

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

GABRIELE GOULART ZANIRATI

TRANSPLANTE DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA  
MODULAM A EXPRESSÃO DE FATORES TRÓFICOS EM MODELO ANIMAL  
DE EPILEPSIA CRÔNICA INDUZIDA POR PILOCARPINA.

Porto Alegre

2013

GABRIELE GOULART ZANIRATI

TRANSPLANTE DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA  
MODULAM A EXPRESSÃO DE FATORES TRÓFICOS EM MODELO ANIMAL  
DE EPILEPSIA CRÔNICA INDUZIDA POR PILOCARPINA.

Dissertação apresentada como requisito para  
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de  
Pós-Graduação em Medicina e Ciências da  
Saúde, Área de Concentração em  
Neurociências, da Pontifícia Universidade  
Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Dr. Jaderson Costa da Costa

Co-orientador: Dr. Fabrício Simão

Porto Alegre

2013

#### DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

**Z31t** Zanirati, Gabriele Goulart

Transplante de células mononucleares da medula óssea modulam a expressão de fatores tróficos em modelo animal de epilepsia crônica induzida por pilocarpina / Gabriele Goulart Zanirati. Porto Alegre: PUCRS, 2013.

103 p.: il. tab. Inclui um artigo científico submetido à publicação.

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa.

Co-orientador: Dr. Fabrício Simão.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde. Área de Concentração: Neurociências.

1. EPILEPSIA. 2. PILOCARPINA. 3. CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA. 4. FATORES TRÓFICOS. 5. ESTUDO EXPERIMENTAL.  
I. COSTA, JADERSON COSTA DA. II. TÍTULO.

**CDD** 617.63

**CDU** 616-089.84:616.71-018.46

**NLM WH 380**

GABRIELE GOULART ZANIRATI

TRANSPLANTE DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA  
MODULAM A EXPRESSÃO DE FATORES TRÓFICOS EM MODELO ANIMAL  
DE EPILEPSIA CRÔNICA INDUZIDA POR PILOCARPINA.

Dissertação apresentada como requisito para  
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de  
Pós-Graduação em Medicina e Ciências da  
Saúde, Área de Concentração em  
Neurociências, da Pontifícia Universidade  
Católica do Rio Grande do Sul.

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. João Pereira Leite - USP

---

Profa. Dra. Maria Martha Campos - PUCRS

---

Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado - PUCRS

---

Profa. Dra. Magda Lahorgue Nunes (Suplente) - PUCRS

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

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Jaderson Costa da Costa, pela oportunidade, confiança e apoio desde a iniciação científica, que foi onde percebi a importância da pesquisa na minha vida. Seus ensinamentos ao longo desses anos foram fundamentais para o meu amadurecimento profissional e, também, pessoal durante a realização deste trabalho. Muito obrigada!

Ao meu co-orientador Fabrício Simão, por todo o apoio científico, tanto intelectual quanto experimental, pela sua dedicação e por ter me acompanhado durante esses dois anos de mestrado. Obrigada por contribuir para o meu desenvolvimento como cientista e pessoa.

Aos queridos colegas do Laboratório de Neurociências e Sinalização Celular, obrigada a todos pela amizade e por proporcionarem um excelente ambiente de trabalho. Agradeço especialmente aos técnicos: Simone Salamoni, Ricardo Breda e Daniela Abreu dispostos a ajudar sempre que foi necessário. À Nelcy, pela enorme paciência e incansável disposição em ajudar sempre. Meus queridos amigos, Gianina Venturin e Samuel Greggio pela amizade, incentivo e apoio desde a iniciação científica e, principalmente, por me inspirarem na realização deste trabalho, bem como pela enorme paciência e dedicação. Pamella Azevedo, que está comigo desde o início da graduação, com certeza a tua amizade foi um estímulo durante todos esses anos. Caroline Calice, pelo companheirismo e disponibilidade em ajudar. Paula Alvarez, tua amizade foi um presente que o mestrado me proporcionou e se tornou essencial pra mim. Aos bolsistas de iniciação científica Daniele Vieira e Bárbara Azevedo pelas ajudas diversas, e especialmente, ao Felipe Rodrigues que acompanhou todo o trabalho sempre prestativo e disposto a ajudar em todos os experimentos. Ao colega Daniel Marinowic, pela dedicação e disposição em ajudar sempre que foi necessário. A amizade de todos vocês foi fundamental para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Eledina e Raymundo, por estarem sempre ao meu lado me apoiando e incentivando minhas realizações profissionais e pessoais. Obrigada por me ensinarem a superar obstáculos e a seguir sempre pelo caminho correto. Vocês são os grandes responsáveis pela conclusão deste mestrado.

