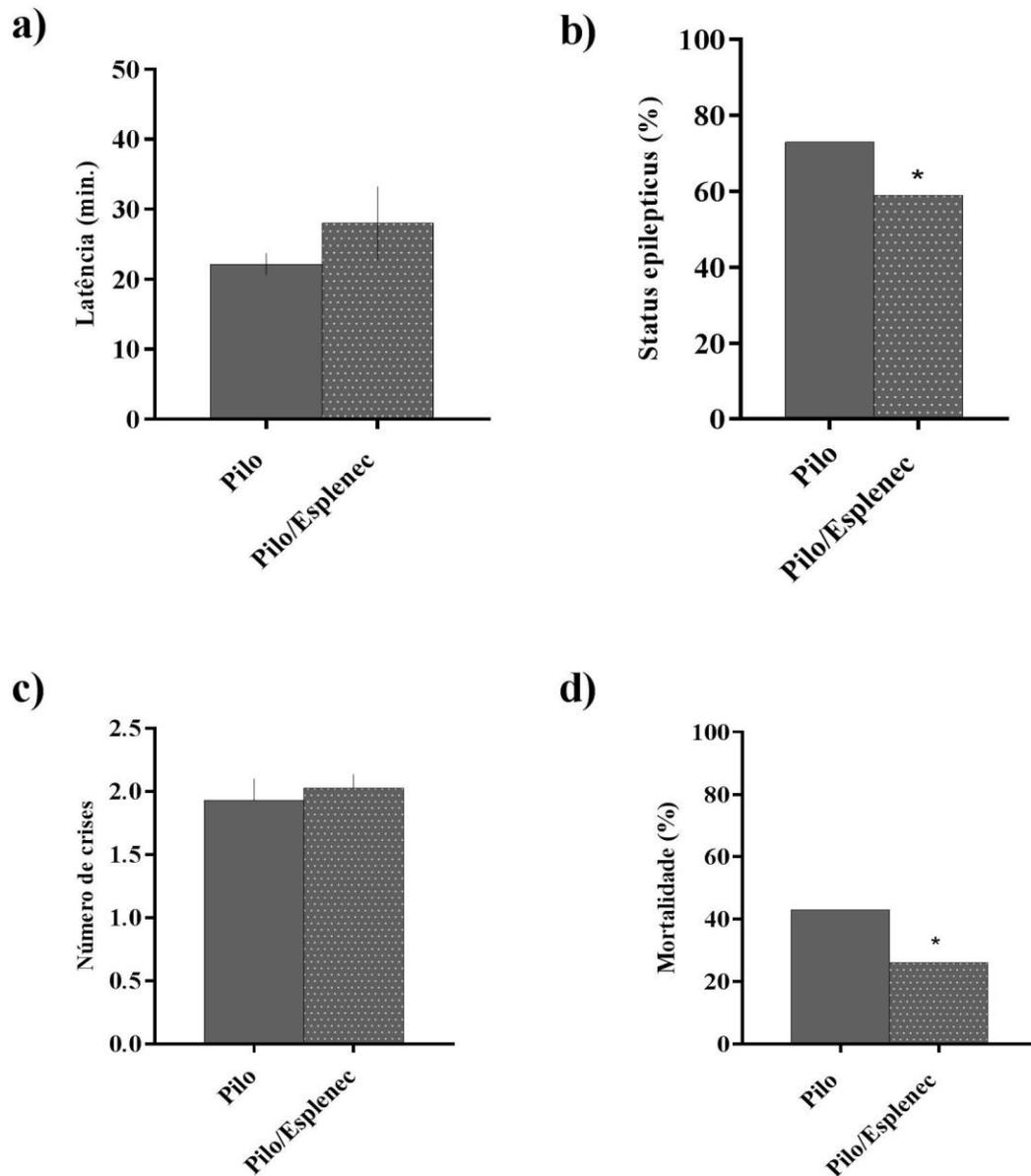
**Tabela 2:** Quadro com descrição dos grupos experimentais, tempos e intervenções realizadas em cada grupo experimental.

## 8. Resultados

### 8.1 A influencia da esplenectomia nos parâmetros de crise durante o protocolo de pilocarpina.

Após aproximadamente 10 minutos da administração da pilocarpina os animais passaram a apresentar alterações comportamentais características que culminaram no SE. Inicialmente os camundongos apresentaram acinesia seguida de agitação do corpo ao redor do eixo crânio-caudal, automatismos mastigatórios acompanhados por salivação. Esses comportamentos progrediram para tremores generalizados, clônia nas extremidades do corpo, breves crises convulsivas seguidas por um comportamento em que o rato ficava em pé, apoiado nas patas posteriores e apresentando clônia nas patas anteriores, e queda. Finalmente, os animais passaram a apresentar crises clônicas generalizadas e ininterruptas características do SE.

Na figura 3 estão apresentados os gráficos do comportamento dos animais durante o SE. A latência (intervalo de tempo entre a aplicação da pilocarpina e o início do SE) (figura 3a) no grupo Pilo foi de  $22,16 \pm 1,55$  min. No grupo que foi previamente esplenectomizado (Pilo/Esplenec) a latência foi de  $27,98 \pm 5,27$  min. A porcentagem dos animais que entraram em SE, está representada em (figura 3b), no grupo Pilo foi de 72,8% e no grupo Pilo/Esplenec foi de 59%. Os dados foram analisados com o teste de Fisher com Qui-Quadrado resultando em um  $p=0,0366(*)$ . Em (figura 3c) demonstramos a média do número de crises que os animais de ambos os grupos apresentaram, no grupo Pilo foi de  $1,927 \pm 0,17$  e no grupo Pilo/Esplenec de  $2,027 \pm 0,10$  na (figura 3d) demonstramos a mortalidade nos dois grupos experimentais, no grupo Pilo foi de 42,8% e no grupo Pilo/Esplenec foi de 26,5%. A diferença entre os grupos foi comparada através do teste t não pareado resultando em  $p=0,2542(*)$ .



**Figura 3:** Dados coletados durante o SE. (a) latência para o SE, em minutos. (b) a porcentagem de animais que entrou em SE nos grupos com baço e sem baço. (c) número de crises apresentadas pelos animais durante o SE, e em (d) está representada a porcentagem de mortalidade nos animais submetidos ao SE com esplenectomia e sem a cirurgia. O tempo de início do SE, foi analisado por teste T de *student* não pareado. Os dados categóricos foram calculados e analisados usando o teste de Fisher com Qui-quadrado (n=91 no grupo Pilo e n=83 no grupo Pilo/Esplenec). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e  $p < 0,05$  foi considerado como estatisticamente significativo (\*).

## 8.2 Biodistribuição das CMMO

Na tabela 3, esta apresentada a localização das CMMO após 12 e 24 horas do transplante. Após 12 horas do transplante as células EGFP<sup>+</sup> estavam presentes no cérebro de um animal do grupo Esplenec/CMMO, no baço de um animal do grupo Pilo/CMMO e no fígado e rins de um animal do grupo Pilo/Esplenec/CMMO. Após 24 horas do transplante, as células transplantadas foram encontradas no baço, rins e fígado do grupo Pilo/CMMO e no fígado e nos rins do grupo Pilo/ Esplenec/CMMO.

<b>A)</b>	Controles			SE /PILO
<b>Grupos</b>	Esplenec/ CMMO	CMMO	Pilo/CMMO	Pilo/Esplenec/CMMO
<b>AMOSTRAS</b>	<b>12H</b>	<b>12H</b>	<b>12H</b>	<b>12H</b>
CÉREBRO	*	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>
PULMÃO	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>
BAÇO	<i>nd</i>	<i>nd</i>	*	<i>nd</i>
FIGADO	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	*
RINS	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	*

<b>B)</b>	Controles			SE /PILO
<b>Grupos</b>	Esplenec/CMMO	CMMO	Pilo/CMMO	Pilo/Esplenec/CMMO
<b>AMOSTRAS</b>	<b>24H</b>	<b>24H</b>	<b>24H</b>	<b>24H</b>
CÉREBRO	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>
PULMÃO	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>
BAÇO	<i>nd</i>	<i>nd</i>	*	<i>nd</i>
FIGADO	<i>nd</i>	<i>nd</i>	*	*
RINS	<i>nd</i>	<i>nd</i>	*	*

**Tabela 3:** Amostras foram obtidas de quatro animais por grupo e tempo (Esplenec 12h e 24h, CMMO 12h e 24h, Pilo 12h e 24h, Pilo/Esplenec 12h e 24h) para verificar a presença do gene EGFP<sup>+</sup> em diferentes órgãos (cérebro, pulmão, baço, fígado e rins) após o transplante de CMMO. Tempo de 12 horas está mostrado na tabela A) e 24 horas na tabela B). Nós detectamos a presença do gene em 1 dos 4 animais de cada grupo. Os órgãos onde não encontramos genes EGFP<sup>+</sup>, estão representados com o símbolo – que significa gene não detectado. O \* mostra em quais órgãos encontramos o gene EGFP<sup>+</sup>.

## 8.3 Fatores inflamatórios expressos no cérebro

Na figura 4 estão apresentados os gráficos da expressão gênica relativa dos fatores inflamatórios (IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , AIF-1 e IL-10). Após 12 horas, os níveis de IL1- $\beta$  no tecido

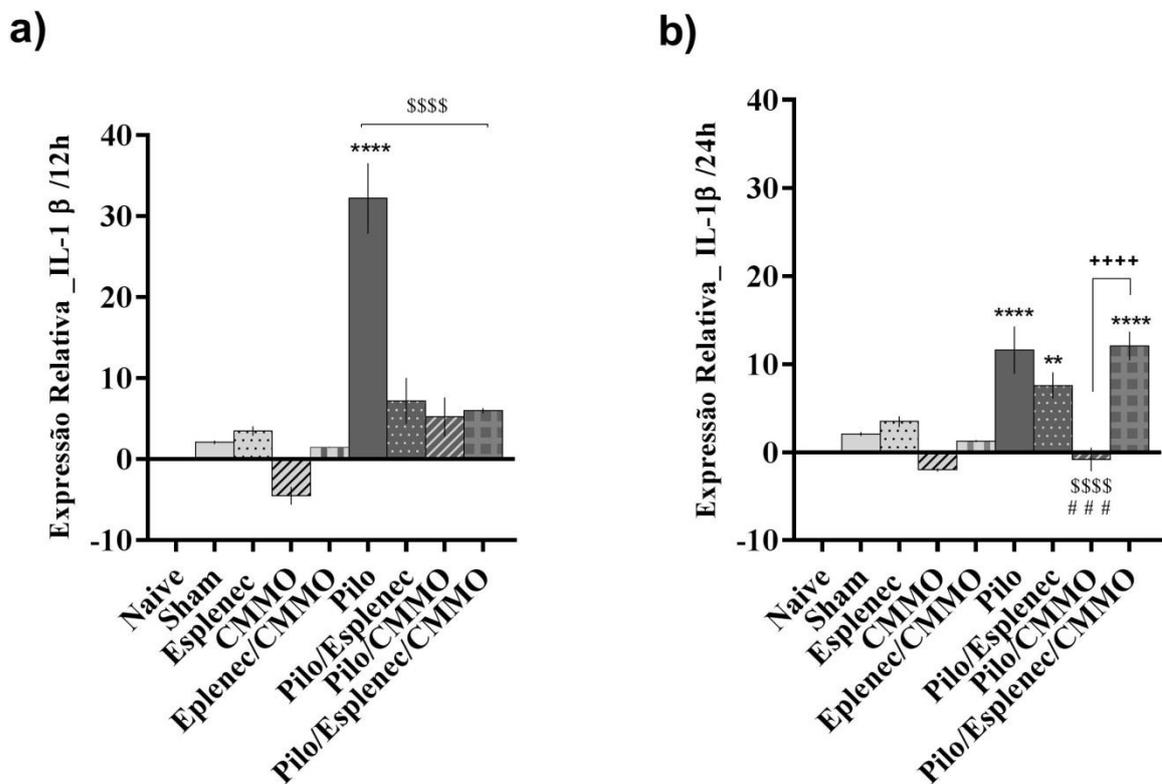
cerebral aumentaram significativamente no grupo Pilo quando comparado ao grupo Naive de  $p < 0,0001$ (\*\*\*\*). Os grupos Pilo/Esplenec, Pilo/CMMO e Pilo/Esplenec/CMMO apresentaram diferenças significativas quando comparado com o grupo Pilo de  $p < 0,0001$ (\$\$\$\$) (figura 4a). Após 24 horas, os níveis de IL-1 $\beta$  continuam aumentados no tecido cerebral grupo Pilo quando comparado com o grupo Naive com  $p < 0,0001$ (\*\*\*\*), aumento este que também foi observado entre Pilo/Esplenec/CMMO e Naive. O grupo Pilo/Esplenec apresentou aumento de expressão em relação ao Naive de  $p < 0,01$ (\*\*). O grupo Pilo/CMMO teve uma redução da expressão de IL-1 $\beta$  com diferença significativa quando comparado aos grupos Pilo/Esplenec/CMMO com  $p < 0,001$ (++++), quando comparado ao grupo Pilo de  $p < 0,0001$ (\$\$\$\$) e com o grupo Pilo/Esplenec de  $p < 0,001$  (###) (figura 4b).

Na figura 4c e 4d estão apresentados os gráficos com a expressão relativa do TNF- $\alpha$ . Após 12 horas, os grupos Pilo e Pilo/Esplenec/CMMO apresentaram um aumento significativo quando comparado com o grupo Naive  $p < 0,0001$ (\*\*\*\*). Quando comparados com o grupo Pilo, os grupos Pilo/Esplenec com  $p < 0,01$ (<sup>\$</sup>) e Pilo/CMMO com  $p < 0,05$ (<sup>\$</sup>) tiveram uma redução significativa na expressão de TNF- $\alpha$ . O grupo Pilo/Esplenec teve uma expressão menor de TNF- $\alpha$  em relação ao Pilo/Esplenec/CMMO e apresentaram uma diferença de  $p < 0,01$ (###) entre si. Pilo/CMMO expressou menos TNF- $\alpha$  em relação ao grupo Pilo/Esplenec/CMMO com  $p < 0,05$ (+).

Após 24 horas, o grupo Sham teve uma expressão menor do que o grupo Naive com  $p < 0,01$ (\*\*). O grupo Pilo apresentou aumento de expressão de TNF- $\alpha$  em comparação ao Naive com  $p < 0,01$ (\*\*) e Pilo/Esplenec apresentou aumento com  $p < 0,05$ (\*) e os grupos Pilo/CMMO e Pilo/Esplenec/CMMO aumento com  $p < 0,001$ (\*\*\*) em relação ao Naive. Na comparação entre os grupos somente Esplenec e Esplenec/CMMO apresentaram diferença de  $p < 0,01$ (<sup>xx</sup>). A figura 4e e 4f nos mostram a expressão gênica do marcador de microglia ativada (AIF-1), após 12 horas o grupo Pilo apresentou uma maior expressão gênica com  $p < 0,01$ (\*\*), em relação ao Naive. Comparando os grupos Pilo/CMMO com o Pilo encontramos um  $p < 0,0001$ (\$\$\$\$) e entre Pilo e Pilo/Esplenec/CMMO um  $p < 0,001$ (\$\$\$) comparados ao grupo Pilo/Esplenec temos respectivamente Pilo/CMMO com um  $p < 0,01$ (##) e Pilo/Esplenec/CMMO com  $p < 0,001$ (###). Na avaliação de 24 horas, 4f) o grupo Pilo/Esplenec/CMMO apresentou  $p < 0,0001$ (\*\*\*\*), em relação ao Naive. E Pilo um  $p < 0,05$ (\*) também em relação ao Naive. Na comparação entre os grupos Pilo/Esplenec e Pilo/CMMO mostram uma diferença de  $p < 0,05$  (+) entre o grupo Pilo/Esplenec/CMMO.

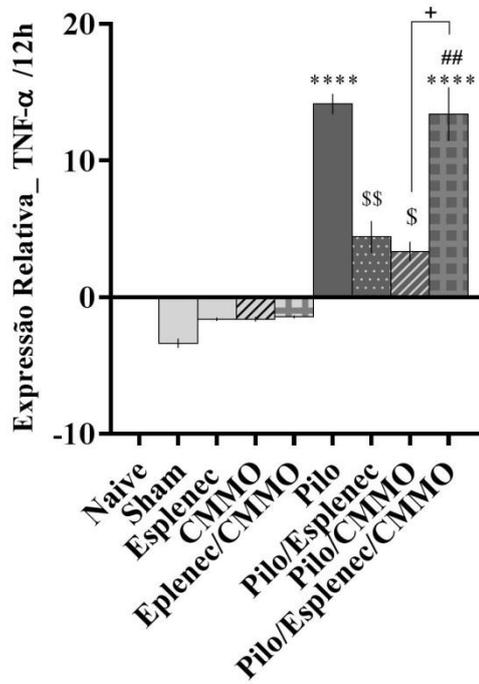
Na figura 4g e 4h estão apresentados os gráficos com expressão gênica de IL-10. Após 12 horas, a expressão da IL-10 estava aumentada nos grupos Pilo/Esplenec  $p < 0,0001$ (\*\*\*\*),

Pilo/CMMO  $p < 0,01 (**)$ , e Pilo/Esplenec/CMMO  $p < 0,05 (*)$  em comparação ao Naive. Na comparação entre os grupos, Pilo/Esplenec  $p < 0,001 (***)$ , Pilo/CMMO e Pilo/Esplenec/CMMO  $p < 0,05 (^{\delta})$  apresentaram aumento de expressão quando comparados com o Pilo. O grupo Pilo/Esplenec expressou mais IL-10 quando comparado ao Pilo/Esplenec/CMMO e mostraram uma diferença de  $p < 0,05 (^{\#})$  entre si, Figura 4g). Após 24 horas, a expressão de IL-10 não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos (Figura 4 h). A média destes dados estão representadas em um gráfico em radar na figura 5 onde podemos observar os dados de maneira mais ampla.

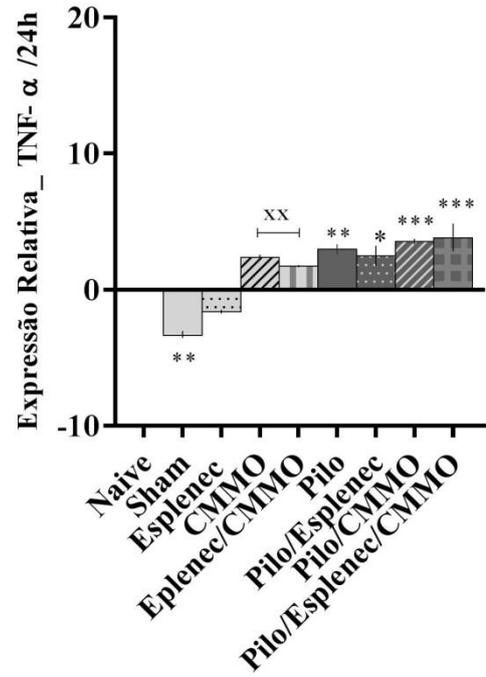


**Figura 4:** Expressão relativa dos genes por qRT-PCR no cérebro de ratos Wistar em 12 horas ou 24 horas após o transplante de CMMO. **a)** Expressão de IL-1 $\beta$  em 12h. **b)** Expressão de IL-1 $\beta$  em 24 horas.

c)

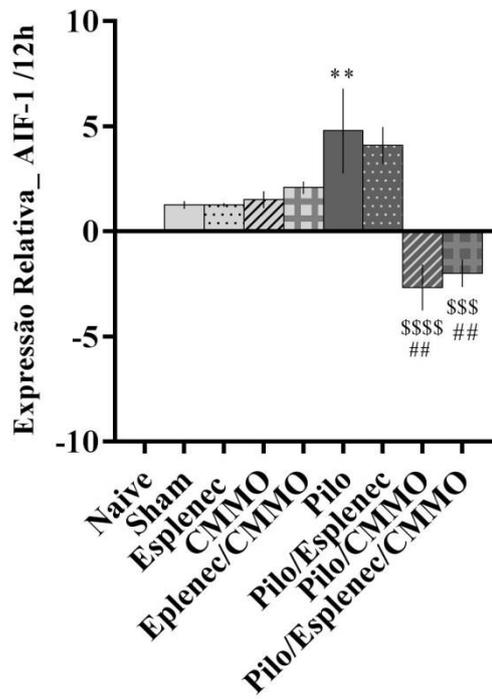


d)

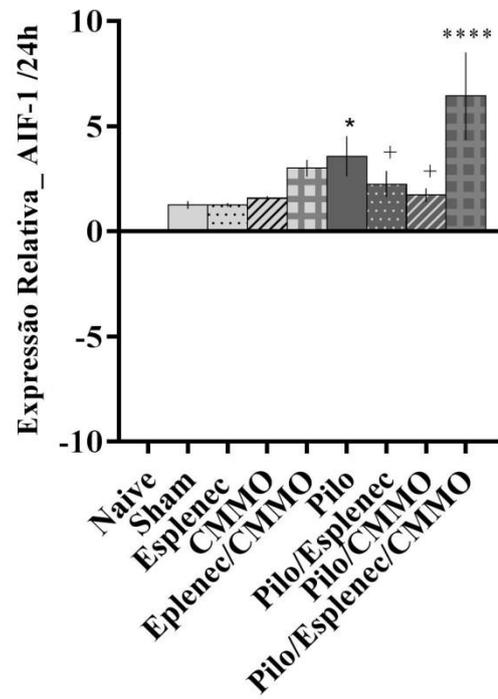


c) Expressão gênica de TNF- $\alpha$  em 12h horas. d) Expressão de TNF- $\alpha$  em 24h.

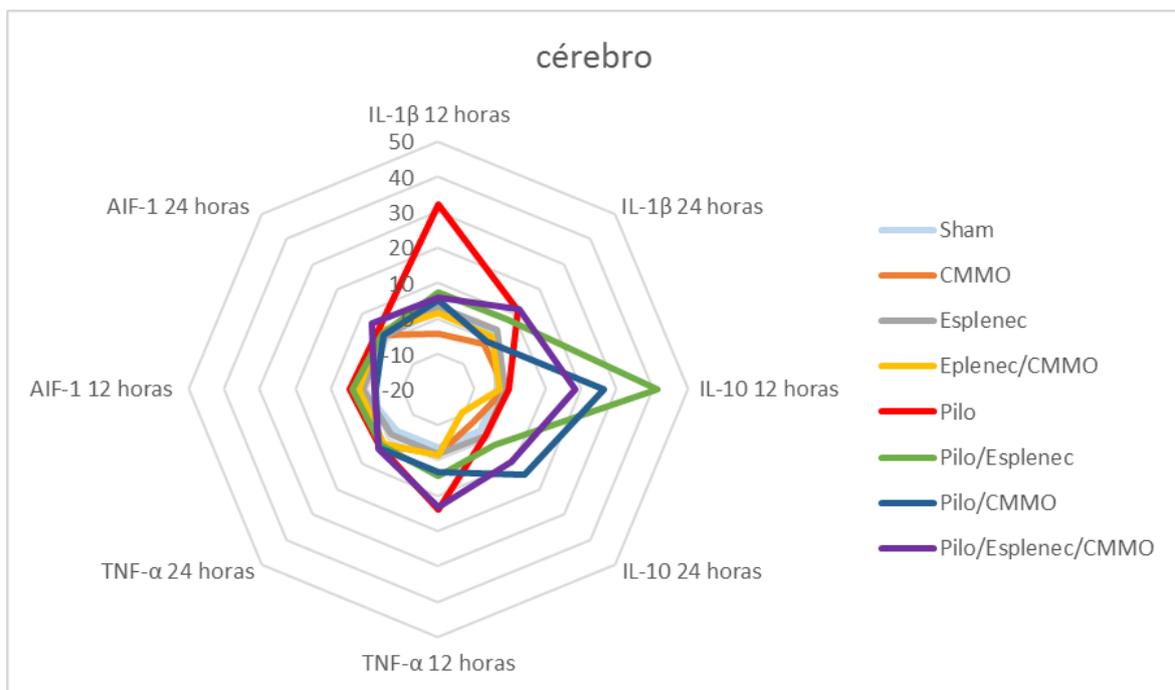
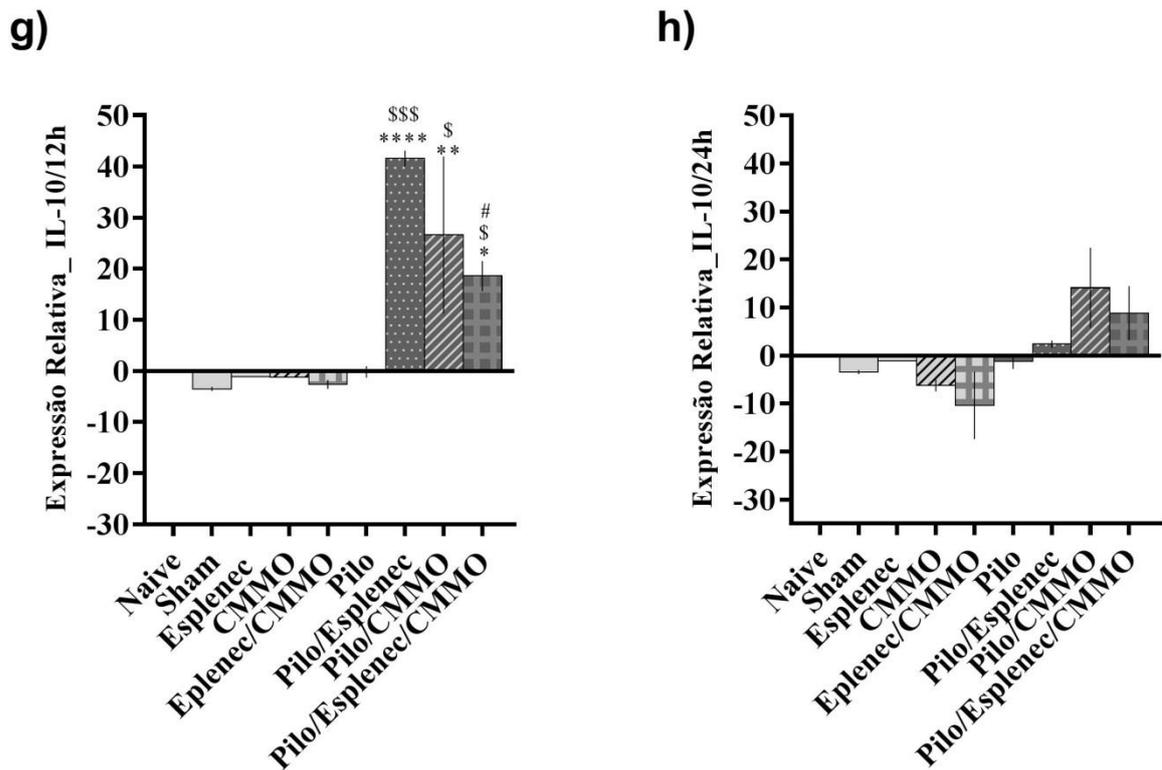
e)



f)



e) Expressão de AIF-1 após 12 horas do transplante das CMMO. f) Expressão de AIF-1 24 horas após o transplante de CMMO.



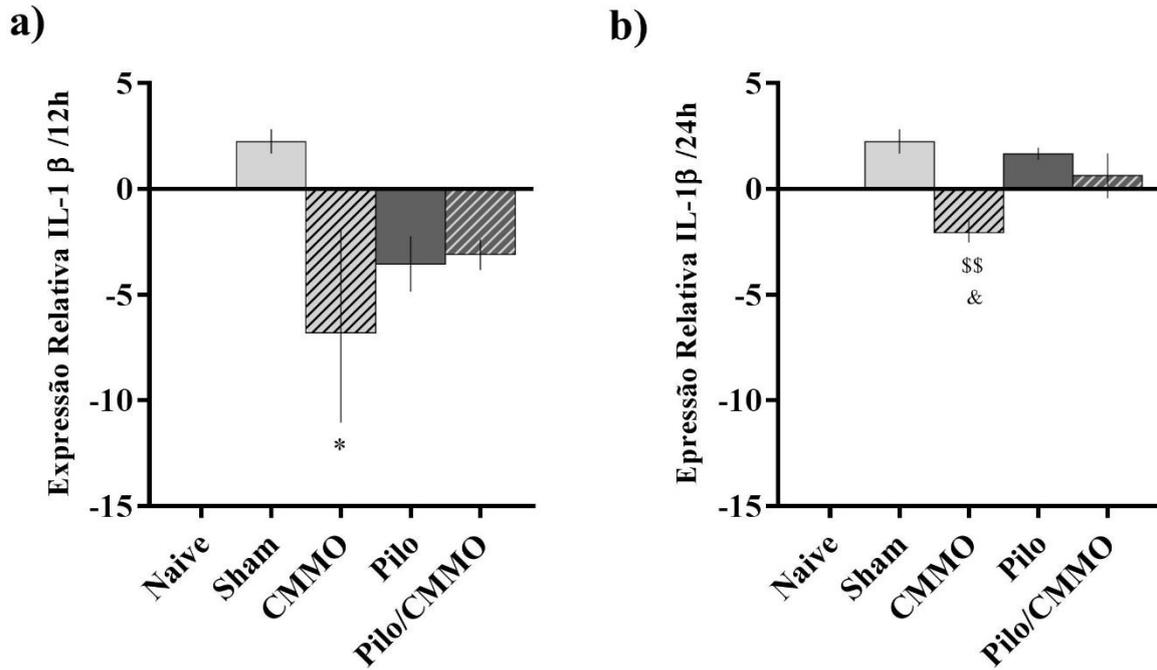
**Figura 5.** O gráfico em radar representa a média dos grupos, nos dados de expressão gênica por qRT-PCR no cérebro de ratos Wistar em 12 horas ou 24 horas após o transplante de CMMO.

## 8.4 Fatores inflamatórios expressos no baço

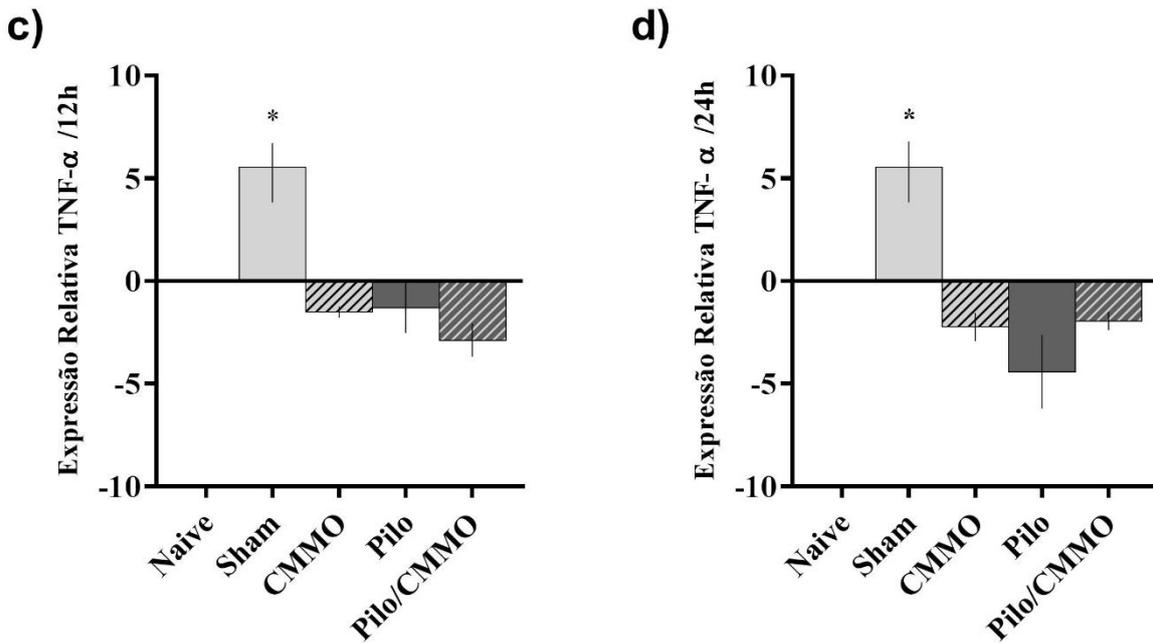
Na figura 6, estão apresentados os gráficos a e b com a expressão gênica relativa da citocina IL1- $\beta$  no baço dos ratos. Após 12 horas, a expressão da IL1- $\beta$  foi significativamente reduzida no grupo CMMO em comparação com o ao grupo Naive ( $p < 0,05^*$ ) (Figura 6 a). Após 24 horas, a expressão da IL1- $\beta$  foi significativamente diminuída no grupo CMMO em comparação com os grupos Pilo ( $^{\$}p < 0,01$ ) e Pilo/CMMO ( $^*p < 0,05$ ) (Figura 6 b). Nos gráficos c e d com expressão gênica relativa da citocina TNF- $\alpha$  no baço de ratos. Após 12 e 24 horas, somente o grupo Sham apresentou aumento significativo da expressão do TNF $\alpha$  quando comparado ao grupo Naive com  $p < 0,05^*$ .