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

À CAPES pela bolsa concedida e, PRONEX pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

## RESUMO

A epilepsia atinge cerca de 1% da população mundial, sendo que aproximadamente 30% desses pacientes não respondem ao tratamento medicamentoso. Por sua vez, as células-tronco têm sido consideradas uma esperança de tratamento da epilepsia, visto que têm grande capacidade de proliferação, diferenciação e produção de fatores, podendo ativar mecanismos de restauração endógena no cérebro lesado. Sabendo-se que a administração de células mononucleares da medula óssea (CMMO) apresenta potencial terapêutico em um modelo experimental de epilepsia, o objetivo deste estudo é investigar se o transplante das CMMO em ratos com epilepsia crônica modula a expressão de fatores tróficos. Com o intuito de melhor compreender os mecanismos de ação das células transplantadas foi realizada a detecção da expressão de fatores tróficos como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), fator de crescimento neural (NGF), fator de crescimento transformador  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em diferentes períodos após transplante das CMMO nos hipocampos dos grupos experimentais através da técnica de ELISA. A pilocarpina (PILO) foi administrada nos animais (320 mg/kg i.p.) para indução do modelo de epilepsia crônica. As crises comportamentais foram classificadas de acordo com a escala de Racine e a duração do SE foi controlada com diazepam (10 mg/kg, i.p., 90 minutos). Após 22 dias, o total dos animais foi dividido em grupos: Controle, Pilo e Pilo+CMMO avaliados nos tempos de 3, 7 e 14 dias após o transplante. Os grupos CMMO receberam transplante de células da camada mononuclear da medula óssea, obtidas de camundongos EGFP C57BL/6, via veia caudal ( $1 \times 10^7$  células, 100 $\mu$ L). Os animais controle receberam solução salina nas mesmas condições do grupo transplantado. Os animais tratados com pilocarpina foram vídeo-monitorados durante sete dias pré-transplante para observação de crises espontâneas recorrentes (CERs). Nossos resultados mostraram que houve alteração da expressão proteica de BDNF, GDNF, NGF, TGF- $\beta$ 1 e VEGF nos hipocampos dos animais epiléticos tratados com as CMMO em relação aos animais

epilépticos não tratados e controle, havendo variações da expressão de cada fator em diferentes tempos após o transplante. A expressão dos fatores BDNF, GDNF, NGF e VEGF mostrou-se elevada e do TGF- $\beta$ 1 reduzida após o transplante das CMMO em relação aos animais epilépticos não tratados. Porém, não houve diferença na expressão destes fatores nos animais epilépticos não tratados em relação aos animais controle, exceto o TGF- $\beta$ 1, o qual se mostrou elevado no grupo de animais epilépticos não tratados em relação aos animais controle. Os resultados deste estudo fornecem dados adicionais sobre o benefício do potencial das CMMO, bem como fornecer uma visão sobre o mecanismo pelo qual as CMMO favorecem a recuperação funcional em ratos epilépticos.

Palavras-chave: Epilepsia, pilocarpina, células mononucleares da medula óssea, fatores tróficos.



## ABSTRACT

Epilepsy affects 1% of the world population and 30% of these patients are refractory to available medication. Stem cells hold hope in the treatment of epilepsy. Given their ability to proliferate, differentiate and production of factors which may activate endogenous mechanisms to restore the injured brain. Knowing that the administration of bone marrow mononuclear cells (BMMC) in animals have therapeutic potential in an experimental model of epilepsy, the aim of this study is to investigate the mechanisms by which administered cells exert their beneficial. In order to better understand the mechanisms of action of transplanted cells, a comparative study was done to detect the expression of trophic factors as brain-derived neurotrophic factor (BDNF), glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF), nerve growth factor (NGF), transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in hippocampi of each experimental groups by ELISA.

Experimental model of epilepsy was induced by pilocarpine injection (320 mg/kg; ip). Seizures were scored by Racine's scale. The duration of SE was controlled with diazepam (10mg/kg; ip; 90 minutes after SE onset). Twenty-two days after SE, rats were randomly assigned into groups: Control, Pilo, Pilo+BMMC evaluated in periods 3, 7 and 14 days after transplant. BMMC groups received cell transplantation (obtained from EGFP C57BL/6 mice) via tail vein ( $1 \times 10^7$  cells, 100 $\mu$ L). While control animals received saline instead of pilocarpine. Pilocarpine-treated animals were monitored for the presence of spontaneous seizures for 22 days (7 days prior to cell transplant).

Our results showed that there was a change in the protein expression of BDNF, GDNF, NGF, TGF- $\beta$  and VEGF in the hippocampus of epileptic animals treated with BMMC compared to untreated epileptic animals and control, with variations in the expression of each factor at different times after transplantation. The expression of BDNF, GDNF, NGF and VEGF was high and TGF- $\beta$ 1 reduced after transplantation of BMMC compared to untreated epileptic animals. However, there was no difference in the expression of these factors in untreated epileptic animals compared to control animals, except TGF- $\beta$ 1, which proved to be high in the group of untreated epileptic animals compared to control animals. The results of this study provide additional data on the potential benefit of BMMC as well as provide insight into the mechanism by which BMMC promote functional recovery in epileptic rats.

Keywords: Epilepsy, pilocarpine, bone marrow mononuclear cells, trophic factors.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Quadro 1: Escala de Racine.....	24
Figura 1: Comparação entre hipocampo humano normal e esclerótico..	3
Figura 2: Modelo de diferenciação das células-tronco..	7
Figura 3: Aplicação de células-tronco no SNC..	8
Figura 4: Delineamento do estudo.....	23
Figura 5: Obtenção de CMMO de camundongos C57BL/6-EGFP .....	25
Figura 6: O tratamento com as CMMO diminui a expressão de BDNF no hipocampo de animais epiléticos.....	29
Figura 7: O tratamento com as CMMO diminui a expressão de NGF no hipocampo de animais epiléticos.....	30
Figura 8: O tratamento com as CMMO diminui a expressão de GDNF no hipocampo de animais epiléticos.....	31
Figura 9: O tratamento com as CMMO diminui a expressão de VEGF no hipocampo de animais epiléticos.....	32
Figura 10: O tratamento com as CMMO diminui a expressão de TGF- $\beta$ 1 no hipocampo de animais epiléticos.....	33
Tabela 1: Revisão dos estudos utilizando células-tronco na epilepsia.....	11
Tabela 2: Constituição dos grupos do estudo. ....	22