Nas figuras 6e e 6d, estão apresentados os gráficos com a expressão gênica relativa do AIF-1 no baço de ratos. Após 12 horas, a expressão do AIF-1 estava significativamente aumentada no grupo Pilo quando comparado ao Naive  $^{**}p < 0,01$ . Os grupos Sham, CMMO, Pilo/CMMO apresentaram uma redução na expressão de AIF-1 com um  $^*p < 0,05$  em relação ao Naive (Figura 6e). Após 24 horas na figura 6f, as expressões de AIF-1 no baço foram menores estatisticamente em relação ao grupo Naive, no grupo Sham com  $p < 0,001(***)$ , Pilo com  $p < 0,05(^*)$  e Pilo/CMMO com  $p < 0,01(^{**})$ .

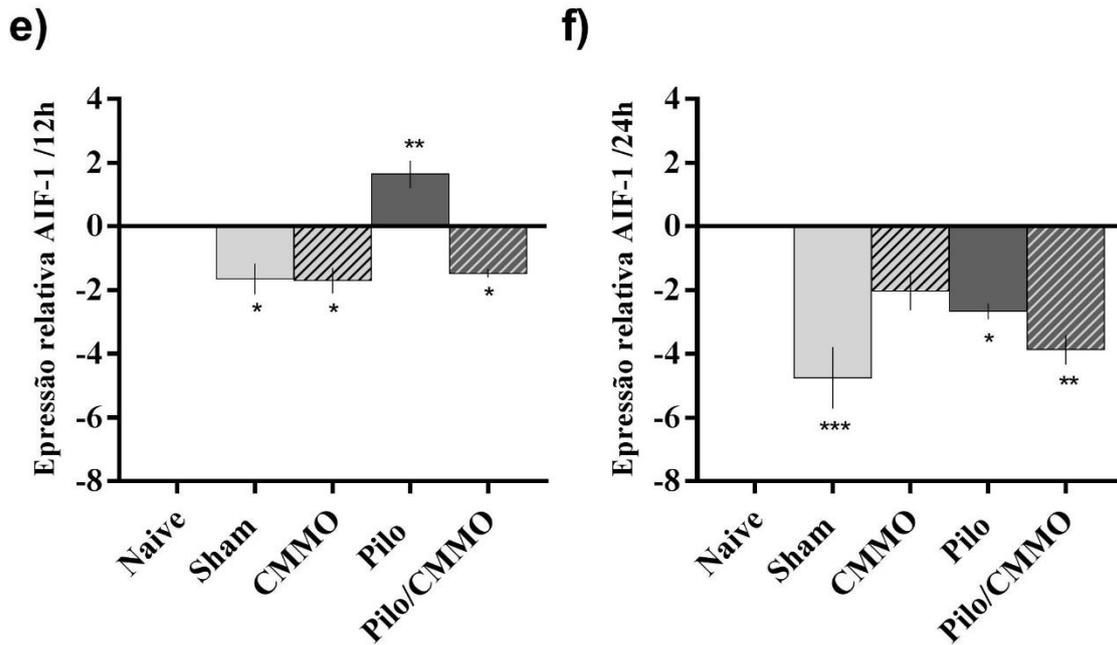
Na figura 6g e 6h com a expressão gênica relativa da IL-10 no baço de ratos que não foram esplenectomizados. Após 12 horas, não foram detectadas variações significativas da expressão de IL-10 entre os grupos (Figura 6g). Após 24 horas, a expressão da IL-10 estava aumentada no grupo Pilo quando comparado com o grupo Naive  $p < 0,001(***)$ . Na comparação entre os grupos o grupo Pilo apresenta aumento significativo de  $p < 0,05(^{\$})$  em relação ao grupo CMMO e  $p < 0,001(^{\$\$\$})$ , quando comparado ao grupo Pilo/CMMO. Na figura 7 os dados foram reunidos em um gráfico em radar usando a média dos grupos.



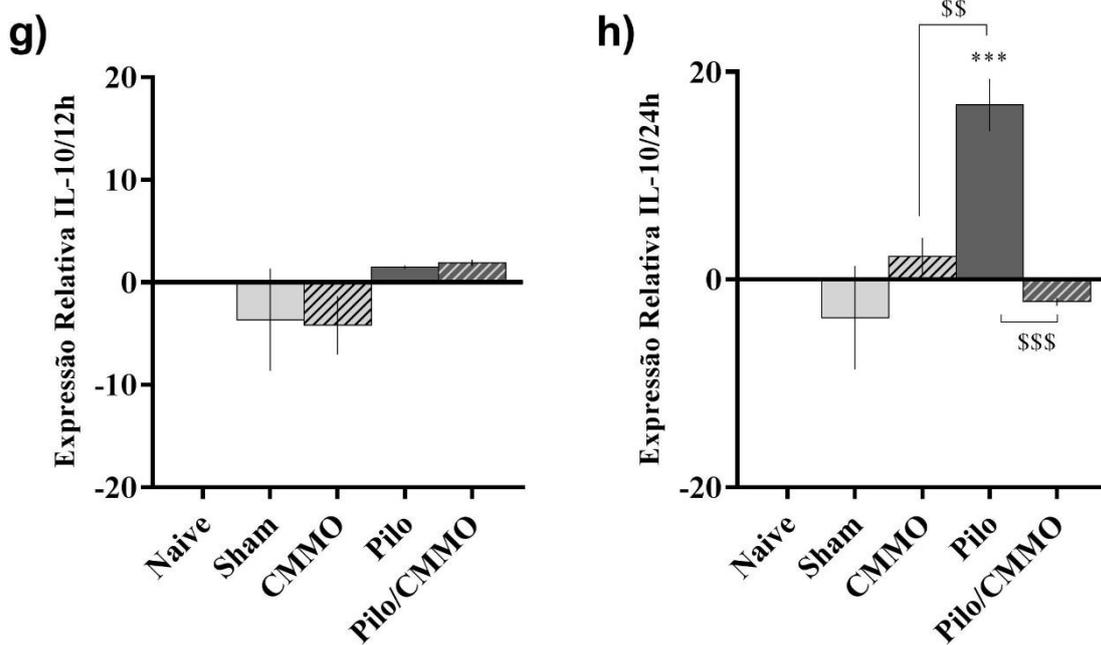
**Figura 6:** Expressão relativa dos genes por qRT-PCR no baço de ratos Wistar em 12 horas ou 24 horas após o transplante de CMMO. **a)** Expressão de IL-1 $\beta$  em 12h. **b)** Expressão de IL-1 $\beta$  em 24 horas.



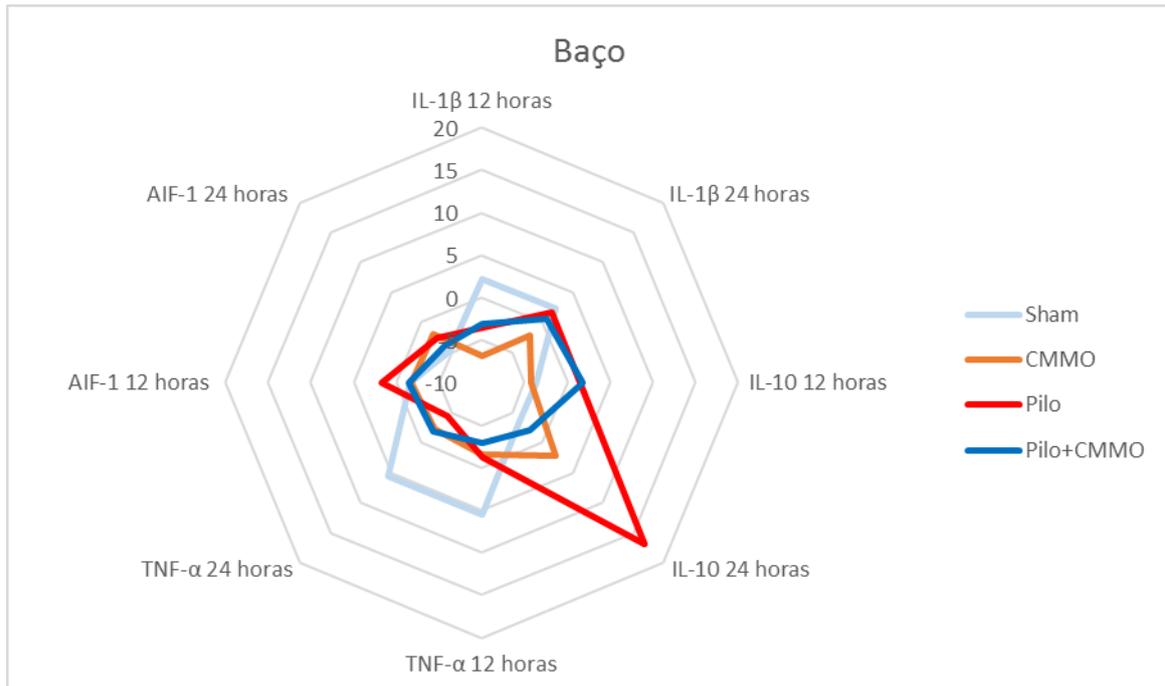
**c)** Expressão gênica de TNF- $\alpha$  em 12h horas. **d)** Expressão de TNF- $\alpha$  em 24h.



e) Expressão de AIF-1 em 12h. f) Expressão de AIF-1 em 24 horas.



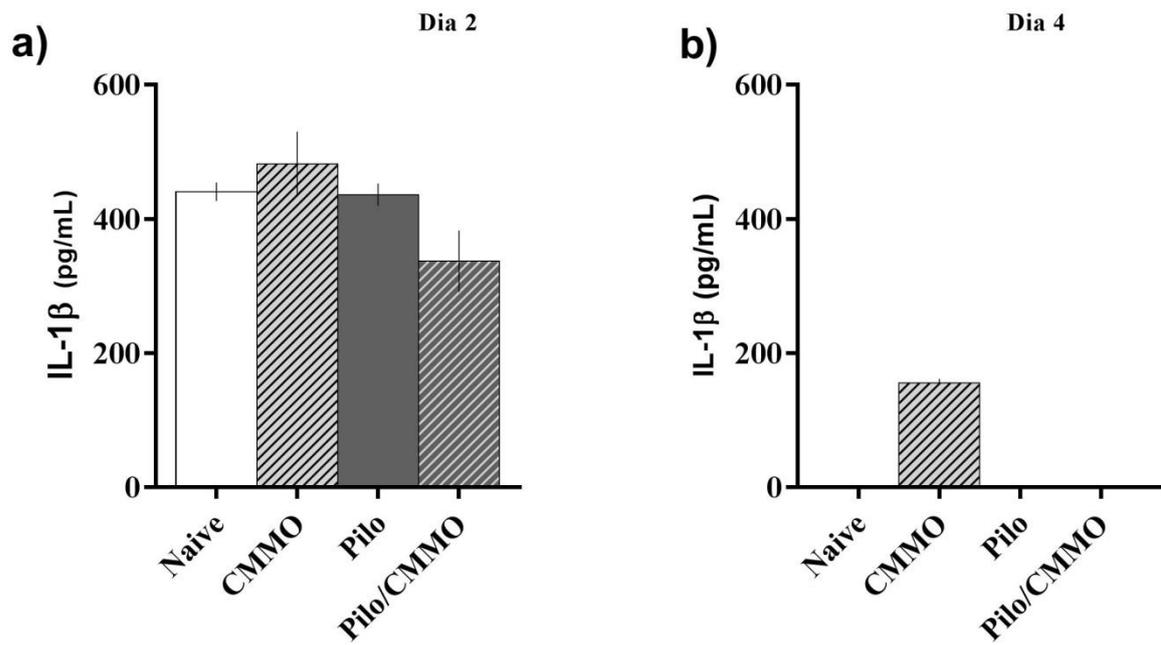
g) Expressão de IL-10, após 12 horas. h) Expressão de IL-10, após 24 horas. Os dados representam a média  $\pm$  SEM, foi realizado o teste de ANOVA de uma via seguido com pós-teste de Tukey. Com um intervalo de confiança de 95% e n=4. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, vs. Naive, \$\$p<0,01, \$\$\$p<0,001 vs. Pilo. &p<0,05 vs. Pilo/CMMO.



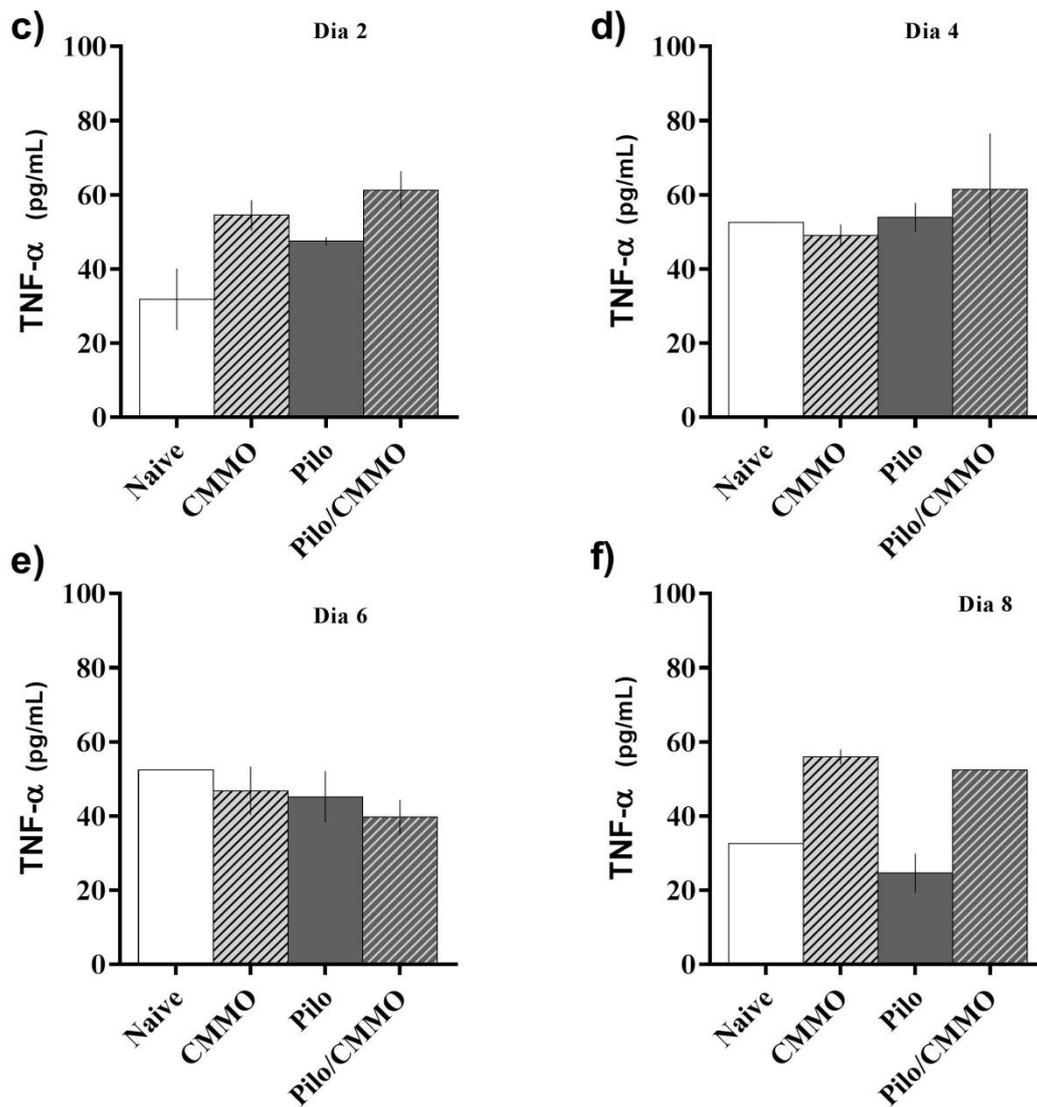
**Figura 7.** O gráfico em radar representa a média dos grupos, nos dados de expressão gênica por qRT-PCR no baço de ratos Wistar em 12 horas ou 24 horas após o transplante de CMMO.

## 8.5 Cultura de macrófagos

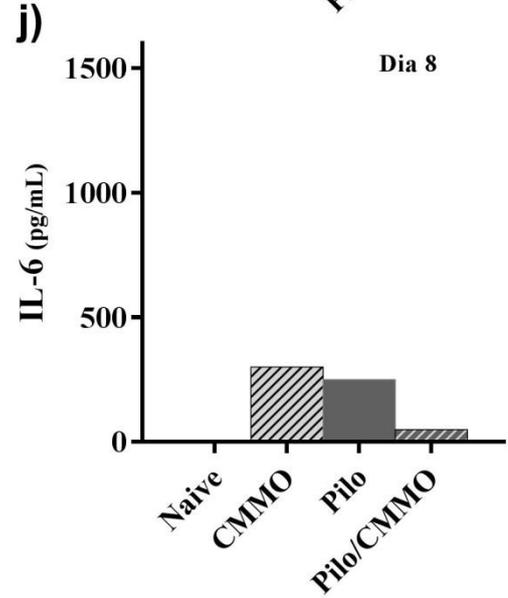
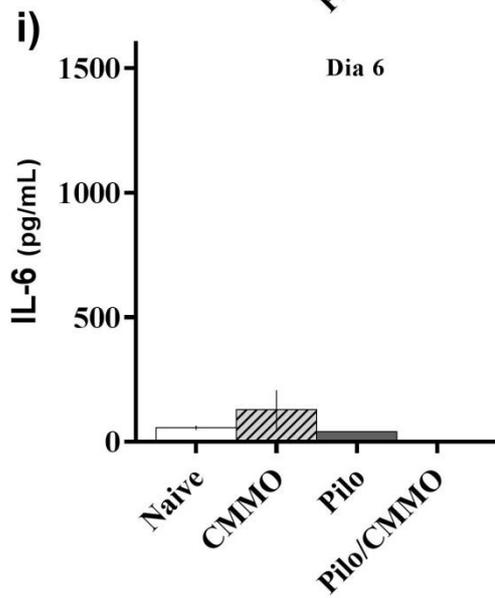
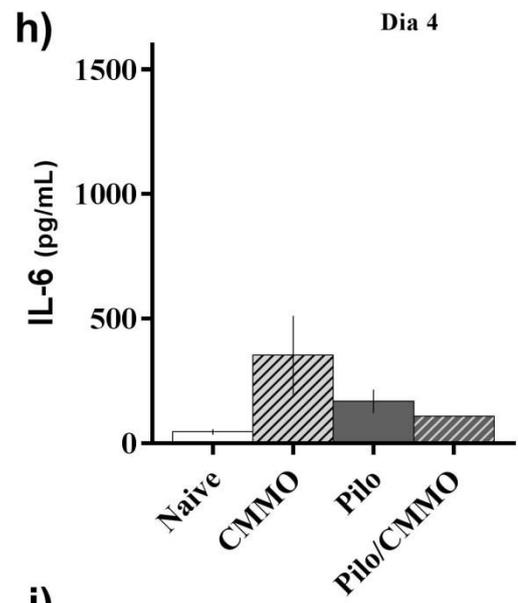
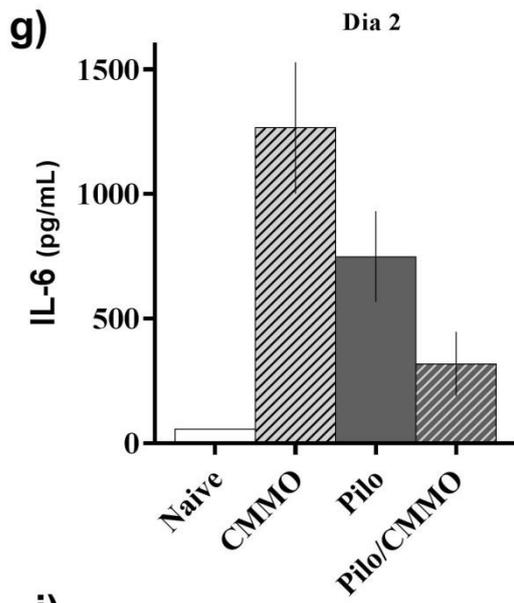
Na figura 8, está apresentado o gráfico com a quantificação das citocinas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10) presentes nos sobrenadantes da cultura de macrófagos esplênicos. As análises não mostraram diferenças estatísticas significativas entre os grupos analisados ( $p > 0.05$ ). No gráfico, em 8a) e 8b) demonstramos quantificação da IL-1 $\beta$  no sobrenadante da cultura celular, nos dias 2 e 4, primeira e segunda coleta analisadas. A quantificação do IL-1 $\beta$  nos dias 6 e 8, terceira e na quarta coleta foram indeterminados (dados não mostrados). Na figura 8c, 8d, 8e, e 8f os gráficos mostram a quantificação da TNF- $\alpha$  no sobrenadante das quatro coletas avaliadas. Na figura 8h, 8i, 8j e 8l mostram a quantificação da IL-6 no sobrenadante da cultura nas quatro coletas. Na figura 8m, 8n, 8o e 8p os gráficos mostram a quantificação da IL-10 nos quatro tempos de coletas do sobrenadante.



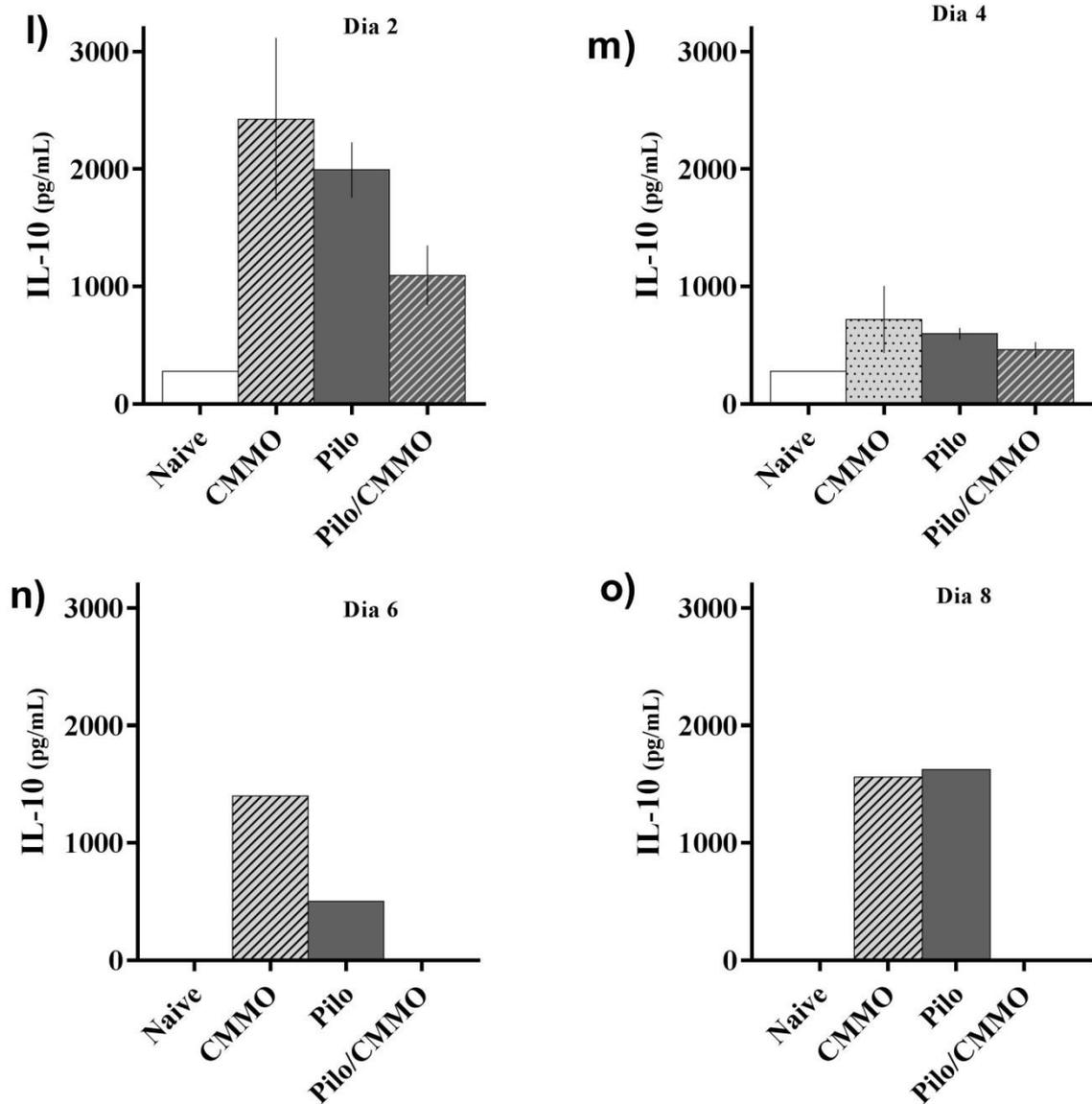
**Figura 8:** Níveis de citocinas no sobrenadante de cultura de macrófagos esplênicos. a) Nível de IL-1 $\beta$  na coleta de sobrenadante do dia 2. b) Nível de IL-1 $\beta$  na coleta de sobrenadante do dia 4. Níveis de IL-1 $\beta$  na terceira e quarta coleta de sobrenadante (dias 6 e 8) foram indeterminados em todos os grupos.



c) Nível de TNF- $\alpha$  na coleta de sobrenadante do dia 2. d) Nível de TNF- $\alpha$  na coleta de sobrenadante do dia 4. e) Níveis de TNF- $\alpha$  na coleta de sobrenadante da cultura do dia 6. f) Nível de TNF- $\alpha$  na coleta de sobrenadante do dia 8.



g) Nível de IL-6 na coleta de sobrenadante do dia 2. h) Nível de IL-6 na coleta de sobrenadante do dia 4. i) Níveis de IL-6 na coleta de sobrenadante do dia 6. j) Nível de IL-6 na coleta de sobrenadante do dia 8.

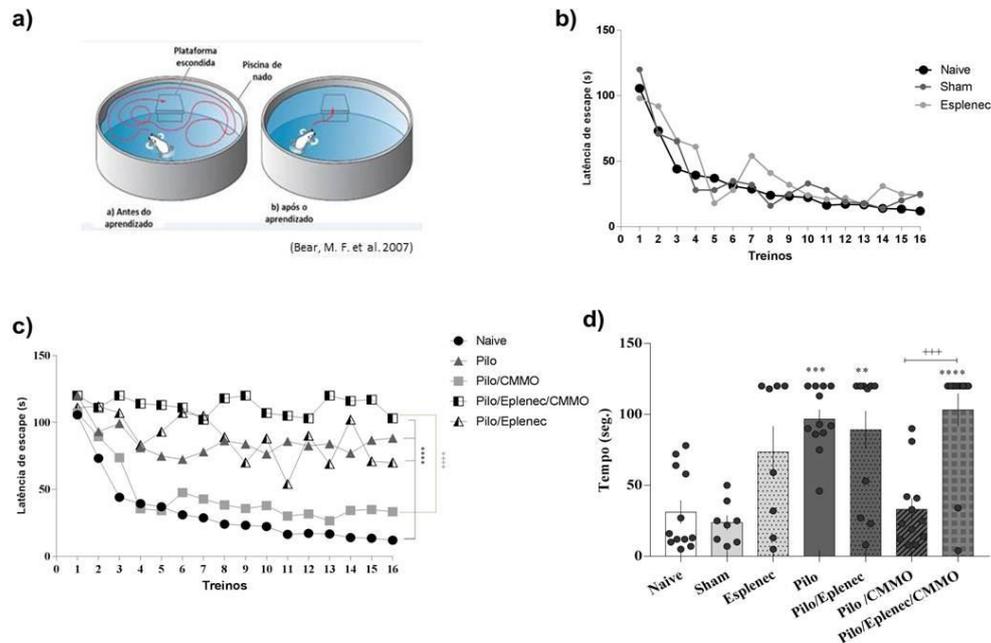


m) Nível de IL-10 na coleta de sobrenadante do dia 2. n) Nível de IL-10 na coleta de sobrenadante do dia 4. o) Níveis de IL-10 na coleta de sobrenadante da cultura do dia 6. p) Nível de IL-10 na coleta de sobrenadante do dia 8. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. Um  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Os dados estão representados como média  $\pm$  SEM.

## 8.6 A memória espacial em ratos

A figura 9 demonstra a avaliação da memória de referência espacial através do teste do labirinto aquático de Morris (figura 9 a) o treino revelou que os animais dos grupos Naive, Sham e Esplenec, apresentaram o melhor desempenho dentre todos os grupos no treino de aprendizagem e não apresentam diferenças entre si (Figura 9b). Os grupos Pilo, Pilo/Esplenec e o grupo Pilo/Esplenec/CMMO apresentaram prejuízo no desempenho das tarefas de

aprendizagem e consolidação da memória espacial. Entretanto, o grupo Pilo/CMMO teve o seu empenho semelhante aos animais do grupo controle (Figura 9c). Por sua vez, os animais do grupo Pilo/CMMO apresentaram melhor desempenho no treino (Figura 9c) e no teste (Figura 9d) que os animais do grupo Pilo/Esplenec/CMMO ( $p < 0,0001$ ).



**Figura 9:** Latência de escape até a plataforma após 16 treinos de largada. **a)** Desenho esquemático com o teste do LAM. **b)** e **c)** Curva de aprendizado mostra a média, em segundos da latência para encontrar a plataforma submersa durante o treino da tarefa,  $n=8-12$ . **b)** Entre os controles, Naive, Sham e esplenectomia não houve diferença significativa. **c)** Os grupos Pilo, Pilo/Esplenec e Pilo/Esplenec/CMMO apresentaram diferença quando comparados ao Naive ( $p < 0,0001$ ) representado por \*. O grupo Pilo/CMMO quando comparado ao grupo Pilo/Esplenec/CMMO apresentou diferença com  $p < 0,0001$  representado por +. **d)** Após 24 horas do treino a plataforma submersa foi retirada e o teste com duração de 60 segundos foi realizado avaliando a latência de escape até o local da plataforma. Os grupos Pilo, Pilo/Esplenec e Pilo/Esplenec/CMMO apresentaram  $p < 0,0001$  quando comparados ao Naive, representado por \*. O grupo Pilo/CMMO quando comparado ao grupo Pilo/Esplenec/CMMO apresentou diferença com  $p < 0,0001$ ) representado por +. Os dados foram analisados com ANOVA de uma via e pós-teste de Dunnett usando média  $\pm$ SEM e intervalo de confiança de 95%.

## 9 Discussão

No presente estudo, avaliamos a eficácia e a biodistribuição do transplante de CMMO em animais com o baço e sem o baço, submetidos ao protocolo de indução de SE com pilocarpina. A biodistribuição das CMMO EGFP<sup>+</sup> dos doadores foi avaliada conforme descrito por Marinowic e colaboradores, (Marinowic, Da Silva et al. 2016) através de qRT-PCR. Foi possível detectar as células EGFP<sup>+</sup> no cérebro, baço, fígado e rim de animais com o baço tratados com as CMMO e no fígado e rim de animais tratados sem o baço, estes dados estão de acordo com Costa-ferro (Costa-Ferro, Souza et al. 2012), Lee (Lee, Chu et al. 2007) e Walker (Walker, Shah et al. 2010).