## LISTA DE ABREVIATURAS

BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
bFGF	Fator de crescimento básico de fibroblastos
CERs	Crises espontâneas recorrentes
CMMO	Células mononucleares da medula óssea
CTM	Células-tronco mesenquimais
CTMO	Células-tronco da medula óssea
CTNF	Fator neurotrófico ciliar
EFNB1	Efrina-B1
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGFP	Proteína verde fluorescente
ELA	Esclerose lateral amiotrófica
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ELT	Epilepsia do lobo temporal
EMT	Esclerose mesial temporal
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
GD	Giro dentado
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia
GFR $\alpha$ 1	Receptor de GDNF
HI	Hipóxia-isquemia
HSC	Células-tronco hematopoiéticas
HUCB	Células do cordão umbilical humano
IGF-1	Fator de crescimento tipo insulina 1
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
LIF	Fator inibidor de leucemia
MO	Medula óssea
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NGF	Fator de crescimento neural
NMDA	N-metil D-Aspartato

NRCAM	Molécula de adesão de célula neural
NSC	Células-tronco Neurais
PDGF-A	Fator de crescimento derivado de plaquetas A
P75 <sup>NTR</sup>	Receptor de neurotrofina
SE	<i>Status epilepticus</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformador $\beta$
T $\beta$ R	Receptor do TGF- $\beta$
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
TrK	Receptor tirosina-quinase
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VEGFR	Receptor do VEGF

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1	EPILEPSIA .....	1
1.2	EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL (ELT).....	1
1.3	MODELOS EXPERIMENTAIS DE EPILEPSIA.....	4
1.3.1	<b>Modelo Experimental de Epilepsia Induzida por Pilocarpina.....</b>	<b>5</b>
1.4	TERAPIA CELULAR.....	7
1.4.1	<b>Células-tronco da medula óssea (CTMO) .....</b>	<b>9</b>
1.4.2	<b>Células-tronco na epilepsia .....</b>	<b>10</b>
1.5	FATORES TRÓFICOS .....	16
1.5.1	<b>Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF).....</b>	<b>16</b>
1.5.2	<b>Fator de Crescimento Neural (NGF).....</b>	<b>17</b>
1.5.3	<b>Fator Neurotrófico Derivado da Glia (GDNF).....</b>	<b>18</b>
1.5.4	<b>Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF).....</b>	<b>18</b>
1.5.5	<b>Fator de Crescimento Transformador <math>\beta</math> (TGF-<math>\beta</math>).....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
3.1	ANIMAIS.....	21
3.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	21
3.3	INDUÇÃO DA EPILEPSIA COM O USO DO MODELO PILOCARPINA .....	23
3.4	PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS .....	24
3.4.1	<b>Obtenção das células mononucleares da medula óssea .....</b>	<b>24</b>
3.5	COLETA E PREPARAÇÃO DO TECIDO.....	27
3.6	QUANTIFICAÇÃO DOS FATORES TRÓFICOS POR ELISA .....	27
3.7	ANÁLISE ESTÁTISTICA.....	27
4	RESULTADOS.....	28
4.1	EPILEPSIA INDUZIDA POR PILOCARPINA .....	28
4.2	O TRATAMENTO COM AS CMMO MODULA A EXPRESSÃO PROTEICA HIPOCAMPAL DE FATORES TRÓFICOS NOS ANIMAIS EPILEPTICOS.....	28

4.2.1	Transplante de CMMO aumenta os níveis hipocampais de BDNF em ratos epiléticos.....	28
4.2.2	Transplante de CMMO aumenta os níveis hipocampais de NGF em ratos epiléticos.....	29
4.2.3	Transplante de CMMO aumenta os níveis hipocampais de GDNF em ratos epiléticos.....	30
4.2.4	Transplante de CMMO aumenta os níveis hipocampais de VEGF em ratos epiléticos.....	31
4.2.5	Transplante de CMMO diminui os níveis hipocampais de TGF-β1 em ratos epiléticos.....	33
5	DISCUSSÃO .....	34
6	CONCLUSÃO.....	47
7	PERSPECTIVAS .....	48
	REFERÊNCIAS.....	49
	ANEXOS .....	65
	ANEXO A – Artigo científico submetido à revista Experimental Neurology .....	66

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 EPILEPSIA

Estima-se que a incidência de epilepsia atinja cerca de 1% da população nos países desenvolvidos e cerca de 2% nos países em desenvolvimento, apesar das dificuldades metodológicas para a determinação e na obtenção de dados acerca desta doença (Engel 2001; Sander and Hart 1999).

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

## 1.2 EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL (ELT)

Entre as epilepsias refratárias, aquelas com origem no lobo temporal são as mais frequentes (Blumcke et al. 1996; Valério 1995; Yacubian 1998). A epilepsia do lobo temporal (ELT) é caracterizada clinicamente pelo desenvolvimento gradativo de crises espontâneas e recorrentes (CERs) – crises parciais complexas, com ou sem generalização secundária, associadas à perda neuronal e ao declínio do desempenho cognitivo progressivos, independentemente da doença subjacente. Na maioria das vezes, antes da apresentação de CERs, os pacientes experimentam crises convulsivas febris prolongadas na infância ou outros danos iniciais nos primeiros anos de vida, seguido de período livre de crises que perdura por um longo tempo. Alguns estudos evidenciam que essas crises convulsivas febris prolongadas estejam envolvidas com o desenvolvimento da ELT (Dube et al. 2009). Em um estudo foi mostrado diferenças fenotípicas entre os hipocampus de pacientes com



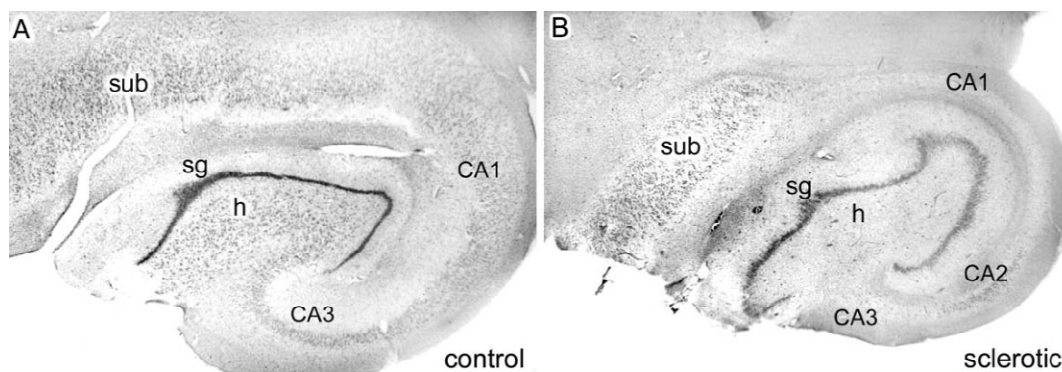
epilepsia mesial do lobo temporal que apresentaram crises convulsivas febris e os que não apresentaram essas crises durante a infância, como por exemplo, maior perda neuronal no hipocampo dos pacientes que apresentaram essas crises anteriormente (Bando et al. 2011). As crises do lobo temporal frequentemente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

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

Na maioria das ELT há comprometimento das estruturas mesiais do lobo temporal, estabelecendo-se a esclerose mesial temporal (EMT) (Leite and Cavalheiro 1998). As principais modificações fisiopatológicas da EMT incluem morte neuronal, gliose reativa, brotamentos de colaterais axônicas das células granulares (fibras musgosas) na região da camada molecular interna do giro denteado, alterações na morfologia e localização dos dendritos, e neurogênese na camada subgranular do giro denteado (Blumcke et al. 1999; Blumcke et al. 2002; Guedes et al. 2006). Alguns pacientes com ELT, também, podem apresentar esclerose do lobo temporal associada com a esclerose hipocampal. Em um estudo foi verificado que, aproximadamente, 11% dos pacientes com esclerose hipocampal eram acompanhados de esclerose do lobo temporal,

sugerindo que este processo seja acompanhado de uma displasia reorganizacional e uma extensão da EMT, e não adquirida como uma patologia separada (Thom et al. 2009).

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



**Figura 1. Figura comparativa entre hipocampo humano normal e esclerótico.**

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

Existem teorias que tentam explicar como a estrutura hipocâmpal está envolvida com o início das CERs, sendo que a morte das células musgosas da região hilar parece ser um mecanismo fundamental para o quadro epileptogênico. A teoria das “células em cesto dormentes” postula que a morte neuronal do hilo do giro denteado promove uma perda da excitação das células GABAérgicas em forma de cesto, que por sua vez deixam de inibir as células granulares e estas passam a apresentar maior saída excitatória. Já a hipótese do “brotamento sináptico” propõe que a perda do alvo das células granulares,

provocada pela morte das células musgosas, induz uma reorganização sináptica e axonal destas em direção à camada molecular interna do hilo do giro denteado, criando um circuito recorrente monossináptico excitatório entre as células granulares. A veracidade destas teorias tem sido contestada tanto do ponto de vista fisiológico como anatômico. No entanto, acredita-se que estas hipóteses não são excludentes, e que tanto os mecanismos de reorganização axonal, como os de desinibição poderiam estar envolvidos no processo de epileptogênese da EMT (Leite and Cavalheiro 1998; Sloviter 1991).

### 1.3 MODELOS EXPERIMENTAIS DE EPILEPSIA

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

Os principais modelos experimentais de epilepsia do lobo temporal envolvem condições nas quais a epilepsia é consequência de um dano encefálico induzido por um episódio agudo de SE, este podendo ser desencadeado através da aplicação de convulsivantes químicos, como pilocarpina ou cainato, ou por estimulação elétrica (*kindling*). Nesses modelos, o SE é interrompido depois de determinado tempo e os animais ficam em um estado latente por um período que varia de duas semanas a vários meses. Ao final desse tempo, passam a apresentar CERs que persistem por toda a vida

(Coulter et al. 2002). Assim, em geral, estes modelos reproduzem melhor a epilepsia humana, porque apresentam CERs precedidas por uma fase de latência e alterações neuropatológicas semelhantes às aquelas encontradas em indivíduos com ELT.