Interessantemente, nos animais esplenectomizados com SE foi observada redução significativa na expressão de citocinas no tecido cerebral assemelhando-se com os animais com o baço tratados com CMMO. Entretanto a esplenectomia ao contrário do transplante de CMMO não impediu o efeito deletério do SE na memória espacial. Cabe discutir se houve diferenças quanto ao SE em animais com e sem o baço que influenciaram este resultado. Foi visto que a esplenectomia não influenciou significativamente a latência para a primeira crise, e no número de crises que os animais apresentaram no período de observação do SE. Entretanto, a porcentagem de animais que entraram em SE e taxa de mortalidade foi menor nos animais esplenectomizados quando comparados aos não esplenectomizados. Dados semelhantes aos nossos foram encontrados por Marchi et al., 2011 (Marchi, Johnson et al. 2011). Estes achados sugerem que a redução da mortalidade pós-SE em animais esplenectomizados pode estar relacionada a fatores cardiorrespiratórios, pois em geral estes animais morrem após apneia seguida de parada cardíaca. Hipotetizamos que a retirada do baço interrompeu a alça parassimpática do eixo vago-esplênico-gânglio celíaco como demonstrado por Rasouli e colegas (2011) reduzindo o risco de apneia e bradicardia parassimpática induzida pelo baço.

A constatação de maior expressão de citocinas no tecido cerebral dos animais pós-SE esplenectomizados e tratados com CMMO nos remete a relação SE, inflamação, CMMO e baço. Ainda, sabe-se, que as citocinas pró-inflamatórias são marcadores da atividade inflamatória, por estarem participando diretamente deste processo, sendo o TNF- $\alpha$  uma das mais expressivas. TNF- $\alpha$  é produzida principalmente por macrófagos, e possui um papel importante na fase aguda da inflamação amplificando a resposta inflamatória. Sua expressão é reduzida no decorrer de poucos dias e é alvo direto da via anti-inflamatória. A IL-1 $\beta$  é também uma citocina de fase

aguda, mas presente em toda a fase inflamatória, secretada principalmente por monócitos e macrófagos (Vezzani, Balosso et al. 2012).

No modelo experimental de epilepsia, foi demonstrado que a IL-1 $\beta$  aumentou sua expressão rapidamente em microglias e em astrócitos durante as convulsões. Da mesma forma, o TNF- $\alpha$  e a IL-6 aumentaram de forma transitória nas células gliais (Ravizza, Boer et al. 2006, Costa-Ferro, de Borba Cunha et al. 2014). Como visto anteriormente em modelos experimentais de epilepsia, o aumento dos níveis da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$ , através das células microgliais ativadas (de Jager, Bourcier et al. 2009, Costa-Ferro, Souza et al. 2012, Leal, Costa-Ferro et al. 2014). Outros relatos mostraram que os mediadores inflamatórios estão elevados no cérebro logo após SE, incluindo o TNF $\alpha$  (Ravizza, Gagliardi et al. 2008, Costa-Ferro, de Borba Cunha et al. 2014, Leal, Costa-Ferro et al. 2014).

Quanto ao papel do baço na inflamação sabe-se que o baço pode iniciar respostas imunes a partir do reconhecimento do processo inflamatório estéril, o baço ativa receptores de reconhecimento padrão (PRRs) nas células mielóides, que, por sua vez, induzem a ativação das células T apresentadoras de antígenos (APCs), secreção de citocinas e fagócitos (Den Haan and Kraal 2012). No baço, existem múltiplos subconjuntos de macrófagos (Den Haan and Kraal 2012). Os macrófagos são fagócitos residentes nos tecidos que mantêm a homeostase removendo os detritos celulares e regulando a função das células vizinhas, mas, durante um dano tecidual, podem responder com respostas inflamatórias de citocinas que ativam outros leucócitos. Assim como, os monócitos estão presentes no baço e podem se diferenciar em múltiplos subconjuntos mielóides especializados (Geissmann, Manz et al. 2010) e também podem produzir fatores imunossupressores, como o fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e IL-10 (Bronte and Pittet 2013).

Durante uma resposta inflamatória, ocorre recrutamento de monócitos da medula óssea para o baço. Lá, eles podem se diferenciar em múltiplos tipos de células mielóides, incluindo certos tipos de células dendríticas (CDs) e macrófagos não convencionais (León, López-Bravo et al. 2007). O baço também atua como um reservatório de monócitos indiferenciados que podem ser mobilizados para outros órgãos sob condições inflamatórias que podem aumentar os monócitos liberados da medula óssea (Bronte and Pittet 2013). Sabe-se que células imunes circulantes entram e saem do baço em repouso e durante uma doença, estas células circulantes podem recrutar células adicionais para o baço (Bronte and Pittet 2013). A estrutura anatômica do baço é naturalmente adequada para regular as respostas aos antígenos transmitidos pelo sangue. Muitas vezes essa característica filtradora é vista como uma limitação para o fornecimento de medicamentos, pois muitas nanopartículas de fármacos são retidas no baço.

Por outro lado, essa característica pode representar oportunidade de atingir terapêuticamente esplenócitos (Bronte and Pittet 2013). Estudos farmacodinâmicos mostram que o baço pode ser um importante órgão para auxiliar em tratamentos, podendo alguns tratamentos e terapias celulares servirem como um “cavalo de Troia” (Bronte and Pittet 2013).

Em estudos prévios no nosso laboratório (Costa-Ferro, Souza et al. 2012, Leal, Costa-Ferro et al. 2014, Zanirati, Azevedo et al. 2015), foram analisados os perfis inflamatórios e anti-inflamatórios de ratos submetidos ao modelo de pilocarpina. Os dados mostraram que o tratamento com as CMMO reduziu os níveis dos genes de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 no tecido cerebral de animais submetidos ao SE (fase aguda) e em animais epiléticos (fase crônica). No entanto, a expressão do mRNA do gene das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 foi significativamente aumentado após transplante das CMMO (Leal et al., 2014) e a expressão do mRNA do gene da IL-10 aumentou no tecido cerebral dos ratos na fase aguda e crônica (Leal et al., 2014, Costa-Ferro et al., 2012).

Concentramos o nosso estudo nas citocinas pró- (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) e anti-inflamatória (IL-10). Nossos dados mostram uma redução significativa na expressão da IL-1 $\beta$  no tecido cerebral dos animais esplenectomizados e não esplenectomizados submetidos ao SE e transplantados com as CMMO quando comparado com os dados do grupo controle após 12 horas do transplante. Interessantemente, nos animais esplenectomizados e submetidos ao SE, a esplenectomia também reduziu os níveis da citocina IL-1 $\beta$  após 12 horas do SE. Entretanto, após 24 horas do transplante das CMMO apenas os animais do grupo submetidos ao SE tiveram a expressão da IL-1 $\beta$  diminuída, mostrando assim o efeito agudo do tratamento. O tratamento com as CMMO diminuiu significativamente os níveis da TNF- $\alpha$  no tecido cerebral dos animais não esplenectomizados submetidos ao SE quando comparado com os dados dos grupos Naive e Pilo após 12 horas do transplante. Assim como, os animais esplenectomizados e submetidos ao SE, também apresentaram uma redução significativa nos níveis TNF- $\alpha$  quando comparado com o grupo Pilo. Neste contexto, os dados mostraram um aumento significativo das citocinas IL-1 $\beta$  após 24 horas e TNF- $\alpha$  após 12 e 24 horas do transplante das CMMO nos animais esplenectomizados submetidos ao SE, sugerindo que a presença do baço é fundamental para o efeito das CMMO. Por outro lado, nossos dados mostram que a esplenectomia, por si só, também reduziu a inflamação. Interessantemente, esse papel “protetor” da esplenectomia, indica que existe uma interação entre os fatores tróficos, a produção das citocinas periféricas e a produção das citocinas no tecido cerebral.

Ao mesmo tempo, no nosso estudo, a expressão de IL-10 foi maior no tecido cerebral dos grupos esplenectomizados (com e sem o tratamento das CMMO) e no grupo Pilo tratado

com CMMO comparado com os outros grupos, após 12 horas do SE. Após 24 horas, embora não tenha havido diferença estatística, a expressão da IL-10 foi maior no grupo Pilo tratado com as CMMO. Demonstrando assim, o papel protetor do tratamento das CMMO e, corroborando com resultados de outros estudos que previamente demonstraram que a IL-10 tem um efeito anticonvulsivo em pacientes neonatais ao suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias (Youn, Kim et al. 2012), assim como, o efeito neuroprotetor e antiepiléptico na epilepsia induzida por pilocarpina em ratos (Costa-Ferro et al, 2012, Leal et al., 2014). Essa interleucina é uma potente citocina anti-inflamatória que pode reduzir as respostas inflamatórias sistêmicas suprimindo monócitos/macrófagos e respostas derivadas de célula T, reduzindo a síntese de outras citosinas e moléculas de adesão celular. Tem-se relatado que CMMO têm efeitos imunomoduladores aumentando a expressão de IL-10 no modelo de infarto cerebral em ratos (Liu, Zhuge et al. 2009, Brenneman, Sharma et al. 2010) e no modelo experimental da epilepsia (Costa-Ferro et al, 2012; Leal et al., 2014). Outros estudos têm sugerido que CMMO podem liberar fatores tróficos e citocinas que estão envolvidas no reparo e regeneração do tecido cerebral lesado (Vezzani et al., 2011, Costa-ferro et al., 2012, de Freitas et al., 2012).

Os níveis da IL-1- $\beta$  e TNF- $\alpha$  no baço foram reduzidos nos animais do grupo Pilo (com ou sem) tratamento com as CMMO, quando comparado com o grupo Naive. Também, o presente estudo mostrou maiores níveis de IL-10 no baço dos animais do grupo Pilo quando comparado com o grupo Naive, CMMO e Pilo/CMMO. Os altos níveis de IL-10 no grupo Pilo mostram que esta citocina exerce importante papel no processo inflamatório provocado pelas manifestações clínicas e fisiopatológicas da pilocarpina.

Um representante inflamatório “in situ” no cérebro é a microglia. As células da microglia são elementos de pequenas dimensões presentes no encéfalo e na medula espinhal e representam cerca de 5 a 20% de todos os elementos gliais (Graeber and Streit 2010, Saijo and Glass 2011) e são referidas como a população de macrófagos especializados do SNC. Dentre as células da glia, as microglias são as mais plásticas, capazes de alterar a morfologia no estágio de ativação (Graeber and Streit 2010). Em condições patológicas, a microglia é ativada por fatores de crescimento e por várias citocinas, como as interleucinas, e assim desempenham as suas funções inflamatórias e imunitárias (Graeber and Streit 2010, Saijo and Glass 2011, Yi, Xiao et al. 2011, Zhai, Heppner et al. 2011). Um dos marcadores mais usados na identificação da microglia é o *Ionized calcium-Binding Adaptor molecule-1* (IBA-1). IBA-1 é uma proteína codificante para o Allograft Inflammatory Factor-1 (AIF-1) (Del Bigio 2010). No nosso estudo, os resultados obtidos demonstraram que a expressão da microglia foi significativa no grupo Pilo após 12 e 24 horas de SE. O tratamento com as CMMO suprimiu esta expressão da AIF-1 no

tecido cerebral dos animais submetidos ao SE com ou sem baço, após 12 horas do SE. Também foi observado aumento significativo do AIF-1 nos macrófagos do baço dos animais submetidos ao SE, após 12 horas. Estes achados sugerem que a expressão de AIF-1 no cérebro é local e independente do baço.

Provavelmente esta relação baço- inflamação- cérebro podem estar relacionadas ao foco da lesão tecidual, visto que, Ajmo e colegas demonstraram que ratos esplenectomizados e submetidos ao modelo experimental de AVC apresentaram infarto cerebral menor (Ajmo Jr, Collier et al. 2009). Em 1908, Rous sugeriu que a linfocitose que ocorre após o protocolo de pilocarpina é devido a uma contração da musculatura lisa do baço que libera linfócitos e outras células e fatores inflamatórios na corrente sanguínea (Rous 1908). Por outro lado, a ativação simpática do sistema nervoso que resulta em uma contração esplênica e consequente liberação massiva de células imunes, pode contribuir para o dano cerebral após uma lesão de AVC (Stewart and McKenzie 2002, Ajmo Jr, Collier et al. 2009). Assim como, o baço tem a capacidade de mobilizar células precursoras, e assim “conversar” com outros órgãos do corpo, “enviando” suas células para órgãos não linfóides (Bronte and Pittet 2013). Essa massiva liberação de células inflamatórias pode ser positiva em alguns casos, como foi descrito por Swirski e colaboradores, onde a lesão miocárdica isquêmica aumentou a motilidade dos monócitos do reservatório esplênico e induziu uma saída maciça dessa população para a circulação. Neste caso, uma fração dos monócitos esplênicos contribuiu para a cicatrização da lesão (Swirski, Nahrendorf et al. 2009).

Isso nos remete a relação entre macrófagos e reparo tecidual onde os macrófagos contribuem de forma significativa para a defesa do organismo. De acordo com o estímulo (pró-inflamatório, metabólico ou imune), os macrófagos são recrutados das regiões periféricas para o local da lesão, onde contribuem para a defesa, remodelamento e reparo do tecido (Gordon and Taylor 2005). No presente estudo não encontramos diferenças na produção da IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 nos sobrenadantes dos grupos Naive, CMMO, Pilo e Pilo/CMMO. Os dados foram inconclusivos provavelmente porque o *n* dos animais controles na nossa amostra foi menor em relação ao *n* das amostras dos animais tratados, prejudicando a análise estatística entre os grupos.

É fundamental nos estudos com epilepsia induzida por pilocarpina onde há o comprometimento hipocampal que se avalie o impacto das intervenções na memória. Assim, na segunda parte deste estudo, nos investigamos a influência do baço e do tratamento das CMMO no aprendizado e consolidação da memória espacial nos animais submetidos ao SE por pilocarpina. Estudos anteriores relataram grave comprometimento da memória espacial

dependente de hipocampo em ratos tratados com pilocarpina, conforme avaliado no labirinto aquático de Morris (Niessen, Angenstein et al. 2005, Frisch, Kudin et al. 2007, Venturin, Greggio et al. 2011). Neste estudo, evidenciamos que a memória espacial dos animais que receberam pilocarpina, comparada aos grupos controles, foi prejudicada independentemente do baço quanto ao aprendizado e consolidação da memória. Entretanto, os animais do grupo Pilo tratado com as CMMO aprenderam a tarefa, fato que não ocorreu com os animais sem o baço. Nota-se também que embora a esplenectomia tenha apresentado uma papel anti-inflamatório na expressão de citocinas, este efeito não se traduziu no aprendizado e na consolidação da memória. Considerando que esses animais foram testados para memória espacial (aprendizagem e consolidação) após 10 dias do SE, isto sugere que a participação do baço no SE e seus mecanismos são insuficientes para evitar ou reduzir o curso natural da epileptogênese.

## **Capítulo II**

AVALIAR A IMPORTÂNCIA DO BAÇO NA EPILEPTOGÊNESE E NA  
RESPOSTA INFLAMATÓRIA NOS MODELOS DE EPILEPSIA DE PILOCARPINA E  
DE ÁCIDO CAÍNICO EM RATOS WISTAR

## 1 Hipótese

**H0** - Nossa hipótese é de que o baço não pode ser responsável pela modulação da resposta inflamatória após a lesão hipocampal no modelo experimental da epilepsia de pilocarpina e de ácido caínico.

**H1** - Nossa hipótese é de que o baço pode ser responsável pela modulação da resposta inflamatória após a lesão hipocampal no modelo experimental da epilepsia de pilocarpina e de ácido caínico.

Para saber se essa hipótese é válida, avaliamos a frequência de crises, expressão de fatores inflamatórios e memória de animais submetidos aos modelos experimentais de pilocarpina (PILO) e ácido caínico (KA) com e sem esplenectomia.

## 2 Objetivo

Relacionar a importância do baço na epileptogênese usando dois modelos de epilepsia do lobo temporal (pilocarpina e ácido caínico).

### 2.1 Objetivos específicos

Nos ratos esplenectomizados e submetidos ao SE por pilocarpina ou ácido caínico:

- a) Avaliar a frequência de crises através de vídeo monitoramento na fase crônica da epilepsia após a esplenectomia;
- b) Avaliar a presença das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e o marcador de microglia AIF-1, no hipocampo de animais através de qRT-PCR;
- c) Avaliar a memória de curta duração na fase crônica da epilepsia,
- d) Avaliar o comportamento depressivo na fase crônica da epilepsia.

### **3 Questões éticas**

Todos os experimentos foram realizados após a aprovação do Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da PUCRS, cujo número de aprovação do CEUA é 7839. O documento está anexado no final do texto.

### **4 Material e métodos**

O estudo foi realizado no Laboratório de Neurociências e Laboratório de Sinalização Celular do Instituto o cérebro do Rio Grande do Sul (InsCer) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), onde possuem todos os equipamentos necessários para a realização das técnicas utilizadas. Os experimentos com os animais serão realizados no prédio 14, Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CeMBE) localizado também na PUCRS.

#### **4.1 Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos (40-50 dias) para indução de epilepsia. Durante o experimento os animais foram mantidos no prédio 14 do CeMBE da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul sob iluminação e temperatura controlados (ciclo claro e escuro 12 horas e aproximadamente 24° C). Receberam água e ração à vontade. Foram utilizados noventa e seis ratos.

A determinação para o número de animais utilizados em todas as análises foi baseado em literatura científica de referência atual dentro das técnicas a serem estudadas e de acordo com a taxa de mortalidade do modelo da pilocarpina e ácido caínico (Venturin, Greggio et al. 2011, Lévesque and Avoli 2013). Assim, estabeleceu-se que um número de 5 animais por grupo para cada análise de RT-q-PCR (Li, Zhao et al. 2015). A eutanásia, dos animais para a obtenção de amostras foi realizada com o mínimo de dor, medo e angústia por método químico com o uso de Isoflurano por inalação para permitir uma punção cardíaca onde foi retirado também o soro dos animais a partir do sangue total, seguida do uso da guilhotina para decapitação e retirada do cérebro dos animais e posterior retirada de amostras dos órgãos. Os animais tratados, os experimentos e a eutanásia seguiram as diretrizes do CONCEA (CONCEA 2013) e DBCA

(Brasil 2013) Guide for Care and Use of Laboratory Animals from National Institutes of Health (Care, Animals et al. 1985).

## **4.2 Esplenectomia**

Os ratos foram anestesiados com Xilazina e Quetamina. A esplenectomia foi adaptada e realizada de acordo com a descrição feita por Ajmo et al. 2008 (Ajmo, Vernon et al. 2008, Marchi, Johnson et al. 2011). Realizamos uma incisão cerca de 2 cm da linha média dorsal no lado esquerdo da cavidade abdominal. Com uma pinça sem ponta e o baço foi exposto, e foi realizado uma ligadura nos vasos sanguíneos. O baço foi removido e armazenado em -80°C. Antes da sutura final a área foi cuidadosamente observada, para verificar se houve hemorragia ou outras complicações. Os animais foram observados, tratados com analgésico Acetaminofen (Damy, Camargo et al. 2010) (1-2mg/ml na água) nas primeiras horas após o procedimento.

## **4.3 Protocolo de pilocarpina**

Utilizamos o protocolo de indução de epilepsia pelo modelo experimental de pilocarpina conforme descrito por Cavalheiro (Cavalheiro, Leite et al. 1991). Primeiramente foi aplicada aos animais uma injeção intraperitoneal (i.p.) de metilescopolamina (antagonista colinérgico), na dose de 1 mg/kg, com o objetivo de minimizar os efeitos colinérgicos periféricos. Cerca de 30 minutos após, ocorreu a aplicação de PILO (i.p) na dose de 100 mg/kg a cada 30 minutos, com o número máximo de seis doses (Gröticke, Hoffmann et al. 2007). Após, os animais foram colocados em caixas de acrílico transparentes para a observação das manifestações comportamentais produzidas pela droga. Os animais foram observados e classificados de acordo com a Escala de Racine (figura 1) quanto às alterações comportamentais próprias do SE (Racine 1972). Apenas foram incluídos no trabalho os animais que entraram em SE classificados como Racine 4, Clônias das patas posteriores e 5, correspondente à elevação e queda. Noventa minutos após a instalação do SE, o animal recebeu 10 mg/kg de diazepam (i.p.) para atenuar as crises comportamentais. Nos próximos 5 dias os animais receberam tratamento com ração embebida em soro glicosado, por via oral e aplicação de soro e glicose por via subcutânea para reposição de nutrientes.

#### **4.4 Protocolo de Ácido Caínico**

Foi utilizado o protocolo de indução de epilepsia pelo modelo experimental de ácido Caínico, neste caso os animais receberam 5mg/kg de ácido caínico por via intraperitoneal a cada hora até que os animais entrassem em SE totalizando 15-30mg/kg de ácido caínico. As crises foram avaliadas e classificadas de acordo com a escala de Racine (figura 1). Foram consideradas crises 4, clônias das patas posteriores e 5, correspondente à elevação e queda e os animais que apresentaram pelo menos uma crise a cada hora (Hellier, Patrylo et al. 1998, Kubera, Budziszewska et al. 2001, Reddy and Kuruba 2013).

Noventa minutos após a indução do SE, o animal recebeu 10 mg/kg de diazepam (i.p.) para atenuar as crises comportamentais. Nos próximos 5 dias os animais receberam tratamento com ração embebida em soro glicosado, por via oral e aplicação de soro e glicose por via subcutânea para reposição de nutrientes.

#### **4.5 Vídeo monitoramento**

Passados 50 dias após o SE os animais foram filmados para análise da ocorrência de CERs. As filmagens foram realizadas 24 horas/dia (12 horas do ciclo claro e 12 horas do ciclo escuro) por 7 dias. A oferta de comida e de água no período das filmagens não foi alterada (Venturin, Greggio et al. 2011, Costa-Ferro, Souza et al. 2012, Zanirati, Azevedo et al. 2015). As crises foram classificadas de acordo com a escala de Racine (figura 1) (Racine 1972). Sendo incluídos no estudo apenas os animais que apresentaram crises nos níveis 4 e 5 da escala.

#### **4.6 Tarefa de reconhecimento de objetos**

A tarefa de reconhecimento de objetos (Ennaceur and Delacour 1988) foi realizada em uma arena do campo aberto (Figura 4), de acordo com o protocolo descrito por Myskiw et al, e Melo PB et al., (Myskiw, Rossato et al. 2008, Mello, Benetti et al. 2009). Todos os animais foram habituados na arena na ausência de objetos ou outros estímulos comportamentais durante 20 min, por 4 dias. A arena foi limpa com álcool 70%, entre o teste de um animal e outro. Os objetos usados para o reconhecimento foram um metal, vidro e plástico, fixados no chão da arena com fita adesiva. No dia da sessão de treino, os animais foram colocados na arena na presença de dois objetos distintos (A e B) e ficaram alí para explorá-los por 5 minutos. A sessão

de teste foi realizada 180 minutos depois da sessão de treino para avaliar a memória de curta duração. No teste, um dos objetos foi substituído por um novo objeto (C) e o rato foi novamente colocado na arena e testado por 5 minutos. A exploração dos objetos foi definida como o fato de cheirar ou tocar os objetos com o nariz e as patas anteriores. O tempo gasto explorando cada objeto foi cronometrado, registrado e expresso no formato de índice  $(C-A/A+C)$  do tempo total de exploração em segundos (Rossato, Bevilaqua et al. 2007).

#### **4.7 Nado Forçado**

O teste de nado forçado foi descrito por Porsolt e colegas (Porsolt, Le Pichon et al. 1977), foi utilizado para avaliar o comportamento depressivo dos animais. O protocolo usado foi descrito por Kodali, Parihar e colegas (Kodali, Parihar et al. 2015) e Upadhya, Hattiangady e colaboradores (Upadhya, Hattiangady et al. 2016). O parâmetro analisado pelo teste é o tempo de imobilidade dos animais. 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. Os animais foram colocados um a um 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. 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. 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. As análises dos vídeos do teste foram realizadas por observadores cegos ao tratamento. O tempo de imobilidade foi mensurado, 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.

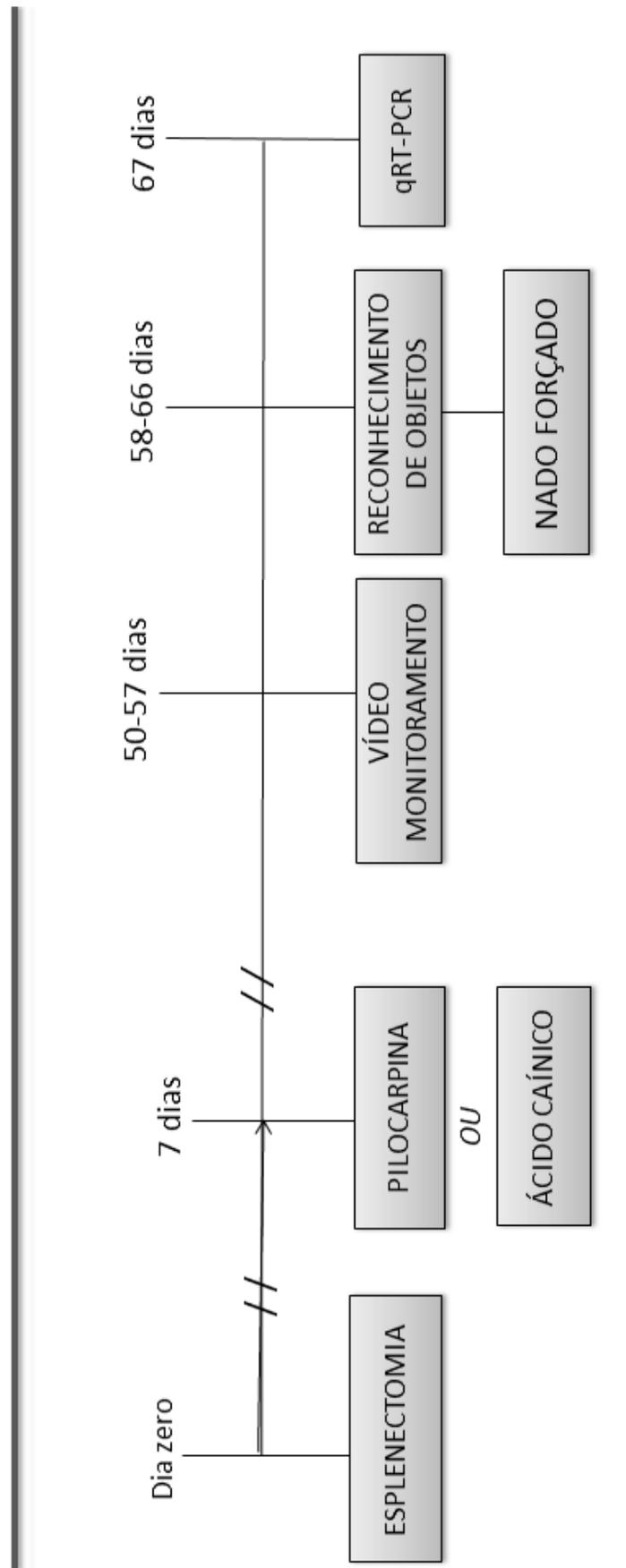
#### **4.8 Extração de RNA e RT-q-PCR**

A extração de RNA foi realizada utilizando kit RNA SV-Total (Promega), conforme orientações do fabricante. Os RNAs foram extraídos de amostras de hipocampo e baço. Tanto a qualidade quanto a quantidade do RNA total extraído foram analisadas por espectrofotometria em equipamento Q-ubit (Invitrogen). A síntese de cDNA foi realizada utilizando kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) e amplificação utilizando kit Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Life Technologies) conforme orientação do fabricante. Nessa técnica foram utilizados 5 animais por grupo experimental (Marinowic, Domingues et al. 2015).

#### **5 Delineamento experimental:**

O projeto teve início com a esplenectomia e as cirurgias controles nos animais do grupo Sham. Sete dias após a esplenectomia foram aplicados os protocolos de pilocarpina ou ácido caínico nos animais. Transcorridos cinquenta dias os animais que passaram pelos protocolos de SE foram filmados por uma semana (24 horas/dia). O teste do reconhecimento de objetos ocorreu após o término das filmagens e o teste do nado forçado na semana seguinte. Posteriormente foi realizada a eutanásia dos animais para a retirada de amostras para o qRT-PCR. O delineamento experimental está simplificado em um esquema na figura 1.

# Delineamento Experimental



**Figura 1:** Esquema contendo o delineamento experimental do projeto crônico em dias e com os experimentos realizados.

## **6 Grupos experimentais**

O projeto de fase crônico contou com sete grupos experimentais, os detalhes e os nomes de cada grupo estão descritos abaixo e na tabela 1.

### **6.1 Grupo Naive**

O grupo Naive é o controle, grupo onde os animais não passaram por nenhum tipo de intervenção. Apenas pelos testes comportamentais e tiveram suas amostras coletadas para o qRT-PCR.

### **6.2 Grupo Sham**

O grupo Sham foi anestesiado e operado, uma incisão na cavidade abdominal esquerda foi realizada e em seguida o animal foi suturado normalmente, após a operação e receberam analgésico. Passaram pelos testes comportamentais e suas amostras foram retiradas para qRT-PCR.

### **6.3 Grupo Esplenec**

O grupo Esplenec foi anestesiado e através de uma incisão na cavidade abdominal esquerda, o baço foi retirado por meio de intervenção cirúrgica conforme descrito nas metodologias. Passaram pelos testes comportamentais e suas amostras foram retiradas para qRT-PCR.

### **6.4 Grupo Pilo**

O grupo PILO foi submetido ao protocolo de pilocarpina, passados cinquenta dias após o SE, foram filmados por sete dias, submetidos aos testes de reconhecimento de objetos e nado forçado e eutanasiados ao final dos experimentos. As amostras foram coletadas para qRT-PCR.

## **6.5 Grupo Pilo/Esplenec**

No grupo Pilo/Esplenec os animais foram esplenectomizados e sete dias depois foram submetidos ao protocolo de pilocarpina. Passados cinquenta dias após o SE, foram filmados por sete dias, submetidos aos testes de reconhecimento de objetos, nado forçado e eutanasiados ao final dos experimentos. As amostras foram coletadas para qRT-PCR.

## **6.6 Grupo KA**

O grupo KA foi submetido ao protocolo de ácido caínico. Passados cinquenta dias após o SE, foram filmados por sete dias, submetidos aos testes de reconhecimento de objetos, nado forçado e eutanasiados ao final dos experimentos. As amostras foram coletadas para qRT-PCR.

## **6.7 Grupo KA/Esplenec**

No grupo KA/Esplenec os animais foram esplenectomizados e sete dias depois, submetidos ao protocolo de ácido caínico. Cinquenta dias após o SE, foram filmados por sete dias, submetidos aos testes de reconhecimento de objetos, nado forçado e eutanasiados ao final dos experimentos. As amostras foram coletadas para qRT-PCR.

<b>Grupos</b>	<b>Naive</b>	<b>Sham</b>	<b>Esplenec</b>	
<b>Intervenções</b>	Reconhecimento de objetos, nado forçado e qRT-PCR.	Cirurgia controle, sem a retirada do baço. Reconhecimento de objetos, nado forçado e qRT-PCR.	Cirurgia para retirada do baço. Reconhecimento de objetos, nado forçado e qRT-PCR.	
<b>Grupos</b>	<b>Pilo</b>	<b>Pilo/Esplenec</b>	<b>KA</b>	<b>KA/Esplenec</b>
<b>Intervenções</b>	Pilocarpina, Vídeo monitoramento, Reconhecimento de objetos, Nado forçado e qRT-PCR.	Esplenectomia, Pilocarpina., Vídeo monitoramento, Reconhecimento de objetos, Nado forçado e qRT-PCR.	Ácido caínico, , Vídeo monitoramento, Reconhecimento de objetos, Nado forçado e qRT-PCR.	Esplenectomia, ácido caínico, Vídeo monitoramento, Reconhecimento de objetos, Nado forçado e qRT-PCR.