### **1.3.1 Modelo Experimental de Epilepsia Induzida por Pilocarpina**

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

Extraída das folhas das plantas sul-americanas *Pilocarpus jaborandi* e *Pilocarpus microphyllus*, a PILO é um alcalóide que induz um estado comportamental crônico que parece depender da facilitação de descargas em salva em neurônios hipocâmpais, por meio do bloqueio de correntes iônicas de potássio, que são dependentes da ativação muscarínica ( $I_M$ ) (Sanabria and Cavalheiro 2000). A partir da ativação de muitos neurônios durante o SE induzido pela PILO, ocorre uma ativação secundária do sistema glutamatérgico e assim, excitotoxicidade no hipocampo e demais estruturas. O dano neuronal excitotóxico agudo associado a outras alterações moleculares leva a morte neuronal, mecanismos de reorganização sináptica, sinaptogênese e neurogênese no giro denteado, bem como mudanças nas propriedades eletrofisiológicas neuronais. Alterações decorrentes na circuitaria hipocâmpal compõem um quadro permanente de epileptogênese (Sanabria and Cavalheiro 2000).

O modelo de pilocarpina é amplamente utilizado em uma série de estudos. Dependendo dos objetivos dos experimentos, são usados diferentes

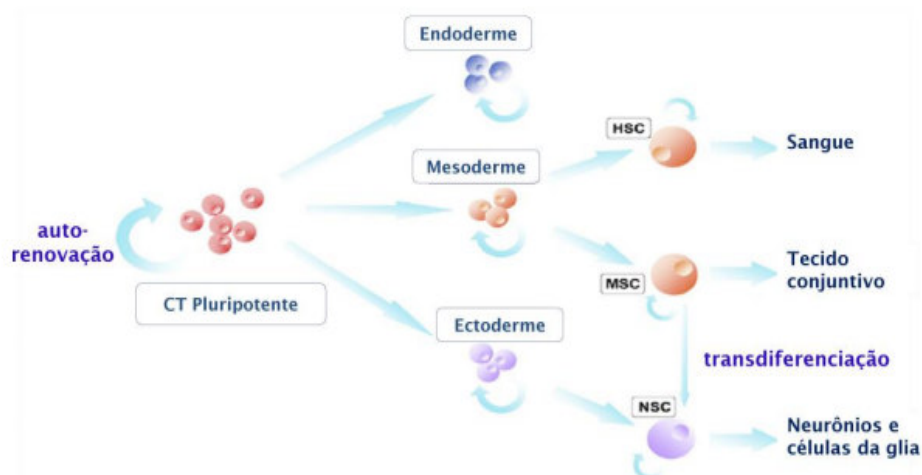
dosagens de pilocarpina, procedimentos de pré e pós-tratamento, e também, diversas linhagens de animais (Curia et al. 2008). Ao receber PILO, os animais ficam em SE duradouro de, no mínimo, 30 minutos. Os ratos apresentam crises epiléticas de intensidade variável, caracterizadas por imobilidade, tremor, automatismo bucofaciais, abalos de extremidades, ataxia e crises tônico-clônicas. Esta crise aguda é seguida por um período silencioso, com normalização progressiva do EEG, sendo uma fase em que o animal permanece sem crises comportamentais e que dura em média 14 a 25 dias. A partir daí, surgem crises epiléticas espontâneas recorrentes, caracterizando a fase crônica (Cavalheiro et al. 1991; Leite et al. 1990).

Neste modelo, a perda neuronal está localizada principalmente nas regiões do hipocampo, córtex piriforme e entorrinal, tálamo, amígdala e neocórtex (Turski et al. 1983). Além disso, a extensão da lesão hipocampal está diretamente relacionada com a duração do SE (Lemos and Cavalheiro 1995). Tanto na epilepsia do lobo temporal humana quanto em modelos experimentais de epilepsia crônica, a perda progressiva de neurônios correlaciona-se com o acometimento de estruturas importantes na memória e aprendizagem, comprometendo estas funções (Sarkisian et al. 1997). Evidências clínicas, complementadas por estudos em laboratório sugerem que há um grande déficit cognitivo após o SE, inferido através de medidas de aprendizagem ou memória. Em particular, há relatos do comprometimento tanto da memória explícita, quanto da memória implícita (Holmes 1997; Liu et al. 1994).

Atualmente o tratamento medicamentoso das epilepsias é essencialmente sintomático, visando primariamente o controle das crises. Este é realizado com fármacos antiepiléticos. No entanto, aproximadamente 30% dos pacientes não respondem a esta terapêutica, tornando-se refratários ao tratamento (Loscher 2002). A intervenção cirúrgica da epilepsia pode ser uma opção para estes pacientes, mas a remoção da área epileptogênica pode determinar eventual perda de funções cerebrais limitando o número de pacientes que podem receber este tratamento. Dentro desse panorama, torna-se fundamental que sejam estudadas e disponibilizadas novas alternativas terapêuticas, entre elas a terapia com células-tronco.

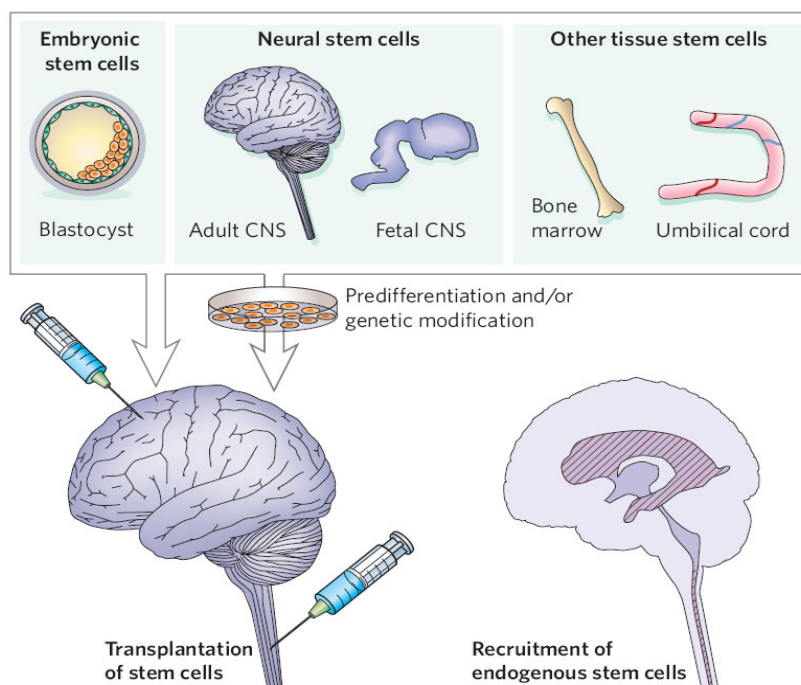
## 1.4 TERAPIA CELULAR

As células-tronco representam uma unidade natural do desenvolvimento embrionário e da reparação tecidual, são um subconjunto de células imaturas, indiferenciadas e não especializadas. Estas células apresentam a capacidade tanto de se autorregenerar, quanto de se diferenciar e originar diferentes linhagens celulares (Figura 2). As células-tronco são em geral classificadas segundo sua origem em células-tronco embrionárias e células-tronco “adultas” ou somáticas. As células-tronco embrionárias são derivadas do blastocisto e são totipotentes, isto é, têm a capacidade de se diferenciar em células derivadas de endoderma, mesoderma e ectoderma. As células-tronco adultas ou somáticas são células ainda indiferenciadas que, no entanto, se encontram em tecidos diferenciados ou especializados. São células ditas multipotentes, por terem capacidade de diferenciação mais restrita e são responsáveis pelo reabastecimento tecidual ao longo da vida. Estão presentes na maioria dos tecidos, tais como, o sangue, a pele, o fígado, o coração e o cérebro (Kaji and Leiden 2001; Morrison et al. 1997).



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

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



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

Recentemente, estudos têm demonstrado que o transplante de células-tronco tem melhorado a função em modelos experimentais de acidentes vasculares cerebrais (Haas et al. 2005), doença de Parkinson, doença de Huntington (Dunnett and Rosser 2004), traumatismo raquimedular (Koda et al. 2005) e epilepsia (Costa-Ferro et al. 2012; Venturin et al. 2011). Mezey e colegas demonstraram em seu estudo com humanos que células-tronco da medula óssea se transdiferenciaram em células nervosas no cérebro adulto (Mezey et al. 2000; Mezey et al. 2003).

### 1.4.1 Células-tronco da medula óssea (CTMO)

Apesar das células-tronco neurais (NSC) serem consideradas padrão-ouro para o tratamento de doenças neurológicas, um dos maiores obstáculos para seu uso clínico é a dificuldade de sua obtenção. Questões ético-religiosas envolvidas na extração deste material – proveniente de tecido fetal e/ou post-mortem – e as preocupações com os riscos de resposta imunológica ou de formação de tumores malignos também inibem a aplicabilidade clínica dessas células. Por outro lado, as vantagens em se estudar células-tronco da medula óssea (MO) incluem a maior facilidade de obtenção, sendo que podem ainda ser obtidas em maior quantidade (ideal para aplicação clínica) do que as demais células-tronco adultas. Ainda, elas podem ser obtidas a partir de uma pequena amostra de MO de um dado paciente, expandidas em cultura, e administradas a este mesmo doador.

A MO é uma fonte permanente de células-tronco e contém três tipos de populações: células-tronco hematopoiéticas (HSC), células-tronco mesenquimais (CTM) e possivelmente progenitoras endoteliais (Korbling and Estrov 2003). As HSCs são capazes de diferenciar-se na linhagem linfoide, que dá origem aos linfócitos B e T, e na linhagem mieloide, que origina basófilos, eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, plaquetas e eritrócitos (Fuchs and Segre 2000). E as CTMs podem gerar, entre outras, células ósseas e cartilagem (Korbling and Estrov 2003; Petersen et al. 1999). No entanto, para serem consideradas CTMs, estas precisam ser aderentes e diferenciar-se em osteoblasto, adipócitos e condroblastos *in vitro* obrigatoriamente (Dominici et al. 2006).

Já foi demonstrado que as células da MO podem dar origem, *in vivo*, a células de outras linhagens como microglia e neurônios (Brazelton et al. 2000; Eglitis et al. 1999; Mezey et al. 2000). Além disso, a transdiferenciação de células da MO em neurônios no SNC foi também demonstrada em seres humanos (Cogle et al. 2004; Mezey et al. 2003). A incorporação destas células no tecido nervoso parece ser intensificada frente a um dano tecidual. Ainda, mesmo que estas células não regenerem o tecido lesado por



transdiferenciarem-se em determinado tipo celular, é provável que a recuperação de funções cerebrais ou estabilização da doença neurológica ocorra por outros mecanismos biológicos, tais como a fusão celular, liberação de citocinas, ativação de células endógenas ou expressão/modulação de fatores tróficos. Além disso, as células-tronco da MO têm se mostrado eficazes em muitos estudos com modelos experimentais de inúmeras doenças do sistema nervoso, como em lesões da medula espinhal (Koda et al. 2005), acidentes vasculares cerebrais (Haas et al. 2005), doença de Parkinson (Levy et al. 2008) e também na epilepsia (Costa-Ferro et al. 2012; Costa-Ferro et al. 2010; Venturin et al. 2011).