**Tabela 1:** Tabela com os grupos experimentais do projeto crônico e as metodologias aplicadas em cada grupo.

## **7 Análise estatística**

Utilizamos o teste de Fisher para analisar a mortalidade e número de animais que entraram em SE. O teste T não pareado para a análise de latência e número de crises. Foi utilizado o teste estatístico de Análise de Variância (ANOVA) de uma via para os testes comportamentais e RT-q-PCR. Todos os valores são baseados na média $\pm$  o erro padrão, sendo considerado um nível de significância de  $p < 0,05$ . Os dados foram avaliados pelo Programa Graph Pad Prism 7.1.

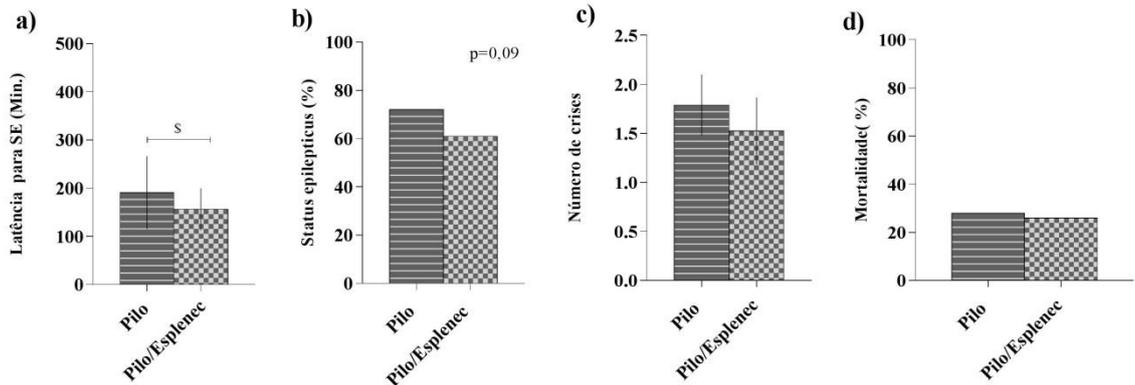
## 8 Resultados

### 8.1 Parâmetros analisados durante o SE

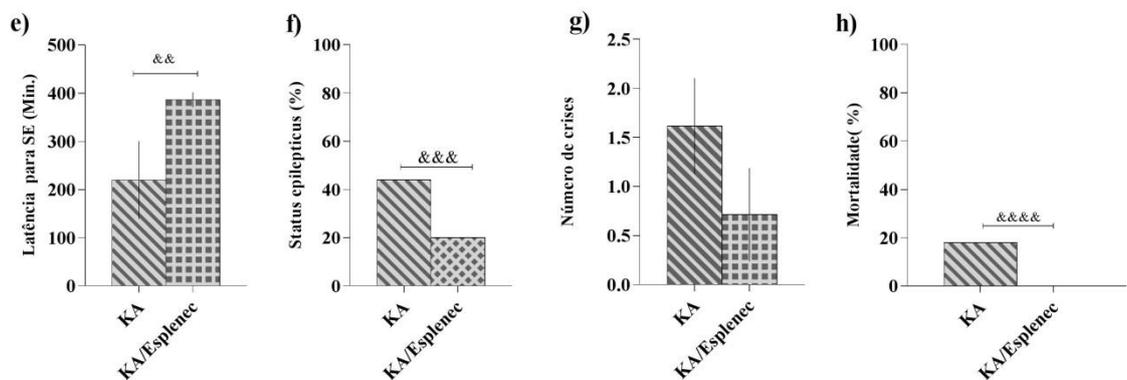
Na figura 2 estão apresentados os gráficos com os dados do comportamento dos animais durante a indução do SE. O gráfico 2a mostra a latência (tempo de início primeira crise) que no grupo Pilo foi de  $210,3 \pm 17,57$  min. e no grupo Pilo/Esplenec foi de  $156,2 \pm 12,12$  min  $p < 0,05$  (<sup>\$</sup>). O gráfico 2b mostra a porcentagem dos animais que entraram em SE no grupo Pilo/Esplenec foi 61% e 72% no grupo Pilo (<sup>\$</sup> $p = 0,09$ ). O gráfico 2c mostra que o número de crises durante o SE não apresentou diferenças significativas entre os grupos Pilo  $1,78 \pm 0,31$  e Pilo/Esplenec  $1,54 \pm 0,34$  com  $p > 0,5$ . O gráfico 2d mostra que não houve diferença significativa na mortalidade dos animais entre o grupo Pilo (28%) e Pilo/Esplenec (26%).

O gráfico 2e mostra que a latência foi maior no grupo KA/Esplenec,  $386,7 \pm 8,81$  min quando comparado com o grupo KA que foi de  $219,9 \pm 30,54$  min  $< 0,001$  (<sup>&&&</sup>). O gráfico 2f mostra que 44% dos animais do grupo KA apresentaram SE e 20% dos animais do grupo KA/Esplenec,  $p < 0,0001$  (<sup>&&&&</sup>). O gráfico 2g mostra que embora o grupo KA/Esplenec tenha apresentado menos crise que o grupo KA essa diferença não foi significativa. A figura 2h mostra que a mortalidade do grupo KA foi de 18%, enquanto que no grupo KA/Esplenec foi de zero  $p < 0,0001$  (<sup>&&&&</sup>). Os dados categóricos foram analisados com o teste de Fisher com Qui-Quadrado. E o tempo para o início do SE foi comparado através do teste t não pareado. Os dados foram coletados durante a aplicação dos protocolos de pilocarpina e ácido cáínico do projeto.

## Pilocarpina



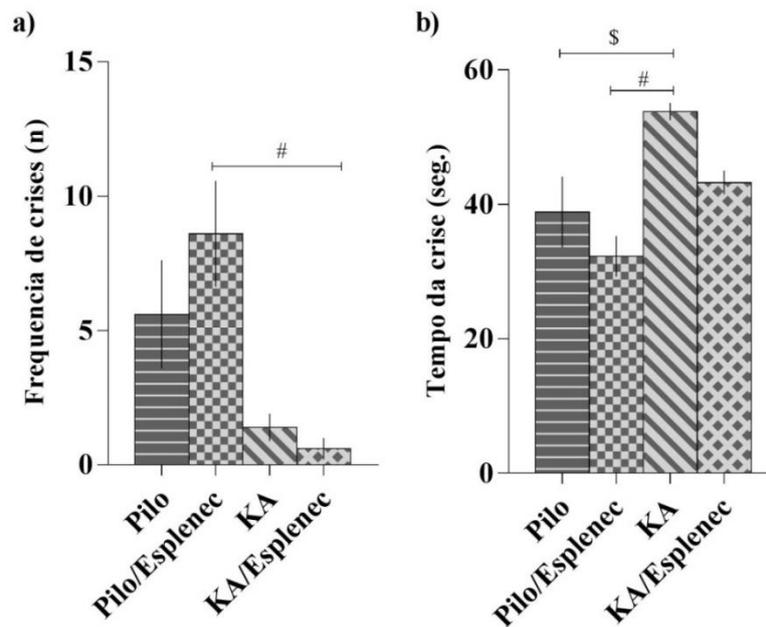
## Ácido Caínico



**Figura 2:** Dados sobre o SE foram coletados durante a aplicação dos protocolos de pilocarpina( a-d) e ácido caínico (e-h) do projeto. Na figura a) mostra a latência, para o início de crises no protocolo de pilocarpina. Em b) a porcentagem de animais que tiveram SE. E em c) o número de crises que os animais apresentaram durante o SE. d) a taxa de mortalidade em decorrência do protocolo de pilocarpina. Na figura e) consta a análise da latência para o início de crises no protocolo de ácido caínico. Em f) a porcentagem de animais que tiveram SE. Em g) o número de crises durante o protocolo de SE. E em h) a taxa de mortalidade em decorrência do protocolo de ácido caínico. Os dados categóricos foram analisados com o teste de Fisher com Qui-Quadrado. E o tempo para o início do SE foi comparado através do teste t não pareado. Valores menores que 0,05 foram considerados significativos, n=48/pilocarpina e n=31/ácido caínico.  $^{\$}p<0,05$  vs Pilo,  $^{\&\&}p<0,01$ ,  $^{\&\&\&}p<0,001$ ,  $^{\&\&\&\&}p<0,0001$  vs KA.

## 8.2 Vídeo monitoramento

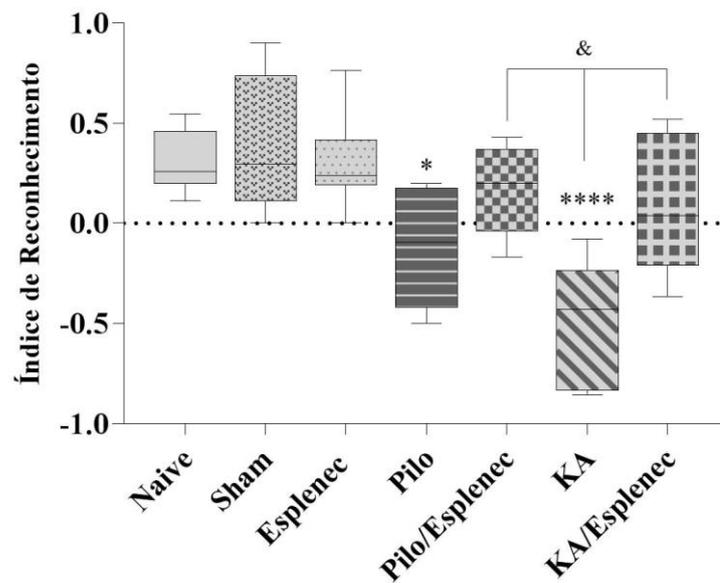
A figura 3 mostra a frequência das CERs dos animais epiléticos. No grupo Pilo 83,3% dos animais avaliados desenvolveu epilepsia. No grupo Pilo/Esplenec 100% dos animais avaliados tornaram-se epiléticos. No grupo KA, 100% dos animais avaliados no estudo desenvolveram CERs. E no grupo KA/Esplenec 50% dos animais se tornou epilético. A figura 3a, mostra que os animais do grupo Pilo/Esplenec apresentaram mais CERs quando comparado com os animais dos grupos KA e KA/Esplenec  $p<0,05$ (#). A figura 3b, mostra que a duração das crises dos animais do grupo KA foi estatisticamente maior que crises dos animais do grupo Pilo com  $p<0,05$ (\$) e Pilo/Esplenec  $p<0,05$ (#).



**Figura 3:** Monitoramento de crises espontâneas e recorrentes. a) número de crises apresentadas pelos ratos nos diferentes grupos. b) Tempo de duração em segundos de cada crise analisada. As análises foram realizadas através de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey para avaliação entre os grupos. Os dados são apresentados como média  $\pm$  SEM, n=5 por grupo. Um  $p < 0,05$  foi considerado significativo. # $p < 0,05$  vs Pilo/Esplenec, § $p < 0,05$  vs Pilo.

### 8.3 Reconhecimento de objetos

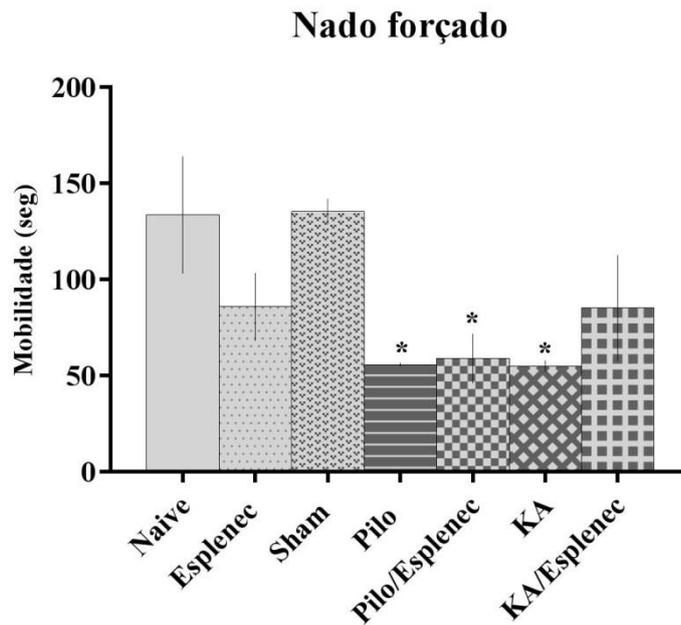
A figura 4 demonstra os dados do teste do paradigma de reconhecimento de objetos utilizado para testar memória de curta duração. Nossos dados mostram que não houve diferença significativa no desenvolvimento da tarefa nos animais dos grupos controles (Naive, Sham e Esplenec). Os animais que passaram pelos protocolos de SE (Pilo e KA) demonstraram prejuízo na memória, os animais do grupo Pilo  $p < 0,05$ (\*) e no grupo KA  $p < 0,0001$ (\*\*\*\*) quando comparados com os animais do grupo Naive. No entanto, os animais dos grupos Pilo/Esplenec e KA/Esplenec, aprenderam a tarefa e não apresentaram diferenças significativas quando comparados com o desempenho dos animais do grupo Naive. Foi observado que os animais do grupo KA/Esplenec e Pilo/Esplenec desempenharam melhor a tarefa quando comparados aos animais do grupo KA,  $p < 0,05$ (&). Os resultados do gráfico são do teste, e os valores estão apresentados no formato de índice  $(C-A/A+C)$ , usando teste de ANOVA de uma via e foi considerada uma margem de erro de 95%.



**Figura 4:** Paradigma de reconhecimento de objetos, com protocolo para avaliar, memória de curta duração. Teste realizado após 4 dias de habituação. Os valores estão apresentados no formato de índice (C-A/A+C). A análise estatística foi realizada pelo teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Dunnett. Os dados estão representados com média  $\pm$ SEM, n=5-8. Considerando uma margem de erro de 95%. \* $p < 0,05$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs Naive, & $p < 0,05$  vs KA.

## 8.4 Nado forçado

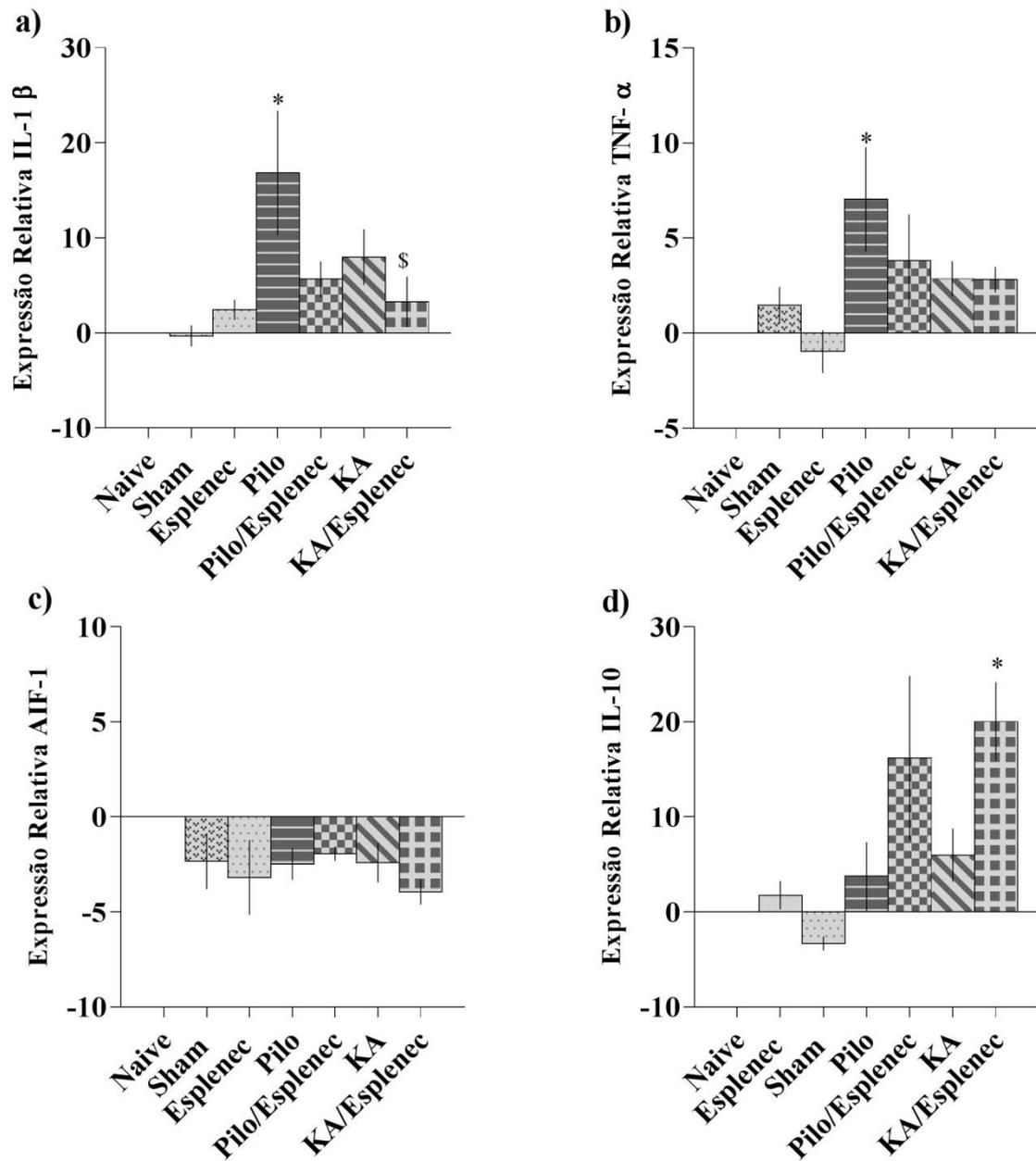
A figura 5 mostra o desempenho dos animais no teste de nado forçado. O teste do nado forçado avaliou o tempo de mobilidade dos animais. Um padrão de menor mobilidade dos animais durante o teste caracteriza um perfil depressivo. Em epilepsia uma das comorbidades que podem surgir na doença é a depressão. Conforme já havia sido visto por Zanirati e colaboradores (Zanirati, Azevedo et al. 2015), os ratos epiléticos apresentam tendência ao comportamento depressivo, os grupos Pilo, Pilo/Esplenec e KA apresentaram comportamento depressivo ( $p < 0,05$ ) quando comparados com os animais do grupo Naive (\*). No entanto, não houve diferença significativa entre os animais esplenectomizados e não esplenectomizados.



**Figura 5:** Teste de nado forçado. Teste realizado após um dia de habituação. Os valores estão apresentados em segundos de mobilidade dos animais, onde menor mobilidade é classificada como comportamento depressivo. A análise estatística foi realizada pelo teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Dunnett. Os dados estão representados com média  $\pm$ SEM,  $n=4-5$ . Considerando uma margem de erro de 95% \* $p<0,05$ , \*\*\* $p<0,0001$  vs Naive, & $p<0,05$  vs KA.

## 8.5 Expressão de fatores inflamatórios

A expressão gênica dos fatores inflamatórios foi dosada em tecido do hipocampo de ratos, sessenta e sete dias após os protocolos de SE. A figura 6a, mostra que a expressão da Interleucina-1 $\beta$  aumentou significativamente no tecido hipocampal dos animais do grupo Pilo quando comparado ao Naive com  $p<0,05$ (\*), e comparado ao grupo KA/Esplenec com  $p<0,05$ ( $^{\$}$ ). Na figura 6b, mostra que a expressão da TNF- $\alpha$  aumentou no tecido hipocampal dos animais do grupo pilo quando comparado ao grupo Naive,  $p<0,05$ (\*). A figura 6c, mostra que a expressão gênica de AIF-1 não apresentou diferenças significativas entre os grupos. A figura 6d, mostra que a expressão de IL-10 aumentou significativamente nos animais dos grupos KA/Esplenec quando comparado ao grupo Naive,  $p<0,05$ (\*). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Tukey, foi considerado significativo  $p\leq 0,05$ .



**Figura 6:** Expressão gênica de fatores inflamatórios qRT-PCR no hipocampo de ratos. **a)** Valores de expressão gênica relativa de IL-1β **b)** Expressão de TNF-α. **c)** Níveis de expressão de microglia ativada (gene AIF-1) **d)** Expressão de IL-10. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste Tukey, foi considerado significativo  $p \leq 0,05$ ,  $n=4$ . \* $p < 0,05$  vs Naive, \$ $p < 0,05$  vs Pilo.

## 9 Discussão

A epilepsia é uma síndrome neurológica que afeta, hoje, cerca de 65 milhões de pessoas mundialmente. Apesar do progresso na farmacologia e nos tratamentos cirúrgicos, ainda é relativamente pouco, o que se sabe sobre o processo que leva a geração das crises individuais e sobre os mecanismos que levam um cérebro saudável se tornar epilético. Em modelos experimentais, após o SE, inicia-se um período latente (também referido como silencioso), quando os animais iniciam a apresentação de um comportamento aparentemente normal, mas ocorrem mudanças moleculares, que parecem subsidiar o desenvolvimento da epileptogênese (Pernot, Heinrich et al. 2011, Vezzani, Balosso et al. 2012, Pitkänen, Lukasiuk et al. 2015). Esse período, geralmente dura de dias a semanas em roedores e pode servir como uma “janela de oportunidade” para a prevenção da epilepsia.

Resultados demonstraram, em modelos animais e em pacientes com epilepsia, alterações nas vias glutamatérgicas e GABAérgicas na patofisiologia das crises epiléticas. Assim como, a perda de neurônios hipocâmpais, levando a mudanças no balanço das atividades excitatórias e inibitórias, assim como pelo crescimento axonal reativo. Nos últimos anos com a descoberta da ocorrência de neurogênese no cérebro adulto, inúmeros trabalhos vêm demonstrando o aumento da taxa de neurogênese após crises epiléticas, assim como a ocorrência de inflamação sistêmica e no tecido cerebral, esses dados têm incentivado as pesquisas sobre a epileptogênese (Gall and Lynch 2004, Costa-Ferro, Souza et al. 2012, Leal, Costa-Ferro et al. 2014).

Neste estudo, nós avaliamos se esplenectomia, “per se” modula as citocinas pro- e anti-inflamatórias e a memória na epilepsia induzida por pilocarpina e por ácido cálcico. Nossos resultados mostraram um aumento na expressão no tecido hipocâmpal da citocina anti-inflamatória IL-10 e melhora da memória de curta duração nos animais epiléticos esplenectomizados nos dois modelos (Pilo e KA).

Para melhor compressão do efeito da esplenectomia na epilepsia, como foi mencionado anteriormente, foi avaliado o desenvolvimento das crises recorrentes a partir da indução do SE. Neste estudo utilizamos o protocolo de parcelamento da dose de pilocarpina (100 mg/kg a cada 30 minutos), desta forma equalizamos com as doses múltiplas do modelo de KA. A partir desse protocolo encontramos como resultado, que durante a indução do SE com pilocarpina os animais esplenectomizados apresentavam crises mais rapidamente quando comparados com os animais com o baço levando a um valor de latência menor. O fato de as doses de pilocarpina

serem repetidas e a dose de metilescopolamina ser administrada uma vez pode ser o responsável por essa redução no tempo de latência para o início de SE. A metil escopolamina bloqueia os efeitos colinérgicos periféricos nos animais, como foi aplicada em uma dose única (meia vida de 5 horas), o efeito da droga foi reduzindo enquanto a pilocarpina foi aplicada em repetidas doses causando uma repetição de estímulos colinérgicos no tecido cerebral. No entanto, a porcentagem de animais que apresentaram crises, número de crises e mortalidade não apresentaram diferenças significativas neste modelo.

Em relação aos nossos dados sobre a indução do SE por KA, mostraram que nos animais esplenectomizados o período de latência para a primeira crise e porcentagem de animais que desenvolveram SE foi reduzido. É interessante ressaltar que não houve mortalidade neste grupo. O fato de os ratos sem o baço e submetidos ao KA além de não apresentarem mortalidade, tiveram redução do tempo de latência, e porcentagem de animais que entram em SE reduzida, nos leva a pensar que o modelo de KA pode ser dependente do baço. Como essa neurotoxina se liga preferencialmente aos receptores glutamatérgicos inotrópicos do subtipo cáinato no cérebro, o seu efeito é mais direto nestes receptores, não influenciando o sistema colinérgico, como ocorre no modelo da pilocarpina. O KA “per se”, e sua ação glutamatérgica, gera o extravasamento de íons de potássio, morte celular e quebra da BHE desenvolvendo crises convulsivas. A ação tóxica do glutamato foi demonstrada clinicamente na síndrome de Rasmussem, (Handforth, DeGiorgio et al. 1998) onde o uso anticorpos contra receptores glutamatérgicos determinaram um ciclo de crises refratárias, morte celular e atrofia progressiva de um hemisfério cerebral (Handforth, DeGiorgio et al. 1998). Eventos inflamatórios no tecido cerebral gerados por danos e quebra da homeostase do tecido levam “mensagens” através de nervos eferentes do sistema autônomo para o sistema periférico, essas “mensagens” são recebidas por visceros-receptores e prontamente respondidas pela via aferente dos nervos aumentando a resposta inflamatória cerebral. Podemos sugerir que o KA age especificamente no cérebro e o sistema nervoso central envia sinais ao sistema nervoso esplênico formando uma alça de resposta possivelmente estimulando respostas imunes e propiciando o maior dano neuronal e crises convulsivas. Logo em animais esplenectomizados essa resposta não ocorre, amenizando os danos causados pelo KA.

Na fase crônica, através do vídeo monitoramento desses animais, não houve diferença significativa entre os grupos com baço e sem baço em ambos os modelos quando avaliamos frequência de crises e duração das crises. No entanto, foi possível observar que a frequência das CERs nos animais dos grupos KA é menor do que a frequência de crises nos grupos pilo 7 semanas após os protocolos de SE. Porém, foi visto por Jennifer LH, e colegas (1998) que em

seis semanas apenas 20% dos animais apresentavam CERs e o aumento significativo de animais com CERs (60% dos animais) foi visto a partir da 11ª primeira semana após a injeção do KA podendo justificar a baixa frequência de crises nos animais do grupo KA. É interessante observar que apesar de a frequência de crises ser menor, os animais do grupo KA apresentaram crises mais longas na fase crônica em comparação ao grupo Pilo.

Em pacientes com ELT além das crises convulsivas, existem algumas características marcantes como, prejuízo da memória, déficits cognitivos em decorrência do dano hipocampal, alterações comportamentais como depressão, ansiedade e psicoses (Hoppe, Elger et al. 2007). No nosso estudo, os experimentos comportamentais desenvolvidos nos trouxeram importantes resultados sobre a memória de curta duração nesses animais. O teste de tarefa de reconhecimento de objetos reporta o comportamento do animal quanto ao contato o objeto. No nosso estudo, animais de ambos os grupos (Pilo e KA) apresentaram um déficit no aprendizado de reconhecer e lembrar dos objetos, como foi demonstrado por (Clark, Zola et al. 2000, Rossato, Bevilaqua et al. 2007). Entretanto, os animais esplenectomizados de ambos os grupos (Pilo e KA) apresentaram desempenho melhor nesta tarefa. Não é conhecida uma relação entre baço e memória, porém uma das hipóteses é de que, devido a intensidade da resposta inflamatória ser modulada pelo baço, possivelmente a esplenectomia tenha interferido positivamente no dano neuronal e conseqüentemente na memória dos animais. Visto que, o baço é o primeiro órgão imune a agir no momento de um dano ao organismo (Balogh, Horváth et al. 2004), liberando células imunes e modulando fatores inflamatórios que propiciam o dano neuronal aumentando suas conseqüências, como déficits de memória. Sabe-se que o sistema simpático modula a musculatura lisa do baço e libera células na circulação, produzindo um efeito de “bombeamento”, promovendo um impacto negativo nas lesões cerebrais (Ajmo, Vernon et al. 2008). Além da memória outras comorbidades, surgem na epilepsia como a depressão. Depressão e epilepsia podem compartilhar mecanismos patogênicos, sendo quatro vezes mais provável encontrar depressão em pacientes com epilepsia em comparação com pessoas sem histórico de epilepsia (Kanner and Balabanov 2002). Estudos anteriores realizados em animais com pilocarpina também demonstraram déficits de aprendizado e memória, aumento de comportamentos semelhantes a ansiedade e depressão (Gröticke, Hoffmann et al. 2007, Müller, Gröticke et al. 2009). Nossos resultados, do teste de nado forçado, demonstraram que o SE inicial levou ao comportamento depressivo nos ratos epiléticos com ou sem baço, em ambos os modelos (Pilo ou KA), corroborando com achados anteriores (Mazarati, Siddarth et al. 2008, Zanirati, Azevedo et al. 2018). Segundo Kanner e colaborador (2006) na depressão e na epilepsia os níveis dos neurotransmissores da serotonina, GABA, glutamato e norepinefrina

estão alterados (Kanner 2006). Assim como, a excitabilidade, mudanças nos canais neuronais e sinápticas estão relacionadas ao aumento transitório de IL-1  $\beta$  e TNF- $\alpha$  em células da microglia. Tais mudanças ganham um caráter permanente após a epileptogênese, levando às comorbidades relacionadas a epilepsia como as CERs, depressão e ansiedade.

As citocinas IL-1  $\alpha$  e  $\beta$  são constitutivamente expressas em níveis muito baixos no SNC humano, porém após um dano neuronal como crises convulsivas a expressão da citocina Interleucina-1 é aumentada. A expressão crônica de IL-1 $\beta$  durante a epileptogênese evidencia a possibilidade de que esta citocina possa estar envolvida nos mecanismos subjacentes ao aparecimento de CERs (Ravizza, Gagliardi et al. 2008). No presente estudo, a expressão de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  foi aumentada nos animais epiléticos (com baço). Entretanto, a expressão de IL-10 foi aumentada nos animais epiléticos sem o baço em ambos os modelos (Pilo e KA).

A citocina IL-10 apresenta um marcante caráter anti-inflamatório, a presença desta proteína é a principal responsável pela ação inibitória sobre a resposta imune, prevenindo as ativações celulares e promovendo ação supressora sobre as citocinas IL-1  $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, e IL-8, por isso ela foi inicialmente chamada “fator inibitório de síntese de citocinas” (de Waal Malefyt, Abrams et al. 1991, Li, Elliott et al. 1994, de Vries 1995). No nosso estudo os animais epiléticos sem o baço apresentaram uma melhora na memória de reconhecimento, seguindo a hipótese da IL-10 ser promotor da supressão da resposta inflamatória. Em nossos achados, verificamos que a expressão do AIF-1 não foi alterada no hipocampo dos animais em todos os grupos em relação aos animais do grupo Naive. Este fator é expresso por microglias ativadas. Vários estudos experimentais utilizando a indução do SE por ácido caínico e/ou pilocarpina demonstraram que a microglia está ativada na transição da fase latente para a fase crônica da doença (Ravizza, Gagliardi et al. 2008). No nosso estudo nós avaliamos este fator (AIF-1) já na fase crônica da epilepsia, talvez por isso não notamos tal associação.

Aqui nos demonstramos que os animais esplenectomizados submetidos ao modelo de pilocarpina diminuíram a latência para a primeira crise, contrapondo com dados dos animais esplenectomizados submetidos ao modelo de ácido caínico que aumentaram a latência para a primeira crise, não houve mortalidade, assim como, diminuiu a percentagem de animais que entraram em SE. Na fase crônica, a esplenectomia não influenciou sobre as crises recorrentes em ambos os modelos, no comportamento depressivo e aumentou a expressão hipocampal de IL-10 nos animais epiléticos sem o baço. Além disso, estes animais esplenectomizados aprenderam a tarefa de reconhecimento de objetos apoiando a hipótese de o baço estar relacionado com a modulação inflamatória da epilepsia.

### **Capítulo III:**

Considerações finais do trabalho e Conclusões gerais.