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

#### **1.4.2 Células-tronco na epilepsia**

Na epilepsia, a exemplo de outros distúrbios do SNC, há perda de subpopulações neuronais, o que representa uma consequência importante na patogenia da doença. Esta observação vem estimulando a pesquisa que objetiva repor seletivamente os neurônios perdidos durante o processo da doença, bem como os mediadores fisiológicos que eles produzem. Estratégias terapêuticas envolvendo o transplante de células-tronco começaram a ser amplamente estudadas em modelos experimentais de epilepsia (tabela 1).

**Tabela 1. Revisão dos estudos utilizando células-tronco na epilepsia.**

Referência	Modelo; animal; período de tratamento	Tipo celular; concentração; via de administração	Resultados Comportamentais	Resultados Morfológicos, Celular e Molecular	Migração e Diferenciação Celular
(Chu et al. 2004)	Lítio-pilo; ratos Sprague-Dawley; período agudo.	NSC; $5 \times 10^5$ ; i.v.	↓CERs; ↓ excitabilidade neuronal em CA3, através da avaliação do fEPSP extracelular.	NA	As análises imunohistoquímicas mostraram que as NSCs migraram para regiões de ambos os hipocampos. NSCs diferenciaram-se em GABA+ no hipocampo (6 semanas após o SE).
(Guttinger et al. 2005)	Abrasamento, ratos Sprague-Dawley; período crônico.	Adk-/- ES; $1.5 \times 10^5$ ; i.c.v	Grupos tratados com as Adk-/- ES mostraram resistência a crises e ↓ atividades eletroencefalográficas.	Adk-/- ES se encontravam viáveis na análise histológica 2 dias após o transplante.	NA
(Ruschenschmidt et al. 2005)	Pilo; ratos Wistar; período crônico	ESN; $5-8 \times 10^4$ ; intrahipocampal	ESNs possuíam a capacidade de gerar potenciais de ação e expressar correntes de voltagem dependentes de Na+ e K+, bem como a hiperpolarização das correntes ativadas.	ESNs exibiram propriedades intrínsecas e sinápticas características de neurônios após transplante em controles e ratos epiléticos.	Permaneceram clusters nos locais do transplante ou próximos aos canais de injeção. Deram origem a uma densa rede de processos que se estendem ao longo de grandes distâncias para as regiões do corpo caloso, CA1 e CA3.
(Carpentino et al. 2008)	KA; camundongos B6.CB17 SCID; crônico.	ESNP; 50.000 células; intrahipocampal	NA	As crises causam alterações moleculares em CA3 e DG que promovem regiões específicas de diferenciação neuronal e suprime a formação de tumores.	ESNP migraram de CA3 para o DG 4-8 semana pós-transplante, a maioria diferenciaram-se em neuroblastos ou neurônios granulares e astrócitos. ENSPs transplantadas na fímbria migraram ao longo dessa região e se diferenciaram em oligodendrócitos ou astrócitos.
(Hattiangady et al. 2008)	KA, Ratos Fischer 344; período crônico	Precusores do estriado; $2 \times 10^5$ ; intrahipocampal	↓frequência de (67 - 89%) em 9-12 meses pós-transplante	Transplante das células preservou a expressão de calbindina no hipocampo, mas não teve efeito sobre o	87% das células transplantadas se diferenciaram em neurônios, e 69% dessas diferenciaram-se em neurônios GABA-érgicos de diferentes subclasses.

Referência	Modelo; animal; período de tratamento	Tipo celular; concentração; via de administração	Resultados Comportamentais	Resultados Morfológicos, Celular e Molecular	Migração e Diferenciação Celular
				brotamento de fibras musgosas	
(Baraban et al. 2009)	Camundongos Kv1.1/Kcna1; pré-epilepsia (P1-P3)	Precusores de interneurônios GABAérgicos; 4x10 <sup>5</sup> ; intracortical	Redução na atividade eletrográfica de crise; tendência ao aumento da sobrevida.	NA	Células expressaram GABA, PV, SOM, NPY e CR.
(Jing et al. 2009)	KA; ratos F344; período crônico	NSCs adultas com ou sem infusão de EPO; 1.2x10 <sup>6</sup> ; intrahipocampal	↓ frequência dos picos anormais nos animais tratados com as NSCs quando comparados com os não tratados no EEG.	↑ interneurônios NPY+ e GAD67+. NSCs suprimiu também o brotamento de fibras musgosas e ↓ excitabilidade do hipocampo, impedindo desenvolvimento de CERs.	Maioria das NSCs diferenciaram-se em células GFAP+. A infusão de EPO ↑ sobrevivência das NSCs (5 semanas em CA3 e SGZ), mas não influenciou na diferenciação neuronal ou na migração.
(Li et al. 2009)	KA; camundongos C57BL/6 com epileptogênese CA3-seletiva, período agudo	Adk -/- hMSC; 50.000 células; intrahipocampal	↓ intensidade das crises, mediada pela secreção de adenosina e ativação de receptores.	NA	Células presentes somente na fissura intrahipocampal ipsilateral.
(Waldau et al. 2010)	KA; Ratos Fischer 344; período crônico	NSCs a partir da MGE embrionária; 80.000 células; intrahipocampal	↓ frequência, duração e gravidade das crises. Não houve melhora na aprendizagem e memória dos animais.	MGE-NSC não melhorou a neurogênese nos ratos com epilepsia.	A maioria das MGE-NSC transplantadas se diferenciaram em células que expressam S-100β+ e GDNF. E migraram principalmente para regiões de CA3.
(Costa-Ferro et al. 2010)	Lítio-Pilo; ratos Wistar; período agudo	CMMO; 1x10 <sup>7</sup> ; i.v	15 dias pós-transplante animais não desenvolveram CERs; 120 dias após o transplante somente 25% dos animais transplantados desenvolveram CERs versus	CMMO preservam a densidade de neurônios e o volume hipocampal.	CMMO encontradas no hipocampo, córtex perirrinal e amígdala basomedial em 1,3, 5, 10 e 120d pós-transplante.