## 1. Considerações finais

A resposta inflamatória na epilepsia, além de estar envolvida na fase aguda tem grande importância também na fase crônica da doença. Recentemente, Vezzani e colegas (Vezzani, Balosso et al. 2012) questionaram se na epilepsia são as crises que induzem a resposta inflamatória? Ou a resposta inflamatória é que induzem as crises? No nosso estudo, corroborando com achados anteriores (Costa-Ferro et al., 2012, Leal et al., 2014) nós demonstramos neuroinflamação induzida pelo SE (fase aguda) e nos animais epiléticos (fase crônica). A escassez de estudos avaliando neuroinflamação e o envolvimento do baço no modelo de epilepsia, restringem discussões mais complexas, entretanto revelam uma área de estudo repleta de perguntas a serem respondidas.

Finalmente, nós evidenciamos que o efeito com CMMO foi dependente do baço e analisando as características farmacológicas das drogas administradas e suas possíveis interações com o baço e o desenvolvimento de crises nós hipotetizamos possíveis vias para justificar os resultados apresentados neste trabalho e demonstramos esquematicamente nas figuras 1, 2, 3 e 4.

Os macrófagos esplênicos são estimulados por fatores do sistema parassimpático e simpático através de receptores adrenérgicos e colinérgicos presentes nesses macrófagos. Os estímulo adrenérgico nos receptores dos macrófagos predispõe uma resposta pró-inflamatória, enquanto que as ligações de componentes do sistema colinérgico nos receptores ativam uma resposta anti-inflamatória. Neste contexto, a pilocarpina é um agonista colinérgico que atua em receptores muscarínicos. No entanto achados da literatura mostram que a pilocarpina aumenta a taxa de metabolização de noradrenalina durante o SE se correlacionando com o sistema simpático. Como falado anteriormente, na indução do SE, inicialmente injetamos a metilescopolamina, um bloqueador colinérgico periférico que age minimizando os efeitos periféricos da pilocarpina e assim favorecendo a ação desta droga diretamente no cérebro. Nesse momento ocorre uma ativação colinérgica apenas no cérebro pela pilocarpina e uma inflamação local devido aos fatores pró-inflamatórios desencadeando as crises e quebrando a homeostase do tecido. A neuroinflamação inata é ativada no tecido cerebral liberando citocinas pró-inflamatórias, gerando as crises e estimulando o hipotálamo superior a promover a ativação do sistema simpático periférico, que através da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenocortical (HPA), libera outros fatores inflamatórios no organismo retroalimentando o eixo- neuro-imune endócrino (figura 1).

Com relação ao baço, quando a via de comunicação foi cortada, inibiu a resposta inflamatória gerada pela pilocarpina. No nosso estudo, quando usamos o protocolo de doses repetidas de pilocarpina, foi administrado uma única dose de metilescopolamina (a meia vida de 5 horas), o que pode ter favorecido a menor latência para o início da primeira crise nos animais do grupo esplenectomizado. Pois a repetição de estímulos colinérgicos cerebrais e a falta do bloqueio colinérgico periférico gerado pela metilescopolamina somada a esplenectomia possivelmente modificou respostas inflamatórias decorrente do modelo (figura 2).

Com relação ao ácido caínico, esta neurotoxina não tem ação colinérgica atuando de forma mais direta no cérebro o que leva a uma inversão na resposta inflamatória. KA age nos receptores de glutamato no cérebro gerando crises convulsivas, estas crises vão gerar neuroinflamação e liberação de fatores inflamatórios pelas células glias (microglia e astrócitos) ativando o hipotálamo, estimulando o sistema simpático pelo eixo HPA, este estímulo simpático leva a estimulação via adrenérgica nos macrófagos esplênicos no baço, o baço então responde liberando mais fatores inflamatórios, retroalimentando o sistema (figura 3). Entretanto, nos animais esplenectomizados o KA age diretamente no cérebro levando a geração de crises, liberação de fatores inflamatórios, ativação do sistema simpático para o organismo, porém nesse momento a resposta não vai até o baço devido a esplenectomia, cortando a resposta enfraquecendo-a e reduzindo fatores inflamatórios, e consequentemente levando a redução de crises, como foi observado neste trabalho (Figura 4).

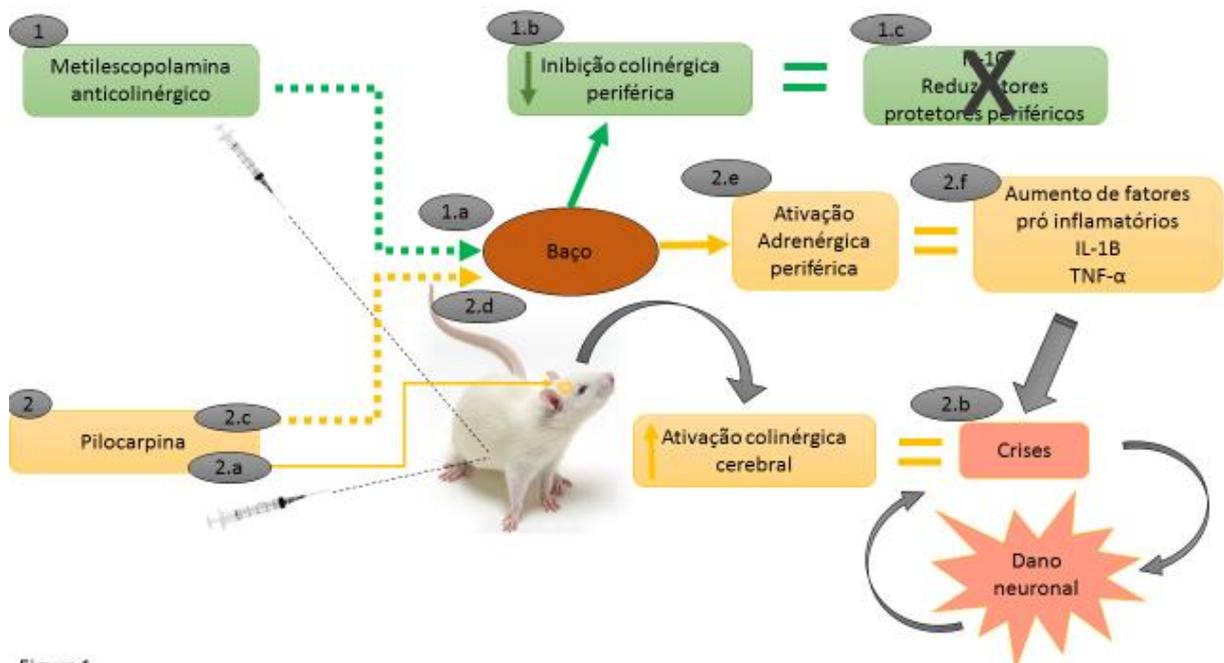


Figura 1

**Figura 1:** Este esquema está demonstrando a nossa hipótese sobre o efeito da pilocarpina relacionado ao eixo baço-cérebro. 1-A metilescopolamina (injetada ip. cerca de 20-30 minutos antes da pilocarpina) interage com receptores colinérgicos periféricos. 1.a) Nós hipotetizamos essa interação possa estar ocorrendo através dos receptores das células esplênicas. 1.b) A metilescopolamina age nos receptores bloqueando o sistema colinérgico periférico 1.c) A literatura nos mostra que uma inibição colinérgica leva a uma redução de fatores anti-inflamatórios no organismo. 2- A pilocarpina é um agonista colinérgico muscarínico 2.a devido o bloqueio colinérgico periférico gerado pela metil escopolamina a pilo age nos receptores muscarínicos cerebrais super-ativando o sistema colinérgico cerebral causando um desbalanço das cargas elétricas e uma consequente excitotoxicidade no tecido neuronal, 2.b que desencadeia as crises e o dano neuronal que desencadeia mais crises. 2.c A literatura nos mostra que a pilocarpina age também em receptores adrenérgicos periféricos. 2.d Boa parte dos receptores adrenérgicos está em células esplênicas. 2.e) Acreditamos que os fatores pró-inflamatórios sejam provenientes dessa ativação causada pela pilocarpina na via periférica, através de receptores adrenérgicos esplênicos 2.f) A quebra da BHE permite a entrada de fatores inflamatórios no sistema nervoso aumentando a excitotoxicidade propiciando mais as crises e o dano neuronal.

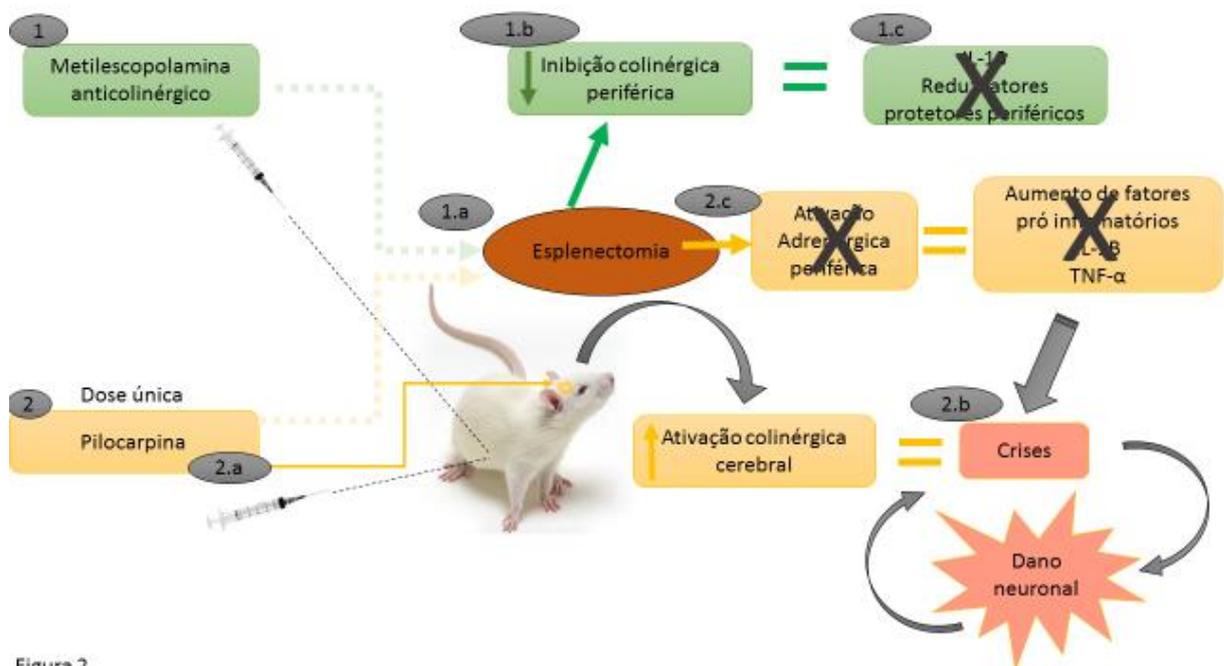


Figura 2

**Figura 2:** O esquema a seguir mostra a nossa hipótese a respeito do efeito da pilocarpina no cérebro de animais esplenectomizados. 1. A metilescopolamina interage com receptores colinérgicos periféricos. 1.a) Nesse caso a própria esplenectomia gera um bloqueio colinérgico periférico. 2. A pilocarpina segue atuando nos receptores muscarínicos cerebrais super-ativando o sistema colinérgico cerebral e causando um desbalanço das cargas elétricas e uma consequente excitotoxicidade no tecido neuronal, 2.b) desencadeando as crises e o dano neuronal que desencadeia mais crises. 2.c) no entanto a esplenectomia impede que a pilocarpina atue também em receptores adrenérgicos periféricos. 2.e Sendo assim a liberação de fatores pró inflamatórios que eram provenientes da ativação adrenérgica pela pilocarpina através de receptores adrenérgicos esplênicos não ocorre. 2.f) reduzindo a entrada de fatores inflamatórios no sistema nervoso central reduzindo a excitotoxicidade e as crises. OBS: Porém no protocolo de doses repetidas de pilo notamos que os animais sem o baço entram em crise mais rápido do que os com o baço, hipotetizamos que o próprio excesso de estímulos colinérgicos cerebrais leve a um aumento de fatores inflamatórios e isso desencadeie as crises mais cedo (Foto rato: SDCFMUSP).

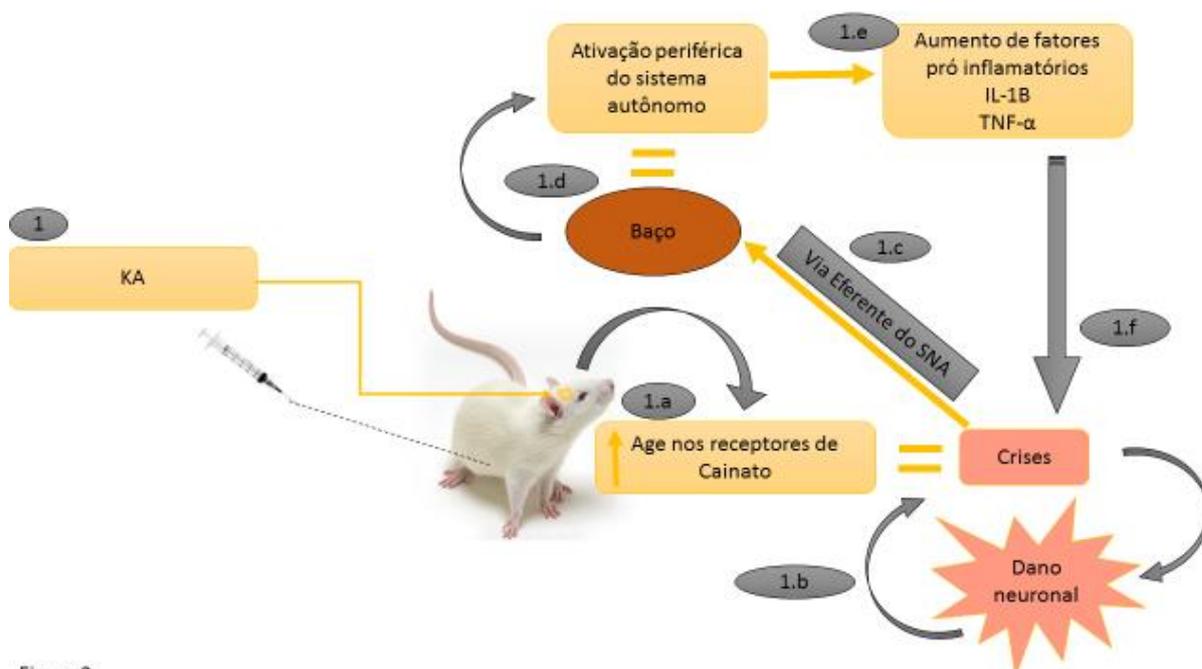


Figura 3

**Figura 3:** Este esquema está demonstrando a nossa hipótese sobre efeito do ácido cáinico em relação ao eixo baço-cérebro. 1. O KA age diretamente os receptores de cainato do cérebro o (1.a) que leva a uma abertura desordenada de canais iônicos e uma excitotoxicidade neuronal gerando as crises. 1.b) O próprio dano neuronal repetido gerado pelo KA e pelas crises envia “sinais” ao organismo (1.c) através de nervos eferentes do SNA. 1.d) Hipotetizamos que esses sinais sejam enviados através de receptores nervosos esplênicos liberando fatores pró-inflamatórios e (1.f) retroalimente a excitotoxicidade neuronal (Foto rato: SDCFMUSP)..

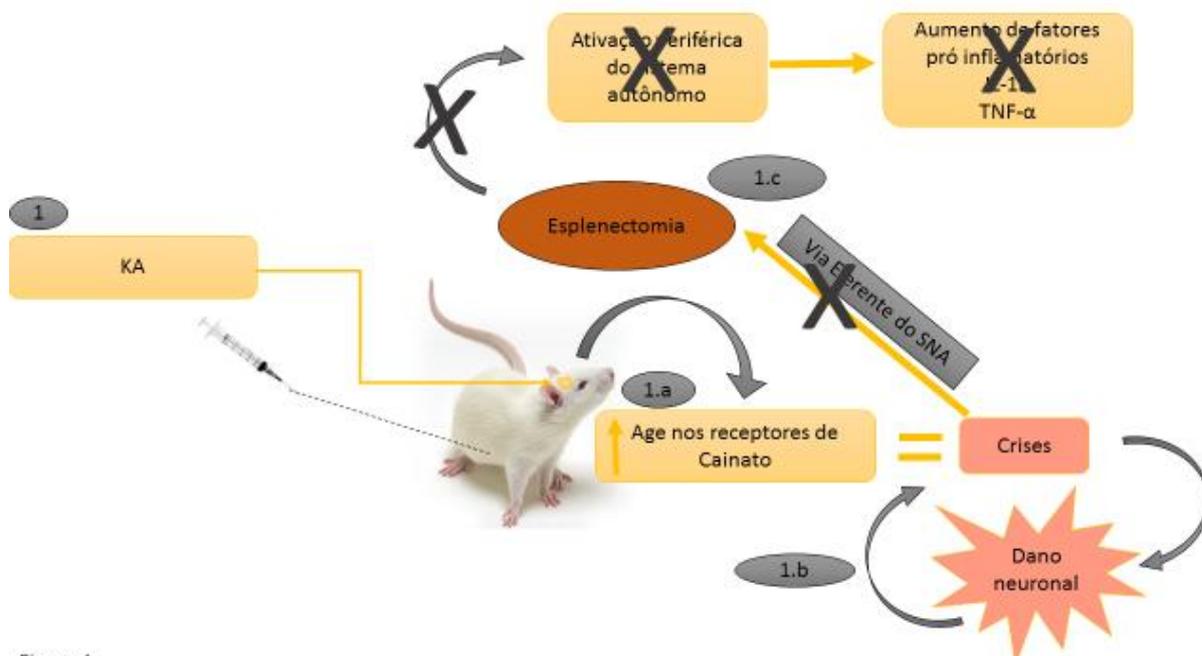


Figura 4

**Figura 4:** Este esquema nos mostra a hipótese formulada sobre o efeito do ácido cáinico no cérebro de animais esplenectomizados. 1. O KA age diretamente os receptores de cainato do cérebro o que leva a uma abertura desordenada de canais iônicos e uma excitotoxicidade neuronal gerando as crises. 1.b) O próprio dano neuronal

repetido gerado pelo KA e pelas crises manda ao organismo através de nervos eferentes do SNA. 1.c) Com a esplenectomia essa resposta não é recebida e a retroalimentação com a liberação de fatores pró inflamatórios não ocorre, reduzindo a excitotoxicidade neuronal (Foto rato: SDCFMUSP).

## **2. Conclusão**

### **2.1-Os achados presentes neste trabalho e apresentados no capítulo I possibilitaram demonstrar que:**

- 1- Nosso estudo revelou que as CMMO do doador migraram ao cérebro, fígado, rim e baço de animais dos grupos piloto tratado com as CMMO e nos animais esplenectomizados e submetidos ao SE as células do doador foram detectadas no cérebro, fígado e rins.
- 2- O transplante das CMMO apresentou a capacidade de reduzir as citocinas pró-inflamatórias e promover uma resposta anti-inflamatória com efeito sobre a inflamação aguda induzida durante o SE por pilocarpina, no tecido cerebral dos animais esplenectomizados e/ou não esplenectomizados.
- 3- A esplenectomia também reduziu os níveis das citocinas pró-inflamatórias no tecido cerebral após 12 horas do SE;
- 4- No baço os níveis da IL1-  $\beta$  e TNF- $\alpha$  foram reduzidos nos animais do grupo Pilo (com ou sem) tratamento com as CMMO;
- 5- O tratamento com as CMMO suprimiu a expressão da AIF-1 no tecido cerebral dos animais com ou sem baço, após 12 horas do SE;
- 6- Os resultados obtidos permitem identificar que tanto tratamento com CMMO quanto a esplenectomia apresentaram potenciais moduladores da resposta inflamatória aguda;
- 7- A avaliação de memória espacial revelou um importante efeito protetor do tratamento CMMO nos animais com baço submetidos ao SE, fato que não ocorreu com os animais do grupo esplenectomizados submetidos ao SE e tratados com as CMMO.

**2.2-A análise dos resultados apresentados neste trabalho, no capítulo II nos permitiu concluir que:**

- 1- A indução do SE com pilocarpina revelou que os animais esplenectomizados apresentaram latência para a primeira crise, menor quando comparados com os animais com baço;
- 2- A indução do SE com KA revelou que nos animais esplenectomizados o tempo de latência para a primeira crise foi maior, entretanto, a porcentagem de animais que desenvolveram SE foi menor e não houve mortalidade neste grupo.
- 3- Os animais epiléticos não apresentaram diferença quanto as crises recorrentes em ambos os grupos (Pilo e/ou KA);
- 4- Na tarefa de reconhecimento de objetos, os animais esplenectomizados de ambos os grupos (Pilo e KA) apresentaram desempenho melhor quando comparados com os animais epiléticos com baço.
- 5- No teste do nado forçado, os animais epiléticos de ambos os grupos (Pilo e KA) apresentaram comportamento depressivo e não foi demonstrado diferença entre os animais com ou sem baço.

## Referências:

- Aarli, J. A. (1993). "Immunological aspects of epilepsy." *Brain and Development* **15**(1): 41-49.
- Ábrahám, C. S., N. Harada, M. A. Deli and M. Niwa (2002). "Transient forebrain ischemia increases the blood-brain barrier permeability for albumin in stroke-prone spontaneously hypertensive rats." *Cellular and molecular neurobiology* **22**(4): 455-462.
- Ajmo, C. T., D. O. Vernon, L. Collier, A. A. Hall, S. Garbuzova-Davis, A. Willing and K. R. Pennypacker (2008). "The spleen contributes to stroke-induced neurodegeneration." *Journal of neuroscience research* **86**(10): 2227-2234.
- Ajmo Jr, C. T., L. A. Collier, C. C. Leonardo, A. A. Hall, S. M. Green, T. A. Womble, J. Cuevas, A. E. Willing and K. R. Pennypacker (2009). "Blockade of adrenoceptors inhibits the splenic response to stroke." *Experimental neurology* **218**(1): 47-55.
- Anatomyinfo (2018). Anatomyinfo. site. **hippocampus**.
- Angeleri, F., J. Majkowski, G. Cacchio, A. Sobieszek, S. D'acunto, R. Gesuita, A. Bachleda, G. Polonara, L. Krolicki and M. Signorino (1999). "Posttraumatic epilepsy risk factors: one-year prospective study after head injury." *Epilepsia* **40**(9): 1222-1230.
- Asari, T., K.-I. Furukawa, S. Tanaka, H. Kudo, H. Mizukami, A. Ono, T. Numasawa, G. Kumagai, S. Motomura and S. Yagihashi (2012). "Mesenchymal stem cell isolation and characterization from human spinal ligaments." *Biochemical and biophysical research communications* **417**(4): 1193-1199.
- Avoli, M., M. D'Antuono, J. Louvel, R. Köhling, G. Biagini, R. Pumain, G. D'Arcangelo and V. Tancredi (2002). "Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro." *Progress in neurobiology* **68**(3): 167.
- Babb, T. L., C. L. Wilson and M. Isokawa-Akesson (1987). "Firing patterns of human limbic neurons during stereoencephalography (SEEG) and clinical temporal lobe seizures." *Electroencephalography and clinical neurophysiology* **66**(6): 467-482.
- Bailey, P. and F. Bremer (1938). "A sensory cortical representation of the vagus nerve: with a note on the effects of low blood pressure on the cortical electrogram." *Journal of Neurophysiology* **1**(5): 405-412.
- Balogh, P., G. Horváth and A. K. Szakal (2004). "Immunoarchitecture of distinct reticular fibroblastic domains in the white pulp of mouse spleen." *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **52**(10): 1287-1298.
- Barbosa da Fonseca, L. M., B. Gutfilen, P. H. Rosado de Castro, V. Battistella, R. Goldenberg, T. Kasai-Brunswick, C. L. Chagas, E. Wajnberg, A. Maiolino and S. Salles Xavier (2010). "Migration and homing of bone-marrow mononuclear cells in chronic ischemic stroke after intra-arterial injection." *Experimental neurology* **221**(1): 122-128.
- Barry, F. P. and J. M. Murphy (2004). "Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization." *The international journal of biochemistry & cell biology* **36**(4): 568-584.
- Bartolomei, F., M. Khalil, F. Wendling, A. Sontheimer, J. Régis, J. P. Ranjeva, M. Guye and P. Chauvel (2005). "Entorhinal cortex involvement in human mesial temporal lobe epilepsy: an electrophysiologic and volumetric study." *Epilepsia* **46**(5): 677-687.
- Bear, M. F., B. W. Connors and M. A. Paradiso (2008). *Neurociências: desvendando o sistema nervoso*, Artmed Editora.
- Beltrami, A. P., L. Barlucchi, D. Torella, M. Baker, F. Limana, S. Chimenti, H. Kasahara, M. Rota, E. Musso and K. Urbanek (2003). "Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration." *Cell* **114**(6): 763-776.
- Berkovic, S. F., F. Andermann, A. Olivier, R. Ethier, D. Melanson, Y. Robitaille, R. Kuzniecky, T. Peters and W. Feindel (1991). "Hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy demonstrated by magnetic resonance imaging." *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* **29**(2): 175-182.
- Bobis, S., D. Jarocha and M. Majka (2006). "Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications." *Folia histochemica et cytobiologica* **44**(4): 215-230.
- Boison, D. and C. Steinhäuser (2018). "Epilepsy and astrocyte energy metabolism." *Glia* **66**(6): 1235-1243.

- Bonaz, B., C. Picq, V. Sinniger, J.-F. Mayol and D. Clarençon (2013). "Vagus nerve stimulation: from epilepsy to the cholinergic anti-inflammatory pathway." *Neurogastroenterology & Motility* **25**(3): 208-221.
- Bonini, J., W. Da Silva, L. Bevilaqua, J. Medina, I. Izquierdo and M. Cammarota (2007). "On the participation of hippocampal PKC in acquisition, consolidation and reconsolidation of spatial memory." *Neuroscience* **147**(1): 37-45.
- Brandon, K. and M. Rand (1961). "Acetylcholine and the sympathetic innervation of the spleen." *The Journal of Physiology* **157**(1): 18-32.
- Brasil, M. d. C. e. T., Conceia (2013). "Diretriz brasileira para o cuidado ea utilização de animais para fins científicos e didáticos–DBCA."
- Brenneman, M., S. Sharma, M. Harting, R. Strong, C. S. Cox Jr, J. Aronowski, J. C. Grotta and S. I. Savitz (2010). "Autologous bone marrow mononuclear cells enhance recovery after acute ischemic stroke in young and middle-aged rats." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **30**(1): 140-149.
- Bronte, V. and M. J. Pittet (2013). "The spleen in local and systemic regulation of immunity." *Immunity* **39**(5): 806-818.
- Buckmaster, P. S. and M. M. Haney (2012). "Factors affecting outcomes of pilocarpine treatment in a mouse model of temporal lobe epilepsy." *Epilepsy research* **102**(3): 153-159.
- Care, I. o. L. A. R. C. o., U. o. L. Animals and N. I. o. H. D. o. R. Resources (1985). *Guide for the care and use of laboratory animals*, National Academies.
- Cavalheiro, E., J. Leite, Z. Bortolotto, W. Turski, C. Ikonomidou and L. Turski (1991). "Long-Term Effects of Pilocarpine in Rats: Structural Damage of the Brain Triggers Kindling and Spontaneous I Recurrent Seizures." *Epilepsia* **32**(6): 778-782.
- Cesta, M. F. (2006). "Normal structure, function, and histology of the spleen." *Toxicologic pathology* **34**(5): 455-465.
- Chamberlain, G., J. Fox, B. Ashton and J. Middleton (2007). "Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing." *Stem cells* **25**(11): 2739-2749.
- Chaudhary, U. J., R. Rodionov, D. W. Carmichael, R. C. Thornton, J. S. Duncan and L. Lemieux (2012). "Improving the sensitivity of EEG-fMRI studies of epileptic activity by modelling eye blinks, swallowing and other video-EEG detected physiological confounds." *Neuroimage* **61**(4): 1383-1393.
- Chen, X., S. E. Kelemen and M. V. Autieri (2004). "AIF-1 expression modulates proliferation of human vascular smooth muscle cells by autocrine expression of G-CSF." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **24**(7): 1217-1222.
- Chopp, M. and Y. Li (2002). "Treatment of neural injury with marrow stromal cells." *The Lancet Neurology* **1**(2): 92-100.
- Clark, R. E., S. M. Zola and L. R. Squire (2000). "Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus." *Journal of Neuroscience* **20**(23): 8853-8860.
- Cohen, I. R. and M. Schwartz (1999). "Autoimmune maintenance and neuroprotection of the central nervous system." *Journal of neuroimmunology* **100**(1-2): 111-114.
- CONCEA (2013). *Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA, MCTI/CONCEA Brasília/DF*.
- 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." *Neurobiology of disease* **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.
- Costa-Ferro, Z. S. M., F. de Borba Cunha, B. S. de Freitas Souza, M. M. T. Leal, A. A. da Silva, T. I. B. de Bellis Kühn, A. Forte, E. J. Sekiya, M. B. P. Soares and R. R. dos Santos (2014). "Antiepileptic and neuroprotective effects of human umbilical cord blood mononuclear cells in a pilocarpine-induced epilepsy model." *Cytotechnology* **66**(2): 193-199.
- Craig, P., P. Dieppe, S. Macintyre, S. Michie, I. Nazareth and M. Petticrew (2008). "Developing and evaluating complex interventions: the new Medical Research Council guidance." *Bmj* **337**: a1655.

- Curia, G., D. Longo, G. Biagini, R. S. Jones and M. Avoli (2008). "The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy." *Journal of neuroscience methods* **172**(2): 143-157.
- da Mota Gomes, M. (2006). "História da epilepsia: um ponto de vista epistemológico." *J Epilepsy* **12**(3): 161-167.
- da Silva, A. V. and E. A. Cavalheiro (2004). "Epilepsia: uma janela para o cérebro." *Revista Multiciência*(3).
- DaCosta, J. C., M. W. Portuguez, D. R. Marinowic, L. P. Schilling, C. M. Torres, D. I. DaCosta, M. J. M. Carrion, E. F. Raupp, D. C. Machado and R. B. Soder (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." *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* **12**(2): e648-e656.
- Dadmehr, M., F. Amini-Behbahani, B. Eftekhar, B. Minaei and M. Bahrami (2018). "Peritoneum as an origin of epilepsy from the viewpoint of Avicenna." *Neurological Sciences* **39**(6): 1121-1124.
- Damy, S. B., R. S. Camargo, R. Chammas and L. F. P. d. Figueiredo (2010). "Aspectos fundamentais da experimentação animal-aplicações em cirurgia experimental." *Revista da Associação Médica Brasileira* **56**(1): 103-111.
- de Graaf, A. S. and K. S. Kaye (1973). "Epileptic seizures and EEG changes after radiculography with meglumine iothalamate (Conray) and meglumine iocarmate (Dimer-X). A case report." *Psychiatr Neurol Neurochir* **76**(2): 77-82.
- de Jager, W., K. Bourcier, G. T. Rijkers, B. J. Prakken and V. Seyfert-Margolis (2009). "Prerequisites for cytokine measurements in clinical trials with multiplex immunoassays." *BMC immunology* **10**(1): 52.
- de Paula, S., M. F. Pedroso, A. Dalbem, Z. S. Costa, A. Vitola, C. V. Baes, J. L. da Silva, M. A. Friedrich and J. C. da Costa "The therapeutic potential of stem cells for nervous system disease [Abstract in English]." *Scientia Medica* **15**(4).
- De Simoni, M. G., C. Perego, T. Ravizza, D. Moneta, M. Conti, F. Marchesi, A. De Luigi, S. Garattini and A. Vezzani (2000). "Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus." *European Journal of Neuroscience* **12**(7): 2623-2633.
- de Vries, J. E. (1995). "Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin 10." *Annals of medicine* **27**(5): 537-541.
- de Waal Malefyt, R., J. Abrams, B. Bennett, C. G. Figdor and J. E. De Vries (1991). "Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes." *Journal of Experimental Medicine* **174**(5): 1209-1220.
- Del Bigio, M. R. (2010). "Ependymal cells: biology and pathology." *Acta neuropathologica* **119**(1): 55-73.
- Den Haan, J. M. and G. Kraal (2012). "Innate immune functions of macrophage subpopulations in the spleen." *Journal of innate immunity* **4**(5-6): 437-445.
- Dharmasaroja, P. (2009). "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of ischemic stroke." *Journal of Clinical Neuroscience* **16**(1): 12-20.
- Eadie, M. J. (2007). "Cortical epileptogenesis—Hughlings Jackson and his predecessors." *Epilepsia* **48**(11): 2010-2015.
- Eadie, M. J. and P. F. Bladin (2001). *A disease once sacred: a history of the medical understanding of epilepsy*, John Libbey Eastleigh.
- Engel, J., T. L. Babb and P. Crandall (1989). *Surgical treatment of epilepsy: opportunities for research into basic mechanisms of human brain function. Advances in Stereotactic and Functional Neurosurgery 8*, Springer: 3-8.
- Ennaceur, A. and J. Delacour (1988). "A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data." *Behavioural brain research* **31**(1): 47-59.
- Eyo, U. B., M. Murugan and L. J. Wu (2017). "Microglia–neuron communication in epilepsy." *Glia* **65**(1): 5-18.
- Fabene, P. F., G. N. Mora, M. Martinello, B. Rossi, F. Merigo, L. Ottoboni, S. Bach, S. Angiari, D. Benati and A. Chakir (2008). "A role for leukocyte-endothelial adhesion mechanisms in epilepsy." *Nature medicine* **14**(12): 1377.
- Fabene, P. F., G. N. Mora, M. Martinello, B. Rossi, F. Merigo, L. Ottoboni, S. Bach, S. Angiari, D. Benati and A. Chakir (2008). "A role for leukocyte-endothelial adhesion mechanisms in epilepsy." *Nature medicine* **14**(12): 1377-1383.
- Falco-Walter, J. J., I. E. Scheffer and R. S. Fisher (2018). "The new definition and classification of seizures and epilepsy." *Epilepsy research* **139**: 73-79.
- Feindel, W. (1995). "Role of brain science in the evolution of epilepsy surgery." URL: <http://www.med.mcgill.ca/mjm/v01n02/epilepsy.html>.

- Fernandes, M. J. d. S. (2013). "Epilepsia do lobo temporal: mecanismos e perspectivas." *estudos avançados* **27**(77): 85-98.
- Ferro, Z. S. M. C. (2008). Transplante de células mononucleares da medula óssea na epilepsia experimental induzida por lítio e pilocarpina em ratos. Costa, Jaderson Costa da.
- Fisher, R. S., W. V. E. Boas, W. Blume, C. Elger, P. Genton, P. Lee and J. Engel Jr (2005). "Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)." *Epilepsia* **46**(4): 470-472.
- Franky, J. F. (2004). "La Epilepsia en Colombia Recuento Histórico. Estado Actual al Principio del Milenio y Visión al Futuro." *Medicina* **26**(1): 28-34.
- Frisch, C., A. P. Kudin, C. E. Elger, W. S. Kunz and C. Helmstaedter (2007). "Amelioration of water maze performance deficits by topiramate applied during pilocarpine-induced status epilepticus is negatively dose-dependent." *Epilepsy research* **73**(2): 173-180.
- Fukumura, S., M. Sasaki, Y. Kataoka-Sasaki, S. Oka, M. Nakazaki, H. Nagahama, T. Morita, T. Sakai, H. Tsutsumi and J. D. Kocsis (2018). "Intravenous infusion of mesenchymal stem cells reduces epileptogenesis in a rat model of status epilepticus." *Epilepsy research* **141**: 56-63.
- Gall, C. M. and G. Lynch (2004). Integrins, synaptic plasticity and epileptogenesis. *Recent Advances in Epilepsy Research*, Springer: 12-33.
- García-Albea, E. (1999). "Historia de la epilepsia." Massou. Barcelona.
- Gastaut, H. (1973). "Dictionary of epilepsy."
- Geissmann, F., M. G. Manz, S. Jung, M. H. Sieweke, M. Merad and K. Ley (2010). "Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells." *Science* **327**(5966): 656-661.
- Gendron, A., J. Teitelbaum, C. Cossette, S. Nuara, M. Dumont, D. Geadah, P. du Souich and E. Kouassi (2002). "Temporal effects of left versus right middle cerebral artery occlusion on spleen lymphocyte subsets and mitogenic response in Wistar rats." *Brain research* **955**(1-2): 85-97.
- Gloor, P. and A. H. Guberman (1997). "The temporal lobe & limbic system." *Canadian Medical Association Journal* **157**(11): 1597.
- Gordon, S. and P. R. Taylor (2005). "Monocyte and macrophage heterogeneity." *Nature reviews immunology* **5**(12): 953.
- Gorter, J. A., E. A. van Vliet, E. Aronica, T. Breit, H. Rauwerda, F. H. L. da Silva and W. J. Wadman (2006). "Potential new antiepileptogenic targets indicated by microarray analysis in a rat model for temporal lobe epilepsy." *The journal of neuroscience* **26**(43): 11083-11110.
- Graeber, M. B. and W. J. Streit (2010). "Microglia: biology and pathology." *Acta neuropathologica* **119**(1): 89-105.
- Gröticke, I., K. Hoffmann and W. Löscher (2007). "Behavioral alterations in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice." *Experimental neurology* **207**(2): 329-349.
- Gurevitch, O., B. G. S. Kurkalli, T. Prigozhina, J. Kasir, A. Gaft and S. Slavin (2003). "Reconstruction of cartilage, bone, and hematopoietic microenvironment with demineralized bone matrix and bone marrow cells." *Stem Cells* **21**(5): 588-597.
- Handforth, A., C. DeGiorgio, S. Schachter, B. Uthman, D. Naritoku, E. Tecoma, T. Henry, S. Collins, B. Vaughn and R. Gilmartin (1998). "Vagus nerve stimulation therapy for partial-onset seizures: a randomized active-control trial." *Neurology* **51**(1): 48-55.
- Hausmann, E., N. Berman, Y.-Y. Wang, J. B. Meara, G. W. Wood and R. M. Klein (1998). "Selective chemokine mRNA expression following brain injury." *Brain Res* **788**(1-2): 49.
- 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 research* **31**(1): 73-84.
- Hoppe, C., C. E. Elger and C. Helmstaedter (2007). "Long-term memory impairment in patients with focal epilepsy." *Epilepsia* **48**: 26-29.
- Jankowsky, J. L. and P. H. Patterson (2001). "The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae." *Progress in neurobiology* **63**(2): 125-149.
- Jarero-Basulto, J., Y. Gasca-Martínez, M. Rivera-Cervantes, M. Ureña-Guerrero, A. Fera-Velasco and C. Beas-Zarate (2018). "Interactions between epilepsy and plasticity." *Pharmaceuticals* **11**(1): 17.

- Jiang, Y., B. N. Jahagirdar, R. L. Reinhardt, R. E. Schwartz, C. D. Keene, X. R. Ortiz-Gonzalez, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund and M. Blackstad (2002). "Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow." *Nature* **418**(6893): 41.
- Jung, W.-C., J.-P. Levesque and M. J. Ruitenberg (2017). *It takes nerve to fight back: the significance of neural innervation of the bone marrow and spleen for immune function. Seminars in cell & developmental biology*, Elsevier.
- Kanner, A. M. (2006). "Depression and epilepsy: a new perspective on two closely related disorders." *Epilepsy currents* **6**(5): 141-146.
- Kanner, A. M. and A. Balabanov (2002). "Depression and epilepsy: how closely related are they?" *Neurology* **58**(8 suppl 5): S27-S39.
- Karbowski, K. (1997). *Samuel-Auguste Tissot 1728-1797: on the 200th anniversary of his death*.
- Karnoub, A. E., A. B. Dash, A. P. Vo, A. Sullivan, M. W. Brooks, G. W. Bell, A. L. Richardson, K. Polyak, R. Tubo and R. A. Weinberg (2007). "Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis." *Nature* **449**(7162): 557.
- Kirmani, M., B. F. FAES, D. Shetty, K. Ashok and L. A. Shapiro (2018). "New Directions in the Management of Status Epilepticus." *Frontiers in neurology* **9**: 994.
- Klitgaard, H. (2005). "Antiepileptic drug discovery: lessons from the past and future challenges." *Acta Neurologica Scandinavica* **112**: 68-72.
- 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." *Scientific reports* **5**: 8075.
- Korbling, M. and Z. Estrov (2003). "Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept?" *N Engl J Med* **349**(6): 570-582.
- Körbling, M. and Z. Estrov (2003). "Adult stem cells for tissue repair—a new therapeutic concept?" *New England Journal of Medicine* **349**(6): 570-582.
- Kubera, M., B. a. Budziszewska, A. Basta-Kaim, A. Zajicova, V. Holan and W. a. a. Lasoń (2001). "Immunoreactivity in kainate model of epilepsy." *Polish journal of pharmacology* **53**(5): 541-546.
- Kuper, C., E. De Heer, H. Van Loveren and J. Vos (2002). "Immune system." *Handbook of toxicological pathology* **2**: 585-646.
- Kuschel, R., M. H. Deininger, R. Meyermann, A. Bornemann, Z. Yablonka-Reuveni and H. J. Schluesener (2000). "Allograft inflammatory factor-1 is expressed by macrophages in injured skeletal muscle and abrogates proliferation and differentiation of satellite cells." *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **59**(4): 323-332.
- Kwan, P. and M. J. Brodie (2006). "Refractory epilepsy: mechanisms and solutions." *Expert review of neurotherapeutics* **6**(3): 397-406.
- Lanska, D. J. (2002). "JL Corning and vagal nerve stimulation for seizures in the 1880s." *Neurology* **58**(3): 452-459.
- Leal, M. M. T., Z. S. M. Costa-Ferro, B. S. de Freitas Souza, C. M. Azevedo, T. M. Carvalho, C. M. Kaneto, R. H. Carvalho, R. R. dos Santos and M. B. P. Soares (2014). "Early transplantation of bone marrow mononuclear cells promotes neuroprotection and modulation of inflammation after status epilepticus in mice by paracrine mechanisms." *Neurochemical research* **39**(2): 259-268.
- Lee, S.-T., K. Chu, K.-H. Jung, S.-J. Kim, D.-H. Kim, K.-M. Kang, N. H. Hong, J.-H. Kim, J.-J. Ban and H.-K. Park (2007). "Anti-inflammatory mechanism of intravascular neural stem cell transplantation in haemorrhagic stroke." *Brain* **131**(3): 616-629.
- León, B., M. López-Bravo and C. Ardavín (2007). "Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania." *Immunity* **26**(4): 519-531.
- Lévesque, M. and M. Avoli (2013). "The kainic acid model of temporal lobe epilepsy." *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **37**(10): 2887-2899.
- Lewis, S. M., A. Williams and S. C. Eisenbarth (2019). "Structure and function of the immune system in the spleen." *Science immunology* **4**(33): eaau6085.
- Li, L., J. F. Elliott and T. R. Mosmann (1994). "IL-10 inhibits cytokine production, vascular leakage, and swelling during T helper 1 cell-induced delayed-type hypersensitivity." *The Journal of Immunology* **153**(9): 3967-3978.

- Li, Y., L. Zhao, H. Fu, Y. Wu and T. Wang (2015). "Ulinastatin suppresses lipopolysaccharide induced neuro-inflammation through the downregulation of nuclear factor- $\kappa$ B in SD rat hippocampal astrocyte." *Biochem Biophys Res Commun* **458**(4): 763-770.
- Lindvall, O. and A. Björklund (2004). "Cell therapy in Parkinson's disease." *NeuroRx* **1**(4): 382-393.
- Liu, Z. J., Y. Zhuge and O. C. Velazquez (2009). "Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells." *Journal of cellular biochemistry* **106**(6): 984-991.
- Marchi, N., Q. Fan, C. Ghosh, V. Fazio, F. Bertolini, G. Betto, A. Batra, E. Carlton, I. Najm and T. Granata (2009). "Antagonism of peripheral inflammation reduces the severity of status epilepticus." *Neurobiology of disease* **33**(2): 171-181.
- Marchi, N., T. Granata, C. Ghosh and D. Janigro (2012). "Blood-brain barrier dysfunction and epilepsy: pathophysiologic role and therapeutic approaches." *Epilepsia* **53**(11): 1877-1886.
- Marchi, N., A. J. Johnson, V. Puvenna, H. L. Johnson, W. Tierney, C. Ghosh, L. Cucullo, P. F. Fabene and D. Janigro (2011). "Modulation of peripheral cytotoxic cells and ictogenesis in a model of seizures." *Epilepsia* **52**(9): 1627-1634.
- Marchi, N., E. Oby, A. Batra, L. Uva, M. De Curtis, N. Hernandez, A. Van Boxel-Dezaire, I. Najm and D. Janigro (2007). "In vivo and in vitro effects of pilocarpine: relevance to ictogenesis." *Epilepsia* **48**(10): 1934-1946.
- Marinowic, D., M. Domingues, D. Machado and J. DaCosta (2015). "The expression of pluripotency genes and neuronal markers after neurodifferentiation in fibroblasts co-cultured with human umbilical cord blood mononuclear cells." *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* **51**(1): 26-35.
- Marinowic, D. R., D. V. Da Silva, A. D. Sebben, D. C. Machado and J. C. Da Costa (2016). "Minimal Detectable Amounts of Exogenous DNA after Systemic Cell Engraftment." *Archives of Clinical and Biomedical Research* **1**(1): 1-8.
- Masia, S. L. and O. Devinsky (2000). "Epilepsy and behavior: a brief history." *Epilepsy & Behavior* **1**(1): 27-36.
- Mathern, G. W., P. D. Adelson, L. D. Cahan and J. P. Leite (2002). Hippocampal neuron damage in human epilepsy: Meyer's hypothesis revisited. *Progress in brain research, Elsevier*. **135**: 237-251.
- Mathern, G. W., C. C. Giza, S. Yudovin, H. V. Vinters, W. J. Peacock, D. A. Shewmon and W. D. Shields (1999). "Postoperative seizure control and antiepileptic drug use in pediatric epilepsy surgery patients: the UCLA experience, 1986-1997." *Epilepsia* **40**(12): 1740-1749.
- Mayhall, E. A., N. Paffett-Lugassy and L. I. Zon (2004). "The clinical potential of stem cells." *Current opinion in cell biology* **16**(6): 713-720.
- 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**(8): 2071-2083.
- McNamara, J. O. (1994). "Cellular and molecular basis of epilepsy." *The journal of neuroscience* **14**(6): 3413-3425.
- Mebius, R. E. and G. Kraal (2005). "Structure and function of the spleen." *Nature reviews immunology* **5**(8): 606.
- 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.
- Mello, P. B., F. Benetti, M. Cammarota and I. Izquierdo (2009). "Physical exercise can reverse the deficit in fear memory induced by maternal deprivation." *Neurobiology of learning and memory* **92**(3): 364-369.
- Morrison, S. J., N. M. Shah and D. J. Anderson (1997). "Regulatory mechanisms review in stem cell biology." *Cell* **88**: 287-298.
- Moshé, S. L., E. Perucca, P. Ryvlin and T. Tomson (2015). "Epilepsy: new advances." *The Lancet* **385**(9971): 884-898.
- Müller, C. J., I. Gröticke, M. Bankstahl and W. Löscher (2009). "Behavioral and cognitive alterations, spontaneous seizures, and neuropathology developing after a pilocarpine-induced status epilepticus in C57BL/6 mice." *Experimental neurology* **219**(1): 284-297.
- Munthe-Kaas, A., T. Berg, P. Seglen and R. Seljelid (1975). "Mass isolation and culture of rat kupffer cells." *Journal of Experimental Medicine* **141**(1): 1-10.
- Myskiw, J. C., J. I. Rossato, L. R. Bevilacqua, J. H. Medina, I. Izquierdo and M. Cammarota (2008). "On the participation of mTOR in recognition memory." *Neurobiology of learning and memory* **89**(3): 338-351.
- Nadler, J. V. (1981). "Kainic acid as a tool for the study of temporal lobe epilepsy." *Life sciences* **29**(20): 2031-2042.

- Niessen, H. G., F. Angenstein, S. Vielhaber, C. Frisch, A. Kudin, C. E. Elger, H. J. Heinze, H. Scheich and W. S. Kunz (2005). "Volumetric magnetic resonance imaging of functionally relevant structural alterations in chronic epilepsy after pilocarpine-induced status epilepticus in rats." *Epilepsia* **46**(7): 1021-1026.
- Nolte, M. A., A. Hamann, G. Kraal and R. E. Mebius (2002). "The strict regulation of lymphocyte migration to splenic white pulp does not involve common homing receptors." *Immunology* **106**(3): 299-307.
- Oby, E. and D. Janigro (2006). "The blood-brain barrier and epilepsy." *Epilepsia* **47**(11): 1761-1774.
- Offner, H., S. Subramanian, S. M. Parker, M. E. Afentoulis, A. A. Vandembark and P. D. Hurn (2006). "Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **26**(5): 654-665.
- Offner, H., S. Subramanian, S. M. Parker, C. Wang, M. E. Afentoulis, A. Lewis, A. A. Vandembark and P. D. Hurn (2006). "Splenic atrophy in experimental stroke is accompanied by increased regulatory T cells and circulating macrophages." *The Journal of Immunology* **176**(11): 6523-6531.
- Pagni, C. A. and F. Zenga (2006). "Prevention and treatment of post-traumatic epilepsy." *Expert review of neurotherapeutics* **6**(8): 1223-1233.
- Paiva-Oliveira, E. L., A. C. Silva, R. M. Silva, L. A. Sevenini, H. A. Melo, J. M. Lagrota-Candido and T. Quirico-Santos (2012). "Inflamassoma e sua repercussão clínica: revisão da literatura." *Revista de Ciências Médicas e Biológicas* **11**(1): 96-102.
- Panebianco, M., A. Rigby, J. Weston and A. G. Marson (2015). "Vagus nerve stimulation for partial seizures." *Cochrane Database of Systematic Reviews*(4).
- Pavlov, V. A. and K. J. Tracey (2015). "Neural circuitry and immunity." *Immunologic research* **63**(1-3): 38-57.
- Pavlov, V. A., W. R. Parrish, M. Rosas-Ballina, M. Ochani, M. Puerta, K. Ochani, S. Chavan, Y. Al-Abed and K. J. Tracey (2009). "Brain acetylcholinesterase activity controls systemic cytokine levels through the cholinergic anti-inflammatory pathway." *Brain, behavior, and immunity* **23**(1): 41-45.
- Pearce, J. (1998). "Early accounts of epilepsy: a synopsis." *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* **64**(5): 679-679.
- Penry, J. K. and J. C. Dean (1990). "Prevention of intractable partial seizures by intermittent vagal stimulation in humans: preliminary results." *Epilepsia* **31**: S40-S43.
- Pernot, F., C. Heinrich, L. Barbier, A. Peinnequin, P. Carpentier, F. Dhote, V. Baille, C. Beaup, A. Depaulis and F. Dorandeu (2011). "Inflammatory changes during epileptogenesis and spontaneous seizures in a mouse model of mesiotemporal lobe epilepsy." *Epilepsia* **52**(12): 2315-2325.
- Pestronk, A., D. Cornblath, A. Ilyas, H. Baba, R. Quarles, J. Griffin, K. Alderson and R. Adams (1988). "A treatable multifocal motor neuropathy with antibodies to GM1 ganglioside." *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* **24**(1): 73-78.
- Pitkänen, A., K. Lukasiuk, F. E. Dudek and K. J. Staley (2015). "Epileptogenesis." *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*: a022822.
- Pitkänen, A. and T. P. Sutula (2002). "Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy." *The Lancet Neurology* **1**(3): 173-181.
- Pombero, A., R. Garcia-Lopez and S. Martinez (2016). "Brain mesenchymal stem cells: physiology and pathological implications." *Development, growth & differentiation* **58**(5): 469-480.
- Presnell, S. C., B. Petersen and M. Heidaran (2002). *Stem cells in adult tissues*. Seminars in cell & developmental biology, Elsevier.
- Racine, R. J. (1972). "Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure." *Electroencephalography and clinical neurophysiology* **32**(3): 281-294.
- Rana, A. and A. E. Musto (2018). "The role of inflammation in the development of epilepsy." *Journal of neuroinflammation* **15**(1): 144.
- Ravizza, T., K. Boer, S. Redeker, W. Spliet, P. Van Rijen, D. Troost, A. Vezzani and E. Aronica (2006). "The IL-1 $\beta$  system in epilepsy-associated malformations of cortical development." *Neurobiology of disease* **24**(1): 128-143.
- Ravizza, T., B. Gagliardi, F. Noé, 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." *Neurobiology of disease* **29**(1): 142-160.
- Reddy, D. and R. Kuruba (2013). "Experimental models of status epilepticus and neuronal injury for evaluation of therapeutic interventions." *International journal of molecular sciences* **14**(9): 18284-18318.

- Riazi, K., M. A. Galic and Q. J. Pittman (2010). "Contributions of peripheral inflammation to seizure susceptibility: cytokines and brain excitability." *Epilepsy research* **89**(1): 34-42.
- Riggs, A. J. and J. E. Riggs (2005). "Epilepsy's role in the historical differentiation of religion, magic, and science." *Epilepsia* **46**(3): 452-453.
- Rogawski, M. A. and R. J. Porter (1990). "Antiepileptic drugs: pharmacological mechanisms and clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds." *Pharmacological Reviews* **42**(3): 223-286.
- Rosas-Ballina, M., M. Ochani, W. R. Parrish, K. Ochani, Y. T. Harris, J. M. Huston, S. Chavan and K. J. Tracey (2008). "Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**(31): 11008-11013.
- Rossato, J. I., L. R. Bevilaqua, J. C. Myskiw, J. H. Medina, I. Izquierdo and M. Cammarota (2007). "On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory." *Learning & Memory* **14**(1-2): 36-46.
- Rous, F. P. (1908). "The effect of pilocarpine on the output of lymphocytes through the thoracic duct." *Journal of Experimental Medicine* **10**(3): 329-342.
- Saijo, K. and C. K. Glass (2011). "Microglial cell origin and phenotypes in health and disease." *Nature Reviews Immunology* **11**(11): 775.
- Sander, J. and Y. Hart (1999). *Epilepsia: um guia prático*, Merit.
- Santos, N., R. Marques, L. Correia, R. Sinigaglia-Coimbra, L. Calderazzo, E. Sanabria and E. A. Cavalheiro (2000). "Multiple pilocarpine-induced status epilepticus in developing rats: a long-term behavioral and electrophysiological study." *Epilepsia* **41**: S57-S63.
- Schachter, S. C. and C. B. Saper (1998). "Vagus nerve stimulation." *Epilepsia* **39**(7): 677-686.
- Schluesener, H. J., K. Seid, J. Kretzschmar and R. Meyermann (1998). "Allograft-inflammatory factor-1 in rat experimental autoimmune encephalomyelitis, neuritis, and uveitis: Expression by activated macrophages and microglial cells." *Glia* **24**(2): 244-251.
- Schroeter, M., S. Jander, O. Witte and G. Stoll (1999). "Heterogeneity of the microglial response in photochemically induced focal ischemia of the rat cerebral cortex." *Neuroscience* **89**(4): 1367-1377.
- Schwab, M. E. and D. Bartholdi (1996). "Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord." *Physiological reviews* **76**(2): 319-370.
- Shen, Z., J. M. Ajmo, C. Q. Rogers, X. Liang, L. Le, M. M. Murr, Y. Peng and M. You (2009). "Role of SIRT1 in regulation of LPS-or two ethanol metabolites-induced TNF- $\alpha$  production in cultured macrophage cell lines." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **296**(5): G1047-G1053.
- Somera-Molina, K. C., B. Robin, C. A. Somera, C. Anderson, C. Stine, S. Koh, H. A. Behanna, L. J. Van Eldik, D. M. Watterson and M. S. Wainwright (2007). "Glial activation links early-life seizures and long-term neurologic dysfunction: evidence using a small molecule inhibitor of proinflammatory cytokine upregulation." *Epilepsia* **48**(9): 1785-1800.
- Sperk, G. (1994). "Kainic acid seizures in the rat." *Progress in neurobiology* **42**(1): 1-32.
- Squire, L. R. (2004). "Memory systems of the brain: a brief history and current perspective." *Neurobiology of learning and memory* **82**(3): 171-177.
- Steinhäuser, C. and G. Seifert (2002). "Glial membrane channels and receptors in epilepsy: impact for generation and spread of seizure activity." *European journal of pharmacology* **447**(2-3): 227-237.
- Stewart, I. B. and D. C. McKenzie (2002). "The human spleen during physiological stress." *Sports Medicine* **32**(6): 361-369.
- Suttie, A. W. (2006). "Histopathology of the spleen." *Toxicologic pathology* **34**(5): 466-503.
- Swirski, F. K., M. Nahrendorf, M. Etzrodt, M. Wildgruber, V. Cortez-Retamozo, P. Panizzi, J.-L. Figueiredo, R. H. Kohler, A. Chudnovskiy and P. Waterman (2009). "Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites." *Science* **325**(5940): 612-616.
- Temkin, E. (1971). Apparatus for measuring body fluid pressure, Google Patents.
- Temkin, N. R. (2001). "Antiepileptogenesis and seizure prevention trials with antiepileptic drugs: meta-analysis of controlled trials." *Epilepsia* **42**(4): 515-524.
- 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." *Behavioural brain research* **9**(3): 315-335.

- Tyler, K. L. (1984). "Hughlings Jackson: the early development of his ideas on epilepsy." *Journal of the history of medicine and allied sciences* **39**(1): 55-64.
- 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." *Current protocols in stem cell biology* **38**(1): 2D. 7.1-2D. 7.47.
- Van Furth, R., Z. Cohn, J. Hirsch, J. Humphrey, W. Spector and H. Langevoort (1972). "The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells." *Bulletin of the World Health Organization* **46**(6): 845.
- Van Gassen, K. L., M. De Wit, M. J. G. Koerkamp, M. G. Rensen, P. C. Van Rijen, F. C. Holstege, D. Lindhout and P. N. De Graan (2008). "Possible role of the innate immunity in temporal lobe epilepsy." *Epilepsia* **49**(6): 1055-1065.
- Vendrame, M., C. Gemma, K. R. Pennypacker, P. C. Bickford, C. Davis Sanberg, P. R. Sanberg and A. E. Willing (2006). "Cord blood rescues stroke-induced changes in splenocyte phenotype and function." *Experimental neurology* **199**(1): 191-200.
- Vendrame, M., C. Gemma, K. R. Pennypacker, P. C. Bickford, C. D. Sanberg, P. R. Sanberg and A. E. Willing (2006). "Cord blood rescues stroke-induced changes in splenocyte phenotype and function." *Experimental neurology* **199**(1): 191-200.
- 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 sciences* **89**(7): 229-234.
- Vezzani, A., S. Balosso and T. Ravizza (2012). *Inflammation and epilepsy*. Handbook of clinical neurology, Elsevier. **107**: 163-175.
- Vezzani, A. and T. Granata (2005). "Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence." *Epilepsia* **46**(11): 1724-1743.
- Vezzani, A., G. Sperk and W. F. Colmers (1999). "Neuropeptide Y: emerging evidence for a functional role in seizure modulation." *Trends in neurosciences* **22**(1): 25-30.
- Vezzani, A. and B. Viviani (2015). "Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability." *Neuropharmacology* **96**: 70-82.
- Vida, G., G. Peña, E. A. Deitch and L. Ulloa (2011). " $\alpha 7$ -cholinergic receptor mediates vagal induction of splenic norepinephrine." *The Journal of Immunology* **186**(7): 4340-4346.
- Walker, P. A., S. K. Shah, F. Jimenez, M. H. Gerber, H. Xue, R. Cutrone, J. A. Hamilton, R. W. Mays, R. Deans and S. Pati (2010). "Intravenous multipotent adult progenitor cell therapy for traumatic brain injury: preserving the blood brain barrier via an interaction with splenocytes." *Experimental neurology* **225**(2): 341-352.
- Wichert-Ana, L., C. G. Carlotti Júnior, J. A. Assirati, H. R. Machado, U. G. Meneghelli and A. C. Sakamoto (2003). "Landmarks in history of epilepsy surgery." *Journal of epilepsy and clinical neurophysiology* **9**(2): 77-86.
- Yang, J. C. and S. A. Rosenberg (2016). *Adoptive T-cell therapy for cancer*. Advances in immunology, Elsevier. **130**: 279-294.
- Yi, L., H. Xiao, M. Xu, X. Ye, J. Hu, F. Li, M. Li, C. Luo, S. Yu and X. Bian (2011). "Glioma-initiating cells: a predominant role in microglia/macrophages tropism to glioma." *Journal of neuroimmunology* **232**(1-2): 75-82.
- Youn, Y., S. Kim, I. Sung, S. Chung, Y. Kim and I. Lee (2012). "Serial Examination of Serum IL-8, IL-10 and IL-1Ra Levels is Significant in Neonatal Seizures Induced by Hypoxic-Ischaemic Encephalopathy 1." *Scandinavian journal of immunology* **76**(3): 286-293.
- Zanirati, G., P. N. Azevedo, D. R. Marinowic, F. Rodrigues, A. C. de Oliveira Dias, G. T. Venturin, S. Greggio, F. Simão and J. C. DaCosta (2015). "Transplantation of bone marrow mononuclear cells modulates hippocampal expression of growth factors in chronically epileptic animals." *CNS neuroscience & therapeutics* **21**(5): 463-471.
- Zanirati, G., P. N. Azevedo, G. T. Venturin, S. Greggio, A. M. Alcará, E. R. Zimmer, P. K. Feltes and J. C. DaCosta (2018). "Depression comorbidity in epileptic rats is related to brain glucose hypometabolism and hypersynchronicity in the metabolic network architecture." *Epilepsia* **59**(5): 923-934.
- Zattoni, M., M. L. Mura, F. Deprez, R. A. Schwendener, B. Engelhardt, K. Frei and J.-M. Fritschy (2011). "Brain infiltration of leukocytes contributes to the pathophysiology of temporal lobe epilepsy." *Journal of Neuroscience* **31**(11): 4037-4050.
- Zhai, H., F. L. Heppner and S. E. Tsirka (2011). "Microglia/macrophages promote glioma progression." *Glia* **59**(3): 472-485.

Zhong, Q., B.-X. Ren and F.-R. Tang (2016). "Neurogenesis in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy." *Current neurology and neuroscience reports* **16**(2): 20.

Kanner AM, Balabanov A. Depression and epilepsy. How closely related are they? *Neurology*. 2002; 58:S27-S39.).



**Artigo original**

Segue artigo submetido para a revista *Cytotherapy*

**Full title:**

**Spleen plays a key role in efficiency of transplantation of bone marrow mononuclear cells in experimental temporal lobe epilepsy**

**Running title:**

**Role of spleen in BMMC transplantation in rats**

Daniele Vieira da Silva<sup>1,2</sup>, Gutierre Neves de Oliveira<sup>1,3</sup>, Ricardo Bertinatto<sup>1,3</sup>, Ismael Plentz, Denise Cantareli Machado<sup>1,2</sup>, Daniel Rodrigo Marinowic<sup>1,2</sup>, Zaquer S M Costa-Ferro<sup>2</sup>, Jaderson Costa da Costa<sup>1,2,3</sup>.

1-PUCRS- Pós-graduação em Pediatria e saúde da Criança-Porto Alegre, RS, Brazil

2-PUCRS-Brain Institute of Rio Grande do Sul (BraIns)- Porto Alegre, RS, Brazil

3-PUCRS-Escola de medicina, Porto Alegre, RS, Brazil

**Correponding author**

**Jaderson Costa da Costa**

**[jcc@pucrs.br](mailto:jcc@pucrs.br)**

## Abstract

**Background aims:** Epilepsy is the most common serious neurological disorder, affecting more than 65 million people worldwide. Several investigations in both humans and animals have shown the effectiveness of treatment with bone marrow mononuclear cells (BMMC) in epilepsy. **Methods;** We evaluated the effects of intravenous BMMC on pilocarpine-treated rats, splenectomized or not. Animals were divided in groups for qRT-PCR analysis and cognitive improvements in spatial memory. **(3) Results;** The results showed that splenectomy seemed to reduce the progress of the condition during the SE period and significantly diminished mortality associated with SE. Our experiments also confirmed the presence of EGFP cell mRNA in brain and spleen tissues 12 or 24 hours after SE. The BMMC treatment alone significantly decreased pro-inflammatory cytokines (IL1- $\beta$  and TNF- $\alpha$ ) and increased anti-inflammatory cytokines (IL-10) and alleviated pilocarpine-induced memory impairments, but not in all splenectomized groups after SE. **(4) Discussion;** These results indicate improvement of learning ability and spatial memory after BMMC treatment in the post-SE states, but not in splenectomized animals. Our results also demonstrate the therapeutic benefits of BMMCs transplantation in epileptic rats, which are likely due to the ability of these cells to produce neuroprotective and anti-inflammatory cytokines. Furthermore, our study suggests that the importance of the spleen in immunomodulatory events may be due to its role as an ancillary site for BMMC.

**Key word:** Learning and memory impairment, Neuroinflammation, Pilocarpine, Spleen, Status epilepticus.

## Abbreviations

Blood-brain barrier (BBB); bone marrow mononuclear cells (BMMC); brain-derived neurotrophic factor (BDNF); electroencephalogram (EEG); enhanced green fluorescent protein (EGFP+); glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF); interleukin-1 beta (IL1- $\beta$ ); interleukin-6 (IL-6); interleukin-10 (IL-10); natural killer (NK); Status epilepticus (SE);

temporal lobe epilepsy (TLE); the Morris water maze (MWM); tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ); vascular endothelial growth factor (VEGF);

## **Introduction**

Epilepsy affects more than 65 million people worldwide [1], over 30% of whom cannot be satisfactorily controlled [2]. Status epilepticus (SE) is characterized by abnormal electrical discharges in the brain and seizures lasting 30 minutes or longer [3] and is frequently associated with significantly high morbidity and mortality rates [4,5]. Similar to human patients, rats injected with pilocarpine develop SE followed by a silent period in which no overt behavioral seizures are detected, prior to spontaneous recurrent seizures and subsequent development of temporal lobe epilepsy (TLE), with cognitive comorbidities such as hippocampal-dependent spatial learning and memory deficits [6,7]. We and others have demonstrated that spatial memory impairments are also commonly found in rats after pilocarpine seizures [8, 9, 10].

Recent data from clinical and experimental studies have shown that proinflammatory events leading to seizures participate in development of SE and occur in the brain and periphery [11,12,13,14]. Several studies show activation of the innate immune response, including microglia and astrocytes that produce specific inflammatory cytokines, which coincides with increases to the permeability of the blood-brain barrier (BBB) allowing infiltration of monocytes and macrophages into the brain, further enhancing the inflammatory process [15,16,17]. Specifically, BBB leakage results in extravasation of albumin and subsequent activation of glia and inflammatory responses [18] thereby allowing infiltration of peripheral immune cells and release of inflammatory cytokines [19] and gradual development of epilepsy. Our and others' experimental data have demonstrated an augmentation of levels of intravascular peripheral proinflammatory cytokines in association with seizure disorders [13,16,20,21].

Development of effective therapies is therefore urgently required. In recent years, we have studied an alternative approach, involving treatment with bone marrow mononuclear cells (BMMC). Our prior studies have reported that infused BMMC can reduce the number of seizures and the number of neurons lost, influencing the microenvironment of the injured region and promoting neurogenesis [13,21,22] we have also demonstrated cognitive benefits [9], secretion of growth factors (e.g., brain-derived neurotrophic factor (BDNF), glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF), and vascular endothelial growth factor (VEGF) [23]. In addition, our prior data has shown decreased levels of proinflammatory cytokines (tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 beta (IL1- $\beta$ ) and interleukin-6 (IL-6) and increased levels of anti-inflammatory cytokines (interleukin-10 (IL-10)) in the brain and serum of treated rats [13,21]. Our clinical data demonstrate that BMMC therapy resulted in neurological and cognitive improvement in all patients, including a reduction in seizure frequency and a decrease in theta activity and spike density in electroencephalogram (EEG) recordings. A significant and cognitive improvement in was observed in adult patients [24].

In the course of these investigations, we observed that the transplanted cells migrated to the spleen, hence our interest in the contribution of peripheral immune organs to the pathophysiology of epilepsy, specifically the spleen. The spleen is a complex organ with highly organized compartmentalization and an intricate microcirculatory system that acts as the main filter for the blood and is divided into two distinct zones: the red pulp and white pulp [25]. The main role of the spleen is to regulate the immune system, as it is the central organ of cellular and humoral immunity [26] and directly or indirectly influences the central nervous system [27]. The spleen plays an important role in adaptive immunity and mobilization of monocytes/macrophages following tissue injury [28]. As early as the 9<sup>th</sup>–12<sup>th</sup> century AD, in his book the Canon of Medicine, Avicenna considered that some types of epilepsy were associated with the splenic system. In his writings, Avicenna classified epilepsy into two groups

based on the origin of attack. The first type of epilepsy comprises brain disorders, whereas in the second scenario, the brain is healthy, so the seizure is associated with other diseases of other organs, such as the spleen, or the whole body [29]. The interaction between pilocarpine and the immune system was suggested by Rous (1908) [30], who noted that intravenous injection of pilocarpine in dogs causes a rapid and considerable increase in lymphocyte output through the thoracic duct. Currently, clinical data from patients with hippocampal sclerosis suggest that peripheral and central nervous system inflammation is involved in the pathogenesis of epilepsy (revised by Marchi et al., 2014 [17]). The study of patients with temporal lobe epilepsy showed an increase that circulating natural killer (NK) and T helper CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T lymphocytes cell immune levels during the interictal period. These studies have shown that activation of the peripheral immune system, and changes in cytokines occur at the time of seizure [17].

Based on our previous studies that support involvement of BMNC in regulation of inflammation, the present study aimed to investigate BMNC modulation of gene expression of the cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL10 and AIF-1 in both brain and spleen of epileptic rats and correlations with behavioral deficits in splenectomized epileptic rats.

## **Materials and methods**

### **Experimental animals**

174 male Wistar rats (45 days postnatal age) were obtained from the Animal house at the Centro de Modelos Biológicos Experimentais at the Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Animals were housed in a ventilated rack with food and water ad libitum, under a 12 h controlled light/dark photoperiod cycle (lights on at 7:00 am) with room temperature adjusted to  $21 \pm 2$  °C. All procedures were conducted in accordance with the

National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the Brazilian Law for Care and Use of Laboratory Animals (Law 11794/2008), and were approved in advance by the university's ethics committee, Comissão de Ética de Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CEUA 15/00480-PUCRS).

### **Splenectomy**

Rats were anesthetized with Xylazine ip. (5-10 mg/kg) and Ketamine ip. (40-75 mg/kg). Splenectomy was conducted following a protocol described previously by Ajmo [31]. Splenectomy was performed by making a 2-cm dorsal midline skin incision at the caudal terminus at the level of the 13th rib. With blunt forceps, the spleen (with accompanying blood vessels and pancreatic tissue) was exteriorized through the incision. The spleen was removed and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The abdominal wall incision was closed with sutures. Sham surgery was performed in the same manner but without removing the spleen. Rats were observed and treated with analgesic Acetaminophen (1-2mg / ml in drinking water) for the first 48 hours [32]. Rats were allowed to recover for 1 week before SE.

### **SE induction**

Using a method described previously [23], epilepsy was initiated by intraperitoneal injection of 320 mg/kg pilocarpine hydrochloride (Sigma Chemical Co.). Scopolamine methyl nitrate (Sigma Chemical Co.) was injected 30 min prior to pilocarpine injection to minimize the peripheral autonomic effect. Rats exhibiting stage five [33] convulsive seizure were defined as epileptic rats. Epileptic rats were administered Diazepam (10 mg/kg) 60 min after the epileptic seizure. Animals were allocated to the following eight groups: (1) Naïve (the normal control rats), (2) Sham (Surgery control rats), (3) Splenec (splenectomized control rats), (4) BMCC (BMCC control rats); (5) Pilo (referred to as SE rats); and (6) Pilo/Splenec (splenectomized rats subjected to SE), (7) Pilo/BMCC and (8) Pilo/Splenec/BMCC (rats given both pilocarpine and BMCC transplantation) (Table 1).

### **BMMC preparation and transplantation**

Bone marrow cells were harvested from EGFP transgenic mice. The animals were euthanized with 200  $\mu$ l of 8% ketamine hydrochloride (Cristália, Brazil) and 2% chlorpromazine (União Química, Brazil), followed by dissection. Fresh bone marrow was extracted from the humerus, femurs and tibiae by flushing with PBS. After centrifugation, the cell pellet was resuspended with RPMI medium and fractionated on a density gradient generated by centrifugation over a Ficoll-Hypaque solution (Histopaque 1119 and 1077, 1:1; Sigma, St. Louis, MO) at  $400 \times g$  for 30 min at room temperature. The mononuclear fraction was collected and washed with DPBS. Cell concentrations were determined with a Neubauer counting chamber and the number of viable cells by trypan blue exclusion. Cells were characterized by flow cytometry; these cells strongly expressed CD11b 45.36%, CD19b 53.44%, CD19 58.90%, CD31 58.30%, CD105 54.87%, CD106 59.04%, SCA1 55.86%, CD44 58.26%, CD45 61.12%, CD73 57.27% and CD90 1.03% (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Labeled cells were collected and analyzed using a FACSCalibur cytometer [34].

### **Transplantation of BMMC**

BMMC were prepared for transplantation in saline and a total of  $1 \times 10^7$  cells in 100  $\mu$ L of saline were injected into each animal via the tail vein 60 min after diazepam administration [22]. Animals were euthanized at 12h and 24h hours post transplantation for analyses of migration of the donor cells and expression of cytokines by qRT-PCR. An additional group of rats (8-12 animals) were euthanized after memory testing (10 days after SE).

### **Biodistribution Analysis**

Brain, lung, liver, spleen and kidneys were carefully removed and frozen at  $-80^\circ\text{C}$ . The gastrocnemius muscles of C57/BL6 mice were used for the DNA with enhanced green fluorescent protein (EGFP+) cells positive control and gastrocnemius muscles from Wistar rats

were used to provide negative controls. The DNA extraction protocol followed the manufacturer's guidelines. DNA was quantified using a Qubit 2.0 (Life Technologies) fluorometer. To construct the DNA Contamination Curve, five different concentrations of EGFP+DNA from C57/BL6 mouse muscle tissue (1,000 pg/ $\mu$ L, 500 pg/ $\mu$ L, 100 pg/ $\mu$ L, 10 pg/ $\mu$ L and 1 pg/ $\mu$ L) were used to contaminate 10 ng/ $\mu$ L of Wistar rat DNA, as described in a previous publication [35].

### **Semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)**

Extraction of RNA and synthesis of cDNA tissue RNA were performed using an Rneasy<sup>®</sup> Protect Mini Kit (Qiagen, Chatsworth, CA, USA). Quantitation of total RNA was determined using a Qubit<sup>®</sup> 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Six micrograms of total RNA were used to synthesize cDNA with a MultiScribe Reverse Transcriptase Kit (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). Forty nanograms of cDNA were used per reaction, and quantitative real-time PCR (RT-PCR) was performed using Master Mix SYBR Green (Quatro G, Porto Alegre, RS, Brazil) in a 7500 Real-Time PCR System thermal cycler (Applied Biosystems). The endogenous gene was glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), and expression was normalized for the Control group. The RNAs were quantified, and the same initial RNA concentration was used in all RTs. Relative quantitation was performed, and all assays were run at least in duplicate. The primers used in this study are described in Table 2.

### **The Morris water maze (MWM)**

Cognitive function was evaluated with the MWM navigation test in which rats were evaluated by their ability to locate a hidden platform to escape from water. A black circular pool maze tank measuring 120cm in diameter was employed. The maze was conceptually divided into four equal imaginary quadrants and the stage was maintained at 2 cm below the

water level using a protocol described in detail previously [36]. The maze was located in a well-lit white room with several posters and other distal visual stimuli hanging on the walls to provide spatial cues. Rats were handled for 5 min per day for three consecutive days prior to training. The water temperature was around 21–23°C. The massed training protocol consisted of 16 consecutive trials in one session during which the hidden platform was kept in a constant location. A different start position was used for each trial, which consisted of a swim followed by a 60-s (trials 1–4), 40-s (trials 5–8) or 20-s (trials 9–16) stay on the escape platform. Any rat that did not find the platform within 120-s was guided to it by the experimenter. Memory retention was evaluated in a 60-s probe trial carried out in the absence of the escape platform 24h after the last training session.

## **Statistics**

The statistical tests were performed in Graph Pad Prism 7.0 software. Fisher's exact test was used for categorical data, mortality and number of animals that exhibited onset of SE and the unpaired *t* test was used to analyze SE latency and seizures. One-way ANOVA with the Tukey post-hoc test was used to evaluate relative expression of inflammatory factors. MWM data were analyzed using one-way ANOVA with Dunnett's post-hoc test. Data were considered significant when  $p < 0.05$ . All values were based on mean  $\pm$  standard error.

## **Results**

### **The impact of pilocarpine on the general condition of splenectomized rats and epileptic seizures**

Animals were evaluated during the pilocarpine protocol (320mg/kg) and only Racine 4 and 5 seizures were considered for the study, as already mentioned in the protocol [23]. The first graph (figure 1A) shows that the mean delay before onset of seizures was  $22.16 \pm 1.55$  min

in the Pilo group and  $27.98 \pm 5.27$  min in Pilo/Splenec group ( $t$  test,  $p = 0.25$ ). Graph 1B shows that the percentages of animals in which SE was induced were 72.8% and 59% in the Pilo and Pilo/Splenec groups respectively (Fisher's chi-square test,  $p = 0.03$ ). No difference was identified in the number of seizure during SE (1C), which were  $1.927 \pm 0.17$  and  $2.027 \pm 0.10$  in the Pilo and Pilo/Splenec groups respectively. However, mortality of rats (1D) was higher in the Pilo group (42.8%) than in the Pilo/Splenec group (26.5%) (Fisher's chi-square test,  $p = 0.0170$ ).

### **Biodistribution of BMMC in rats subjected to the pilocarpine model**

BMMC were identified with qRT-PCR and biodistribution was measured in major organs/tissues (brain, lungs, spleen, liver, spleen and kidneys). At 12 hours after intravenous injection of BMMC, only one rat in the Pilo/Splenec group exhibited BMMC distribution to the liver and kidneys. However, in the Pilo group BMMC only reached the spleen at 12h. The splenectomized control rats exhibited BMMC in the brain (Table 3A). At 24 hours post intravenous transplantation, only one rat in the Pilo/Splenec group exhibited BMMC in the liver and kidneys. Only one rat in the Pilo group exhibited BMMC cells in the spleen, liver and kidneys (Table 3B).

### **The impact of BMMC on the level of inflammatory cytokines in the brain tissue of splenectomized rats with SE**

In the present study, we observed changes in inflammatory cytokine values. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and AIF-1 were evaluated at 12 and 24 hours after SE. In Figure 2A, BMMC significantly reduced IL-1 $\beta$  induction compared to Pilo alone at 12h (reduced 84%) and 24 h (reduced 99%) after SE (Figures 2A and 2B). After 12 hours, Pilo/Splenec, Pilo/BMMC and Pilo/Splenec/BMMC exhibited differences ( $$$$$p < 0.0001$ ) compared to Pilo. As shown in

Figure 2B, at 24 hours expression levels exhibited significant increase in the Pilo group ( $^{****}p < 0.0001$ ) in comparison to controls. However, the Pilo/BMMC group showed a significant decrease in expression level compared to the Pilo group ( $^{$$$$}p < 0.0001$ ) at this time point. TNF- $\alpha$  expression after 12h was significantly increased in both Pilo and Pilo/Splenec/BMMC animals ( $^{****}p < 0.0001$ ) when compared to Naïve rats (Figure 2C). At 24 h after SE, results also demonstrated significant upregulation of TNF- $\alpha$  gene expression in all SE groups compared to tissues from normal controls (Figure 2D). Expression of AIF-1 mRNA was only upregulated after 12 hours in the Pilo group ( $^{**}P < 0.01$ , Figure 2E) and was significantly downregulated in BMMC groups ( $^{$$$$}p < 0.0001$ , Pilo/BMMC vs. Pilo] and [ $^{$$$}p < 0.0001$ , Pilo/Splenec/BMMC vs. Pilo]). In contrast, AIF-1 expression level 24 hours after SE was only increased in the Pilo/Splenec/group ( $^{****}p < 0.0001$ ), compared to controls (Figure 2F).

### **The impact of BMMC on the level of inflammatory cytokines in the spleen tissue of splenectomized rats with SE**

Quantitative Real-time PCR results showed significant downregulation of IL-1 $\beta$  expression in the spleen tissues of rats in the BMMC-control group after 12h compared to tissues from control animals ( $P < 0.05$ , Figure 3A), but not after 24 hours after SE and BMMC transplantation (Figure 3B). No significant changes were observed in expression of TNF- $\alpha$  in any groups 12 or 24 hours after SE and BMMC transplantation (Figures 3C and 3D). The levels of AIF-1 in the Pilo group, were significantly increased ( $^{**}P < 0.01$ ) when compared to Naïve group 12 h after SE (Figure 3E). However, 24 hours after SE, significant downregulation was observed in Sham control ( $^{***} P < 0.0001$ ), Pilo ( $^{*}P < 0.05$ ) and Pilo/BMMC ( $P < 0.001$ ) tissues compared to Naïve tissues (Figure 3F).

### **The impact of BMMC on the level of anti-inflammatory interleukin in the brain and spleen tissues of rats with SE**

Quantitative Real time PCR was performed to measure the expression levels of anti-inflammatory cytokines (IL-10) in the brain and spleen of the rats. Brain tissue showed significant upregulation of IL-10 gene expression 12 hours after SE and transplantation in the Pilo/Splenec (\*\*\*\*p <0.0001), Pilo/BMMC (\*\*p <0.01) and Pilo/Splenec/BMMC (\*p <0.05) groups (Figure 4A). At 24 hours after SE, IL-10 expression levels in the brain were no different between epileptic and control groups (Fig 4B). At 12 h after SE, IL-10 expression levels were not observed in the spleen figure 4C. However, IL-10 expression levels in the Spleen were significantly elevated in the Pilo group 24 hours after SE (\*\*\*p <0.001, Figure 4D).

### **The impact of BMMC on cognitive impairments in splenectomized rats**

To examine whether the effect of BMMC in splenectomized rats after SE included cognitive improvements in spatial memory, we tested Naïve, Sham, Splenec controls, Pilo and SE Pilo/Splenec rats with saline injections using a hippocampal-dependent spatial memory test. The configuration of the water maze is illustrated in Figure 5A. During the 16 training sessions, all control groups readily learned the task with improving latencies and decreasing failure rates as sessions progressed (Figure 5B). Interestingly, animals submitted to SE and treated with transplanted cells exhibited shorter latencies when compared to the mean for controls (P< 0.0001; Figure 5C), indicating improvement in learning. In contrast, the Pilo, Pilo/Splenec and Pilo/Splenec/BMMC groups performed worse than the controls in all sessions, with consistently longer latencies, (Figure 5C). Furthermore, in a probe test carried out after 24 hours of training in the spatial version, Dunnett's multiple comparisons test showed that

Pilo/BMMC rats swam to the place where the platform used to be ( $P < 0.001$  vs. Pilo/Splenec/BMMC, Figure 5C).

## Discussion

We have previously demonstrated that BMMC reduced pro-inflammatory cytokines after SE in epileptic rats that were subjected to the pilocarpine model of acquired epilepsy [13,21]. Our current data suggest that BMMC treatment alone significantly decreased pro-inflammatory cytokines (IL1- $\beta$  and TNF- $\alpha$ ) and increased anti-inflammatory cytokines (IL-10) and alleviated pilocarpine-induced memory impairments, but not in all splenectomized groups after SE. Splenectomy seemed not only to reduce the progress of the condition during the SE period by 19% but also significantly diminished mortality associated with pilocarpine SE. With regard to SE induction, time of onset and number of seizures did not differ between the two groups. Our experiments also confirmed the presence of EGFP+ cell mRNA in brain and spleen tissues 12 or 24 hours after SE.

The present experiment was designed to evaluate the effects of BMMC transplantation on the brains and spleens of splenectomized rats. Our results confirm that mRNA expression was different in the brain compared to the spleen. IL-1 and TNF- $\alpha$  expression was measured in both brain and spleen tissues 12 and 24 hours after SE. These cytokines exhibit pro-convulsive activity [37,22] and increased excitotoxicity. Epileptogenic activity may contribute to neuronal cell loss, astrogliosis, BBB damage and inhibition of glutamate uptake [38]. Furthermore, release of inflammatory cytokines plays a major role in development of epileptogenesis [22,39]. Moreover, IL-1 $\beta$  is a pro-inflammatory cytokine that contributes to seizure generation [40]. Studies have shown that SE may lead to activation of microglia,

astrocytes and neurons, and/or to blood–brain barrier dysfunctions, and release of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$ . We have previously reported peripheral inflammatory response in an SE model [22] and the spleen is the primary disseminator of inflammatory cells in response to injury [41]. This splenic response, paired with BBB damage, contributes to infiltration of pro-inflammatory mediators into the brain by affecting endothelial integrity and may play a role in seizure activity by modifying neuronal excitability and seizure thresholds [13,42]. IL-1 $\beta$  over-expression was found to induce severe inflammation, which could be decreased by BMMC transplantation 12 and 24 hours after SE. These results were also supported by our previous studies [13].

Neither splenectomized group (Pilo/splenec or Pilo/splenec/BMMC) exhibited any decrease in IL-1 $\beta$  12 or 24 hours after SE. Additionally, we confirmed that BMMC transplantation decreased TNF- $\alpha$  expression levels 12 hours after pilocarpine SE, but not in splenectomized animals. We have previously reported that BMMC treatment decreased expression of brain TNF- $\alpha$  and reduced epileptic activity [13,22].

AIF-1 is an inflammatory cytokine common to both humans and rats [43]. AIF-1 overexpression modulates the capability of macrophages to produce various cytokines, which might influence subsequent immune responses [44]. Macrophages stimulated with AIF-1 produced significantly increased amounts of IL-6, IL-10 and IL-12p40 compared to control cells [45]. Some studies suggest that AIF-1 plays an important role in inflammatory processes involving monocytes and macrophages. Macrophage AIF-1 expression can be enhanced by pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  [44]. Our experimental data demonstrate that AIF-1 expression was significantly increased in brain tissue of SE rats when compared to controls. However, BMMC treatment significantly decreased brain AIF-1 levels in rats with or without spleens 12 hours after SE. Interestingly, AIF-1 expression levels were increased in spleen tissue 12 hours after SE in pilocarpine splenectomized animals.

The IL-10 molecule has robust anti-inflammatory properties, including suppression of IL-6 production [46] and can effectively prevent development of epilepsy [47]. In the nervous system, IL-10 receptor mRNA and proteins have been found in microglia, astrocytes, and oligodendrocytes; in these cells IL-10 down-regulates expression and secretion of pro-inflammatory cytokines and growth factors [48,49]. According to our study, IL-10 levels were augmented both in pilo and pilo/splenectomized animals injected with BMMC as well as in pilo/splenectomized animals (injected with saline) 12 h after SE. However, 24 h after SE no differences in IL-10 levels were observed in either experimental group in comparison to controls.

Additionally, in this study we examined cognitive performance in SE rats using the Morris Water Maze to assess memory deficits [10]. We found that learning and memory abilities were impaired during the latent period in animals submitted to SE with or without splenectomy and our findings are in agreement with previous studies that have demonstrated hippocampus-dependent spatial memory deficits during the latent period in pilocarpine-treated rats [10]. Furthermore, BMMC-treated rats showed significant reduce in escape latency to reach the hidden platform, accompanied by a significant decrease in the time spent in the target quadrant in the probe test in the MWM when compared to all SE groups. The MWM is a test of hippocampal-dependent learning, involving acquisition and long-term spatial memory [50]. Thus, these results indicate improved learning ability and spatial memory after BMMC treatment in the post-SE states, but not in splenectomized animals.

We conclude that BMMC have protective effects on pilocarpine-induced SE, by decreasing the level of expression of the pro-inflammatory cytokines IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$  and AIF-1 and can prevent behavioral abnormalities. However, these effects were not observed in splenectomized animals. In recent years, it has become clearer that brain health and neurological diseases are intimately associated with other physiological systems [51].

Furthermore, our study suggests that the importance of the spleen in immunomodulatory events may be due to its role as an ancillary site for BMMC. Pharmacodynamic studies have shown that the spleen may be an important organ for assisting medical treatments due to its unique characteristics that enable some drugs and cell therapies to be used as “trojan horses”. Further studies are required to unravel the detailed mechanisms of immune interaction between the central nervous system, peripheral immune system, spleen activity and bone marrow mononuclear cell therapy [51].

### **Funding**

This work was supported by Pandurata Alimentos Ltda, and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, Brazil. Daniele Vieira da Silva and Ismael Plentz were supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil CAPES (Finance Code 001), and Gutierre Neves de Oliveira was supported by FAPERGS - Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do RS.

### **Conflict of interest statement**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

---

## References:

- [1] Moshé L, EmilioPerucca, PhilippeRyvlin, TorbjörnTomson. Epilepsy: new advances The Lancet. Volume 385, Issue 9971, 7–13, 2015, Pages 884-898
- [2] Pitkänen A., Löscher W., Vezzani A., Becker A. J., Simonato M., Lukasiuk K., ... Beck H. (2016). Advances in the development of biomarkers for epilepsy. *The Lancet Neurology*, 15(8), 843–856. doi: 10.1016/S1474-4422(16)00112
- [3] Seinfeld S., Goodkin H.P., Shinnar S. Status epilepticus Systemic inflammatory response syndrome in the course of status epilepticus: 7-year, two-center observational study. *Epilepsy Res.* 2017 137:53-55. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2017.09.003.
- [4] Betjemann J. P., Lowenstein D. H. Status epilepticus in adults. *Lancet Neurol.* 2015. 14, 615–624. doi: 10.1016/S1474-4422(15)00042-3
- [5] Walker MC Pathophysiology of status epilepticus. *Neurosci Lett* 2016; 667:84–91.
- [6] Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res.* 1983; 9(3):315-35.
- [7] Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RS, Avoli M. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods.* 2008 Jul 30;172(2):143-57. doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.04.019.
- [8] Leite J.P., Nakamura E.M., Lemos T., Masur J., Cavalheiro E.A. Learning impairment in chronic epileptic rats following pilocarpine-induced status epilepticus. *Braz J Med Biol Res*, 1990; 23, pp. 681-683
- [9] Venturin GT, Greggio S, Marinowic DR, Zanirati G, Cammarota M, Machado DC, DaCosta JC. Bone marrow mononuclear cells reduce seizure frequency and improve cognitive outcome in chronic epileptic rats. *Life Sci.* 2011 15;89 (7-8):229-34. doi: 10.1016/j.lfs.2011.06.006.
- [10] Fukumura S, Sasaki M, Kataoka-Sasaki Y, Oka S, Nakazaki M, Nagahama H, Morita T, Sakai T, Tsutsumi H, Kocsis JD, Honmou O. Intravenous infusion of mesenchymal stem cells reduces epileptogenesis in rat model of status epilepticus *Epilepsy Res.* 2018;141:56-63. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2018.02.008.
- [11] Vezzani A, Friedman A. Brain inflammation as a biomarker in epilepsy. *Biomark Med.* 2011;5(5):607-14. doi: 10.2217/bmm.11.61.
- [12] Janigro D, Iffland PH 2nd, Marchi N, Granata T. A role for inflammation in status epilepticus is revealed by a review of current therapeutic approaches. *Epilepsia.* 2013; 54 Suppl 6:30-2. doi: 10.1111/epi.12271
- [13] Leal MM, Costa-Ferro ZS, Souza BS, Azevedo CM, Carvalho TM, Kaneto CM, Carvalho RH, Dos Santos RR, Soares MB. Early transplantation of bone marrow mononuclear cells promotes neuroprotection and modulation of inflammation after status epilepticus in mice by paracrine mechanisms. *Neurochem Res.* 2014; 39(2):259-68. doi: 10.1007/s11064-013-1217-7.
- [14] Szklener S, Korchut A, Godek M, Balicka-Adamik L, Bielecki D, Rejdak R, Rejdak K. *Epilepsy Res.* 2017; 137():53-55.
- [15] Marchi N, Angelov L, Masaryk T, et al. Seizure-promoting effect of blood-brain barrier disruption. *Epilepsia.* 2007; 48:732–42.
- [16] Marchi N, Johnson AJ, Puvenna V, et al. Modulation of peripheral cytotoxic cells and ictogenesis in a model of seizures. *Epilepsia.* 2011; 52:1627–34.
- [17] Marchi N, Granata T, Janigro D. Inflammatory pathways of seizure disorders. *Trends Neurosci.* 2014; 37(2):55-65. doi: 10.1016/j.tins.2013.11.002.

- [18] Heinemann U, Kaufer D, Friedman A. Blood-brain barrier dysfunction, TGF $\beta$  signaling, and astrocyte dysfunction in epilepsy. *Glia*. 2012; 60(8):1251-7. doi: 10.1002/glia.22311
- [20] Marchi N, Fan Q, Ghosh C, Fazio V, Bertolini F, Betto G, Batra A, Carlton E, Najm I, Granata T, Janigro D. Antagonism of peripheral inflammation reduces the severity of status epilepticus. *Neurobiol Dis*. 2009; 33(2):171-81.
- [21] Costa-Ferro ZS, Souza BS, Leal MM, Kaneto CM, Azevedo CM, da Silva IC, Soares MB, Ribeiro-dos-Santos R, Dacosta JC. Transplantation of bone marrow mononuclear cells decreases seizure incidence, mitigates neuronal loss and modulates pro-inflammatory cytokine production in epileptic rats. *Neurobiol Dis*. 2012; 46(2):302-13. doi: 10.1016/j.nbd.2011.12.001
- [22] Costa-Ferro ZS, Vitola AS, Pedroso MF, Cunha FB, Xavier LL, Machado DC, Soares MB, Ribeiro-dos-Santos R, DaCosta JC. 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. doi: 10.1016/j.seizure.2009.12.003.
- [23] Zanirati G, Azevedo PN, Marinowic DR, Rodrigues F, de Oliveira Dias AC, Venturin GT, Greggio S, Simão F, DaCosta JC. Transplantation of bone marrow mononuclear cells modulates hippocampal expression of growth factors in chronically epileptic animals. *CNS Neurosci Ther*. 2015; 21(5):463-71. doi: 10.1111/cns.12382.
- [24] DaCosta JC, Portuguese MW, Marinowic DR, Schilling LP, Torres CM, DaCosta DI, Carrion MJM, Raupp EF, Machado DC, Soder RB, Lardi SL, Garicochea B. 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*. 2018; 12(2):e648-e656. doi: 10.1002/term.2334
- [25] Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5(8):606-16.
- [26] Tarantino G<sup>1</sup>, Savastano S, Capone D, Colao A. Spleen: A new role for an old player? *World J Gastroenterol*. 2011; 7;17(33):3776-84. doi: 10.3748/wjg.v17.i33.3776.
- [27] Huston JM, Rosas-Ballina M, Xue X, Dowling O, Ochani K, Ochani M, Yeboah MM, Chatterjee PK, Tracey KJ, Metz CN Cholinergic neural signals to the spleen down-regulate leukocyte trafficking via CD11b. *J Immunol*. 2009; 1: 183(1):552-9.
- [28] Jung WC, Levesque JP, Ruitenber MJ It takes nerve to fight back: The significance of neural innervation of the bone marrow and spleen for immune function. *Semin Cell Dev Biol*. 2017; 61():60-70.
- [29] Dadmehr M, Amini-Behbahani F, Eftekhari B, Minaei B, Bahrami M. Peritoneum as an origin of epilepsy from the viewpoint of Avicenna. *Neurol Sci*. 2018; 39(6):1121-1124. doi: 10.1007/s10072-018-3342-1.
- [30] Rous FP J The effect of pilocarpine on the output of lymphocytes through the thoracic duct. *Exp Med*. 1908 1; 10(3):329-42.
- [31] Ajmo, C. T., D. O. Vernon, L. Collier, A. A. Hall, S. Garbuzova-Davis, A. Willing and K. R. Pennypacker (2008). "The spleen contributes to stroke-induced neurodegeneration." *Journal of neuroscience research* 86(10): 2227-2234
- [32] Damy SB, Camargo RS, Chammas R, Figueiredo L. Aspectos fundamentais da experimentação animal-aplicações em cirurgia experimental. *Rev Assoc Med Bras*. 2010;56(1):103-11.)
- [33] Racine R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 32 (3) (1972), pp. 281-294
- [34] Costa-Ferro, Zaquer SM, Souza, Bruno SFbLeal, Marcos . MT et al. Transplantation of bone marrow mononuclear cells modulates hippocampal expression of growth factors in chronically epileptic animals *Neurobiolgy* (2012) 46- 2 302-313

- [35] Daniel Rodrigo Marinowic, Daniele Vieira Da Silva, Alessandra Deise Sebben, Denise Cantarelli Machado, Jaderson Costa Da Costa, Minimal Detectable Amounts of Exogenous DNA after Systemic Cell Engraftment
- [36] Bonini JS, Da Silva WC, Bevilaqua LR, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. On the participation of hippocampal PKC in acquisition, consolidation and reconsolidation of spatial memory. *Neuroscience*. 2007 15;147(1):37-45.
- [37] Vezzani A, Conti M, De Luigi A, Ravizza T, Moneta D, Marchesi F, De Simoni MG Interleukin-1beta immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures. *J Neurosci*. 1999 Jun 15; 19(12):5054-65.
- [38] A. Vezzani, T. Ravizza, S. Balosso, E. Aronica Glia as a source of cytokines: implications for neuronal excitability and survival *Epilepsia*, 49 (Suppl 2) (2008), pp. 24-32
- [39] A. Vezzani, E. Aronica, A. Mazarati, Q.J. Pittman Epilepsy and brain inflammation *Exp. Neurol.*, 244 (2013), pp. 11-21
- [40] Xiao Z, Peng J, Yang L, Kong H, Yin F (2015) Interleukin-1 $\beta$  plays a role in the pathogenesis of mesial temporal lobe epilepsy through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in hippocampal neurons. *J Neuroimmunol* 282:110–117
- [41] Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*. 2009;325(5940):612- 616
- [42] Gorter JA, van Vliet EA, Aronica E. Status epilepticus, blood-brain barrier disruption, inflammation, and epileptogenesis. *Epilepsy Behav*. 2015;49:13–16
- [43] Autieri .V, S. Kelemen, B.A. Thomas, E.D.Feller, B.I. Goldman, H.J. Eisen Allograft inflammatory factor-1 expression correlates with cardiac rejection and development of cardiac allograft vasculopathy *Circulation*, 106 (2002), pp. 2218-2223
- [44] Yang Z.F. , D.W. Ho, C.K. Lau, C.T. Lam, C.T.Lum, R.T. Poon, et al. Allograft inflammatory factor-1(AIF-1) is crucial for the survival and pro-inflammatory activity of macrophages *Int. Immunol.*, 17 (2005), pp. 1391-1397
- [45] Watano K. , K. Iwabuchi, S. Fujii, N. Ishimori, S. Mitsuhashi, M. Ato, et al. Allograft inflammatory factor-1 augments production of interleukin-6, -10 and -12 by a mouse macrophage line *Immunology*, 104 (2001), pp. 307-316
- [46] Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, R. L. Coffman and A. O'Garra (2001). "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor." *Annual review of immunology* 19(1): 683-765.
- [47] Alsharafi WA, Xiao B, Abuhamed MM, Bi F-F, Luo Z-H (2015) Correlation between IL-10 and microRNA-187 expression in epileptic rat hippocampus and patients with temporal lobe epilepsy. *Front Cell Neurosci* 9:466.
- [48] Frei, B. (1994). "Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action." *The American journal of medicine* 97(3): S5-S13.
- [49] Jander, S., M. Sitzer, R. Schumann, M. Schroeter, M. Siebler, H. Steinmetz and G. Stoll (1998). "Inflammation in high-grade carotid stenosis: a possible role for macrophages and T cells in plaque destabilization." *Stroke* 29(8): 1625-1630.
- [50] Morris R.G.M. Spatial localization does not require the presence of local cues *Learn. Motiv.*, 12 (1981), pp. 239-260.
- [51] Vincenzo Bronte and Mikael J Pittet. The spleen in local and systemic regulation of immunity *Immunity*. (2013) November 14; 39(5): 806–818.

## Legends:

**Figure 1** Data collected during SE. Start time of SE (A), time in which the animals took to present the first seizures. Percentage of animals that exhibited SE in groups with spleen and without spleen (B) and number of seizures during SE (C). Percentage mortality among animals subjected to SE with splenectomy and without surgery (D). Values for mortality and SE are expressed in percentages. Pilo 320 mg/Kg. Categorical data were calculated and analyzed using Fisher's chi-square test (n = 91 in the Pilo group and n = 83 in the Pilo/Splenec group). Data expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean and  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

**Figure 2** Relative expression of the genes by qRT-PCR in the brains of Wistar rats at 12 or 24 hours after SE and BMMC injection. Expression of IL-1 $\beta$  12 hours (A) and 24 hours after SE and BMMC injection (B). Expression of TNF- $\alpha$  12 hours (C) and 24 hours after SE and BMMC injection (D). Expression of AIF-1 12h hours (E) and 24 hours after SE and BMMC injection (F). Data represent mean  $\pm$  SEM. One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test was performed, with a confidence interval of 95% and n = 4-5. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  vs. Naïve, §  $p < 0.05$ , \$\$\$  $p < 0.001$ , \$\$\$\$  $p < 0.0001$  vs. Pilo.

**Figure 3** Relative expression of genes by RT-PCR in the spleen of Wistar rats at 12 and 24 hours after SE and BMMC injection. Expression of IL-1 $\beta$  at 12 (A) and 24 (B) hours after SE and BMMC injection. Expression of TNF- $\alpha$  at 12 (C) and 24 hours (D) after SE and BMMC injection. Expression of AIF-1 at 12 (E) and 24 (F) hours after SE and BMMC injection. Data represent mean  $\pm$  SEM. One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test was performed, with a confidence interval of 95% and n = 4. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. Naïve group.

**Figure 4** Relative expression of IL-10 by qRT-PCR in the-brain and spleen of Wistar rats at 12 hours or 24 hours after SE and BMMC transplantation. Expression of IL-10 after 12 hours (A) and expression of IL-10 in the brain 24 hours (B) after SE and BMMC injection. Expression of IL-10 in the spleen tissue 12 hours (C) and 24 hours (D) after SE and BMMC injection. Data represent mean  $\pm$  SEM. One-way ANOVA with Tukey's post-hoc test was performed, with a confidence interval of 95% and n = 4. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  vs. Naïve.

**Figure 5** Behavioral alterations on the Morris water maze test. Schematic illustration of the MWM (A). Latencies for escape to platform during training in the MWM control groups (B) and SE vs. Naïve Control groups (\*\*\*\* $p < 0.00001$ ) at 10 days after SE (C), and Latencies for escape to platform during test in the MWM (D) in control, Sham, Splenec, Pilo, Pilo/BMMC and Pilo/Splenec/BMMC groups (\*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ , \*\*\*\* $p < 0.00001$ ), using two-way ANOVA followed by Dunnett's test as a post hoc test, n = 8-12.

**Table 1:** Table showing experimental groups and interventions.

**Table 2.** Primer sequences used in gene expression experiments on inflammatory factors and biodistribution of EGFP<sup>+</sup>.

**Table 3:** Samples were obtained from four animals per group and time (Splenec 12h/24h, Control 12/24h, Pilo 12/24h, Pilo/Splenec 12/24h) for analysis by PCR of the presence of EGFP<sup>+</sup> gene in different organs (Brain, lung, spleen, liver and kidney) after transplant of mononuclear cells. At 12 hours (Table 3A) and 24 hours after BMMC transplant (Table 3B) we detected the presence of the gene in the organs (\*) of 01 out of 04 animals.

Figure 1

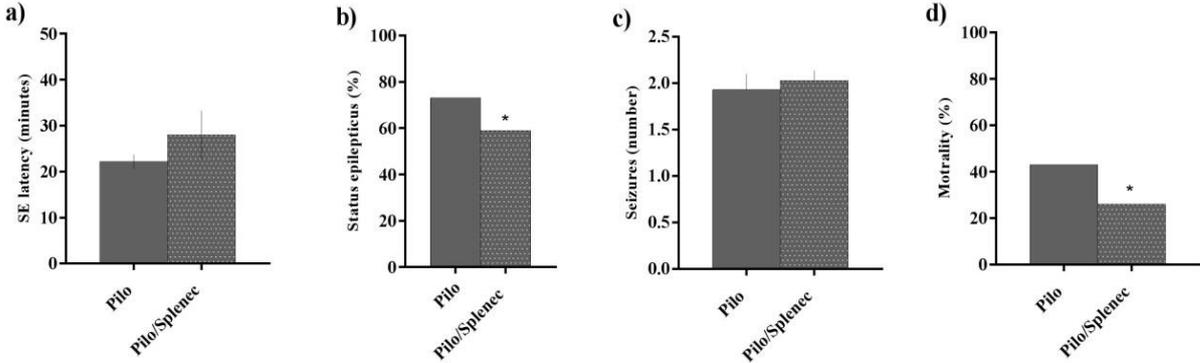
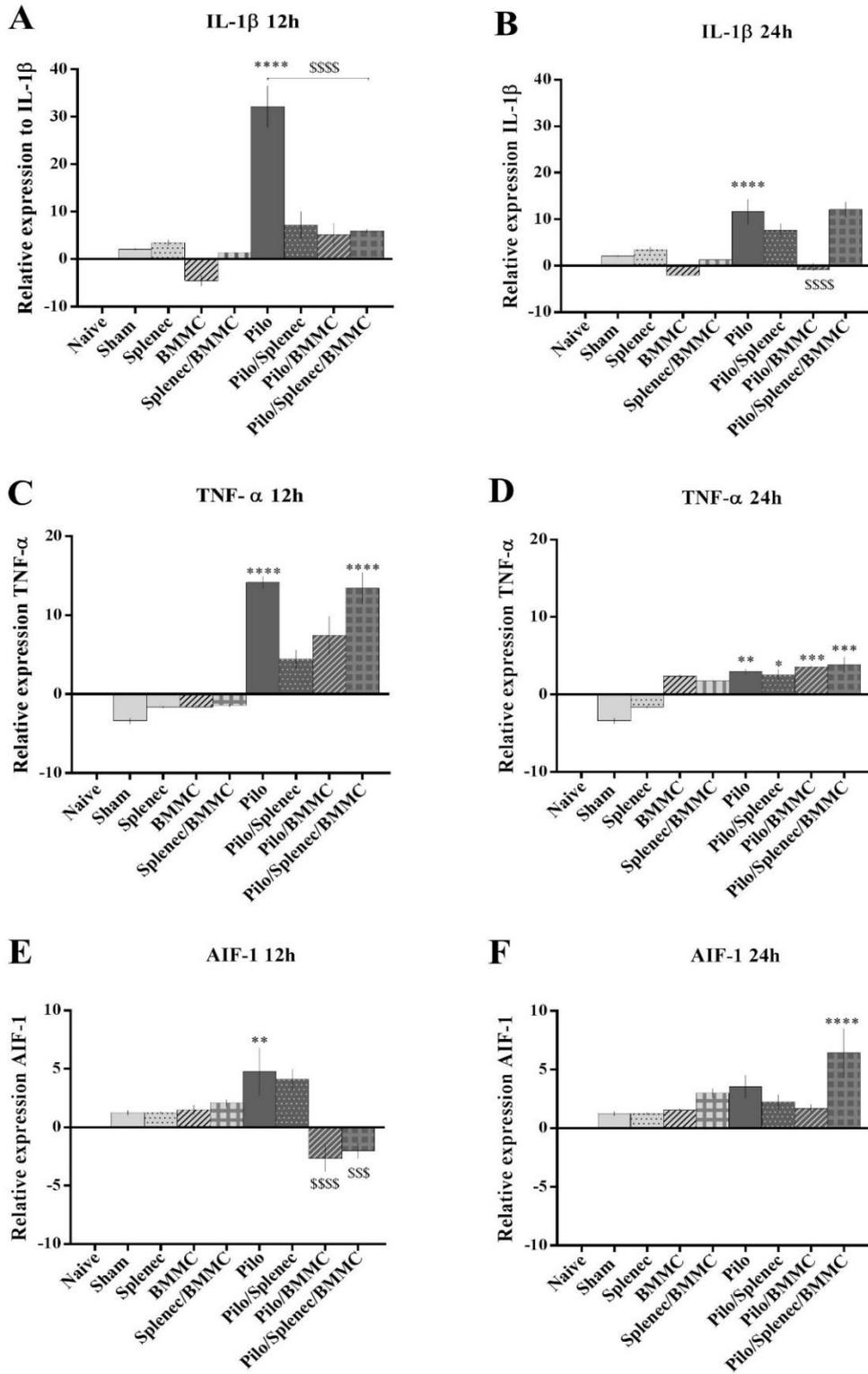


Figure 2



**Figure 3**

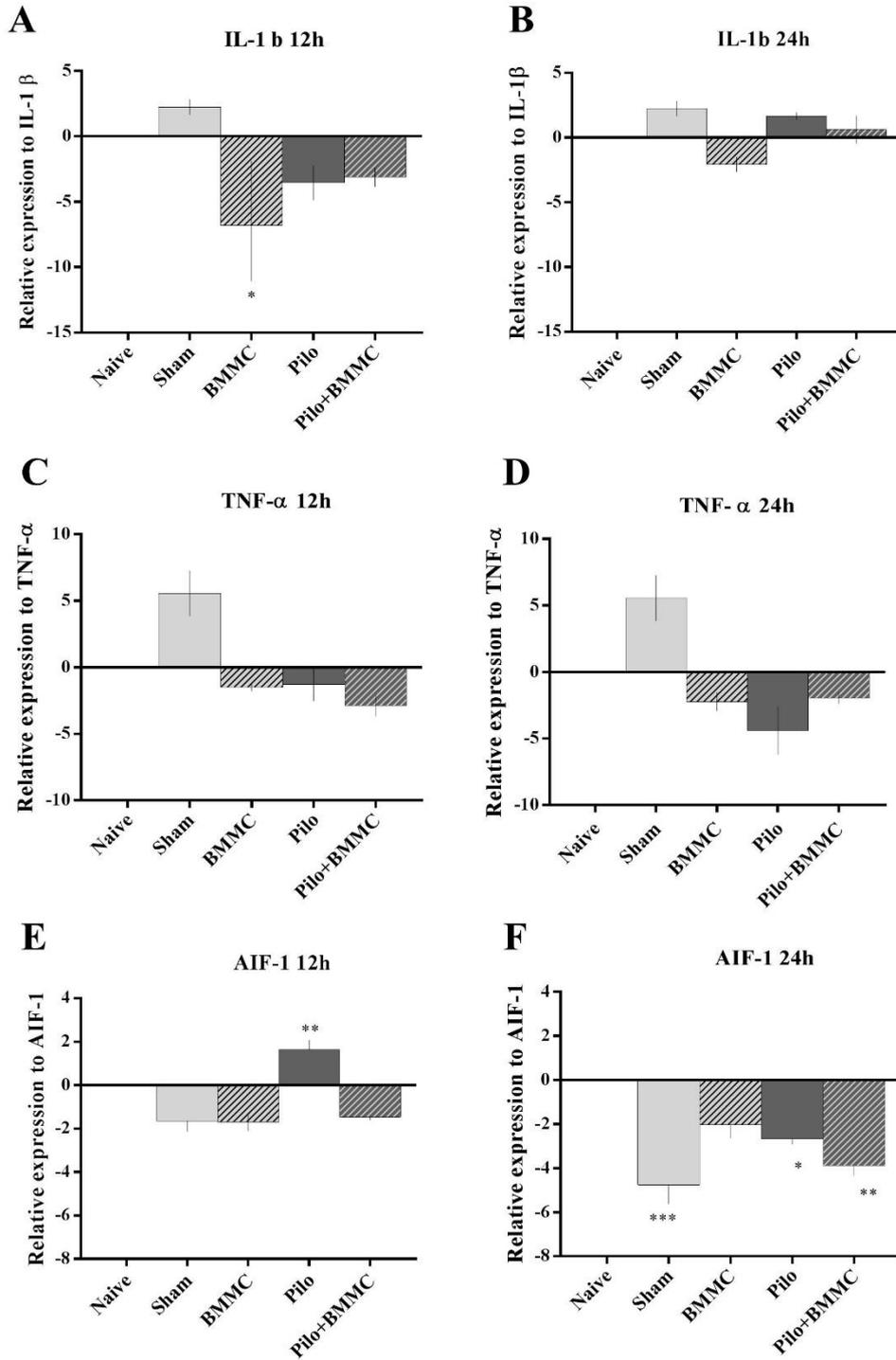


Figure 4

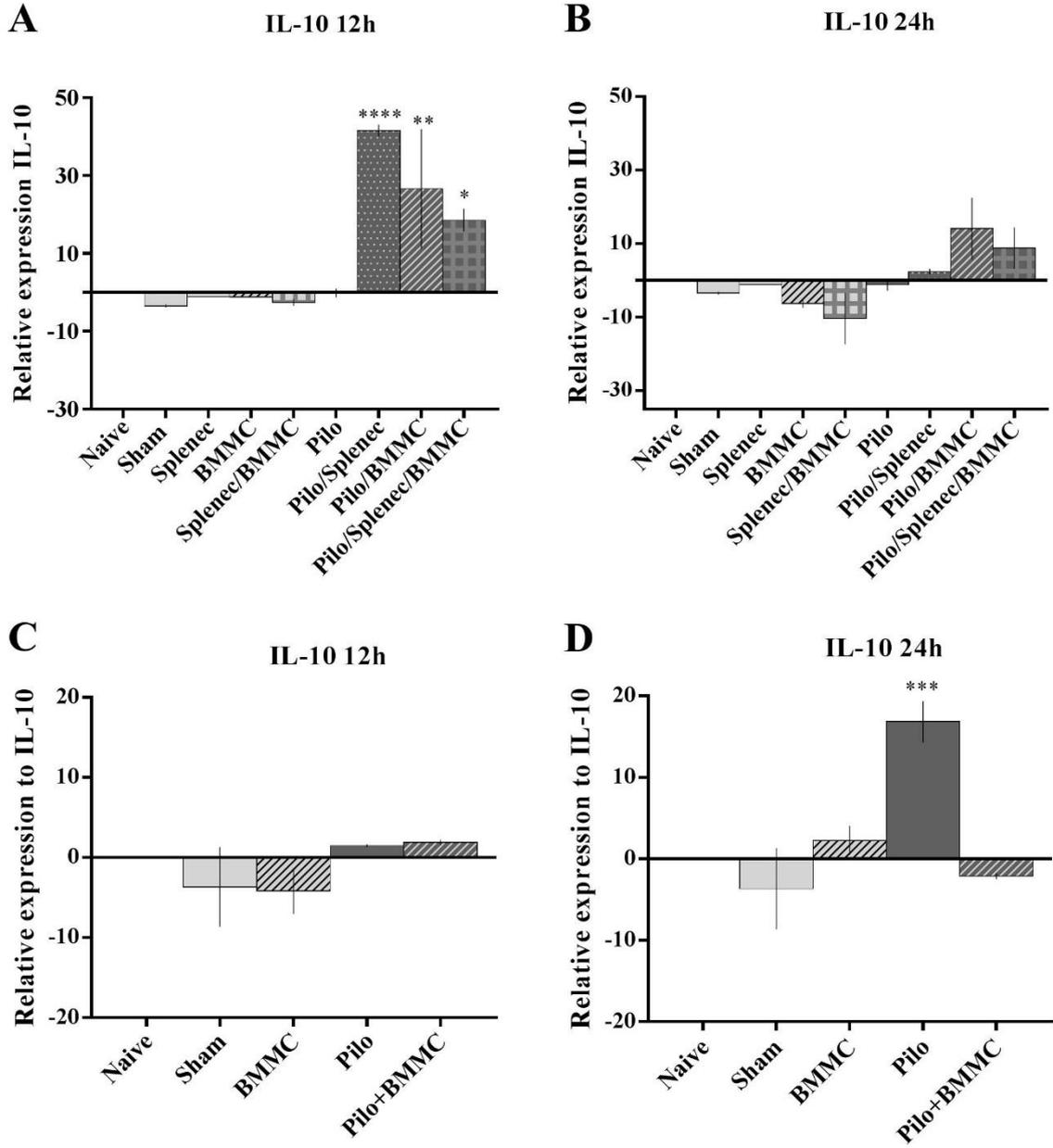


Figure 5

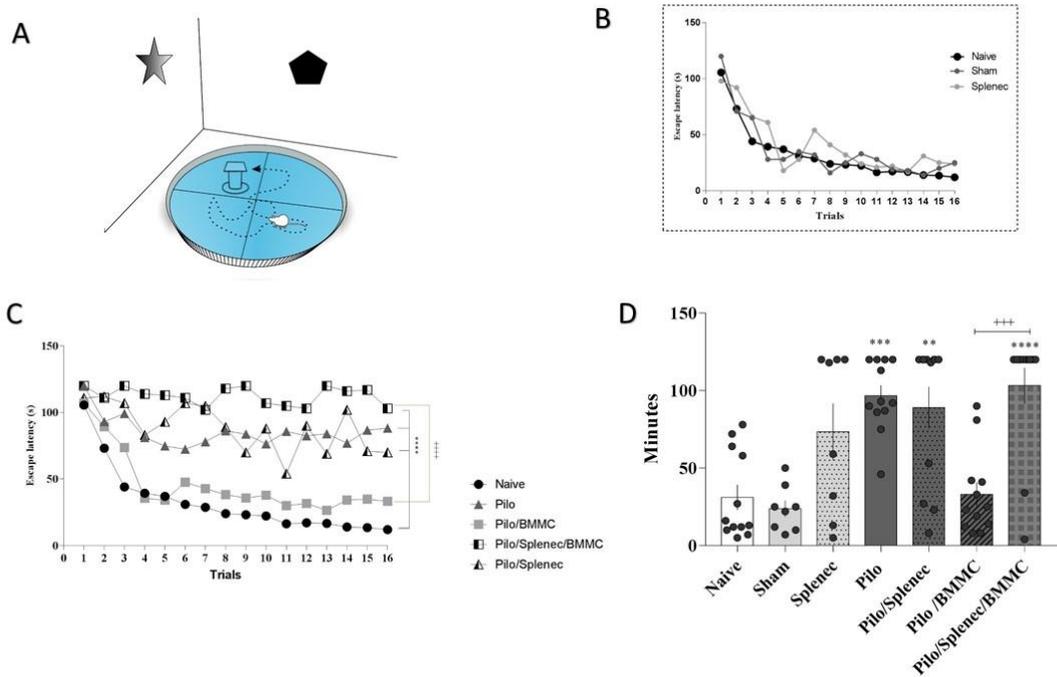


Table 1.

Group name	Naive	Sham	Splenec	BMMC
<b>Interventions</b>	No intervention.	Surgery without removing spleen.	Spleen is removed	Transplantation of BMMC only. Euthanasia 12h or 24h after transplantation
Group name	Pilo	Pilo/Splenec	Pilo/BMMC	Pilo/Splenec/BMMC
<b>Interventions</b>	Pilocarpine SE only. Euthanasia 12h or 24h after end of pilocarpine protocol.	Splenectomy and pilocarpine SE. Euthanasia 12h or 24h after end of pilocarpine protocol.	Pilocarpine and BMMC transplantation. Euthanasia 12h or 24h after transplantation	Splenectomy and pilocarpine SE and BMMC transplantation. Euthanasia 12h or 24h after transplantation

**Table 2**

Primer sequence 5' -3'		
Primer name	Forward primer	Reverse Primer
	<b>AIF-1</b>	CATATGTTCTCAGGGAGATCTTGG
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	AAAGAAGAAGATGGAAAAGCGGTT	GGGAACTGTGCAGACTCAAACCTC
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	AGAACAGCAACTCCAGAACACCCCT	ATCTCGGATCATGCTTCCGTGCT
<b>IL-10</b>	GCCAAGCCTTGTGAGAAATGA	TTTCTGGGCCATGGGTTCTCT
<b>GAPDH</b>	TGCCACTCAGAAGACTGTGGATG	GCCTGCTCACCACCTTCTGAT
<b>EGFP</b>	GGGCACAAGCTGGAGTACA	ATGTTGTGGCGGATCTTGA

**Table 3**

<b>A)</b>	Controls			SE /PILO	
<b>Groups</b>	Splenec/CMMO	BMMC	Pilo/BMMC	Pilo/Splenec/BMMC	
<b>Samples</b>	<b>12H</b>	<b>12H</b>	<b>12H</b>	<b>12H</b>	
Brain	*	--	--	--	
Lung	--	--	--	--	
Spleen	--	--	*	--	
Liver	--	--	--	*	
kidneys	--	--	--	*	
<b>B)</b>	Controls			SE /PILO	
<b>Grupos</b>	Splenec/BMMC	BMMC	Pilo/BMMC	Pilo/Splenec/BMMC	
<b>AMOSTRAS</b>	<b>24H</b>	<b>24H</b>	<b>24H</b>	<b>24H</b>	
Brain	--	--	--	--	
Lung	--	--	--	--	
Spleen	--	--	*	--	
Liver	--	--	*	*	
Kidneys	--	--	*	*	

## **Anexos:**

**Aprovação CEUA do projeto:** Avaliação da biodistribuição de células mononucleares de medula óssea em ratos esplenectomizados e submetidos ao *status epilepticus* induzido por pilocarpina.

**Aprovação CEUA e do Sipesq do projeto:** Avaliar a importância do baço na epileptogênese e na resposta inflamatória nos modelos epilepsia de pilocarpina e de ácido caínico em ratos wistar.

**Artigo publicado ao longo da tese.**

**Declaração de submissão do artigo original da tese.**



*Janiet Daino*

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 09/2016 - CEUA

Porto Alegre, 29 de janeiro de 2016.

Prezado Sr(a). Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 15/00480 intitulado "Avaliação da biodistribuição de células mononucleares de medula óssea em ratos esplenectomizados e submetidos ao estatus epilepticus induzido por pilocarpina".

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
132	Rattus norvegicus Mus musculus	02/2016 – 07/2018

Atenciosamente,

*João Batista*  
Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber  
Coordenador da CEUA/PUCRS

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa

INSCER

Nesta Universidade

**PUCRS**

Campus Central  
Av. Ipiranga, 6681 – P. 99 – Portal Tecnopuc – sala 1512  
CEP: 91519-900 – Porto Alegre/RS  
Fone: (51) 3353-6365  
E-mail: ceua@pucrs.br



## SIPESQ

Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 7839

Porto Alegre, 20 de abril de 2017

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "AVALIAR A IMPORTÂNCIA DO BAÇO NA EPILEPTOGÊNESE E NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NOS MODELOS EPILEPSIA DE PILOCARPINA E DE ÁCIDO CAINICO EM RATOS WISTAR" coordenado por JADERSON COSTA DA

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.

Duração do Projeto: 20/04/2017 - 20/12/2019

Nº de Animais	Espécie
200	Rato
Total de Animais: 200	

Atenciosamente,

Comissão de Ética no Uso de Animais(CEUA)



# SIPESQ

Sistema de Pesquisas da PUCRS

---

Código SIPESQ: 7839

Porto Alegre, 7 de fevereiro de 2017.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão Científica do INSTITUTO DO CÉREBRO DO RS da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "AVALIAR A IMPORTÂNCIA DO BAÇO NA EPILEPTOGÊNESE E NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NOS MODELOS EPILEPSIA DE PILOCARPINA E DE ÁCIDO CAÍNICO EM RATOS WISTAR". Este projeto necessita da apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA). Toda a documentação anexa deve ser idêntica à documentação enviada ao CEUA, juntamente com o Documento Unificado gerado pelo SIPESQ.

Atenciosamente,

Comissão Científica do INSTITUTO DO CÉREBRO DO RS

---

## Archives of Clinical and Biomedical Research

Volume 1, Issue 1

Research Article

### Minimal Detectable Amounts of Exogenous DNA after Systemic Cell Engraftment

Daniel Rodrigo Marinowicz<sup>1,2</sup>, Daniele Vieira Da Silva<sup>1,2</sup>, Alessandra Deise Sebben<sup>1,2</sup>, Demise Cantarelli Machado<sup>1,2</sup>, Jaderson Costa Da Costa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul (InsCere), Av. Ipiranga, 6690, building 63, Jardim Botânico, Porto Alegre Rio Grande do Sul - 90610.000, Brazil

<sup>2</sup>Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6690, building 60, second floor, Jardim Botânico, Porto Alegre Rio Grande do Sul - 90610.000, Brazil

\*Corresponding Author: Jaderson Costa Da Costa, Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul (InsCere), Av. Ipiranga, 6690, building 63, Jardim Botânico, Porto Alegre Rio Grande do Sul - 90610.000, Brazil, Email : [jcc@pucrs.br](mailto:jcc@pucrs.br); Tel: 5551 33203485.

Received: 29 July 2016; Accepted: 6 August 2016; Published: 10 August 2016

#### Abstract

In cellular therapy models, the establishment of accurate methods to track the homing, cell fate and survival are fundamental to ensure safety and efficacy. The PCR is used to detect donor cells DNA in xenotransplant models. Five different concentrations of EGFP<sup>+</sup> DNA from C57/BL6 mouse muscle tissue: 1,000 pg/ $\mu$ L, 500 pg/ $\mu$ L, 100 pg/ $\mu$ L, 10 pg/ $\mu$ L e 1 pg/ $\mu$ L were used to contaminate 10 ng/ $\mu$ L of DNA Wistar rat. Polymerase chain reaction was performed using 2  $\mu$ L of each sample. EGFP<sup>+</sup>DNA were detected in samples containing 2,000 pg, 1,000 pg, 200 pg and 20 pg. Samples with 2 pg EGFP<sup>+</sup>DNA did not show signal. Here we demonstrate an alternative to proving the presence or confirm the absence, of exogenous DNA in organs and tissues. The concentration curve for cell migration detection by real time PCR, will allow the use in systemically transplanted cells in animal models subjected to cell therapy.

Jaderson Costa da Costa, MD, PhD

Início da mensagem encaminhada:

De: "Cytotherapy" <[emj@editorialmanager.com](mailto:emj@editorialmanager.com)>  
Data: 28 de junho de 2019 15:01:31 BRT  
Para: "Jaderson Costa DaCosta" <[jdc@puors.br](mailto:jdc@puors.br)>  
Assunto: A manuscript number has been assigned: JCYT-D-19-00165  
Responder A: Cytotherapy <[jcyt@elsevier.com](mailto:jcyt@elsevier.com)>

Ms. Ref. No.: JCYT-D-19-00165  
Title: Full Spleen plays a key role in efficiency of transplantation of bone marrow mononuclear cells in experimental temporal lobe epilepsy  
Cytotherapy

Dear Dr. Jaderson Costa DaCosta,

Your submission "Full Spleen plays a key role in efficiency of transplantation of bone marrow mononuclear cells in experimental temporal lobe epilepsy" has been assigned manuscript number JCYT-D-19-00165.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <https://www.editorialmanager.com/jcyt/>
2. Enter your login details
3. Click [Author Login]  
This takes you to the Author Main Menu.
4. Click [Submissions Being Processed]

Thank you for submitting your work to Cytotherapy.

Kind regards,

Donald G Phinney, PhD  
Editor-in-Chief  
Cytotherapy