Referência	Modelo; animal; período de tratamento	Tipo celular; concentração; via de administração	Resultados Comportamentais	Resultados Morfológicos, Celular e Molecular	Migração e Diferenciação Celular
			100% dos controles; CMMO preservam a LTP.		
(Hartman et al. 2010)	KA, camundongos B6.CB17-Prkdc scid/SzJ, período crônico	ESNP; 50.000 células; intrahipocampal	NA	As ESNPs mostraram quimiotaxia para CXCL12, tanto <i>in vitro</i> como <i>in vivo</i> . As crises ↑ a expressão de CXCL12 no hipocampo dos animais, com isso a migração das ENPS.	ESNPs transplantadas no DG mostraram migração através da camada superior, ao longo do eixo septotemporal do hipocampo. ESNPs sobreviveram e se diferenciaram em neuroblastos e subseqüente em neurônios granulares do DG.
(Shen et al. 2010)	KA; ratos Wistar, período agudo	HSC; 100.000 - 150.000 células; intrahipocampal	HSC ↓ descargas elétricas no tecido epiléptico	HSC ↓ a ocorrência de brotamento de fibras musgosas e restauraram parte da população de neurônios piramidais de CA3	NA
(Shindo et al. 2010)	Abrasamento; camundongos C57BL/6N, período crônico	ESNP, 2x10 <sup>5</sup> ; intrahipocampal	ESNP promoveu recuperação dos animais 6 dias pós-transplante.	NA	Observadas células positivas para Hu, GAD67 e GFAP
(Abdanipour et al. 2011)	Pilo; ratos Sprague-Dawley; período crônico	BMSC; 3x10 <sup>6</sup> ; i.v	Animais tratados com as BMSCs ↓ crises.	↑ densidade neuronal no grupo tratado com as BMSC.	BMSC migraram para o hipocampo lesado e se diferenciaram em neurofilamentos.
(Jeon et al. 2011)	Pilo; camundongos C57BL/6; período agudo e crônico	ASCs-E humanas; i.p	Transplante realizado antes do SE ↓ o dano à BHE e inibiu o desenvolvimento da epilepsia. Transplante feito no período crônico suprimiu as CERs, e melhorou a locomoção e ansiedade.	A expressão de genes relacionados com a inflamação ou respostas imunes apresentaram baixa regulação no grupo ASC-E. A expressão de genes relacionados com canais de íons, incluindo receptor GABA.	NA

Referência	Modelo; animal; período de tratamento	Tipo celular; concentração; via de administração	Resultados Comportamentais	Resultados Morfológicos, Celular e Molecular	Migração e Diferenciação Celular
(Shu et al. 2011)	Lítio-pilo; ratos Wistar, período agudo	NSC e CT1-NSC; $1,5 \times 10^8$ ; intrahipocampal	NA	CT1-NSC ↓ o brotamento de fibras musgosas.	NA
(Venturin et al. 2011)	Lítio-Pilo; ratos Wistar; período crônico	CMMO; $1 \times 10^7$ ; i.v	CMMO ↓ frequência de CERs e reverteu déficit cognitivo, melhorando a aquisição e retenção da memória espacial dos animais epiléticos.	NA	CMMO migraram para o cérebro dos animais, e estavam presentes nos períodos de 24h, 2 semanas e 1 mês após o transplante.
(Costa-Ferro et al. 2012)	Lítio-Pilo; ratos Wistar; epiléticos crônicos precoces e crônicos tardios	CMMO; $1 \times 10^7$ ; i.v	CMMO ↓ frequência e duração de crises tanto em animais epiléticos crônicos tratados precocemente, quanto tardiamente.	CMMO ↓ níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) e ↑ os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10; CMMO foram neuroprotetoras, diminuindo a perda neuronal e gliose; foram detectadas cels positivas para DCX, indicando haver proliferação induzida pelas células.	Células migram até o hipocampo epilético, mas não expressam marcadores neurais.
(Maisano et al. 2012)	Pilo, camundongos C57BL/6, período crônico	ESNP; 100.000 células; intrahipocampal	NA	ESNPs estabeleceram arborização axonal no hilo; não houve alteração no brotamento de fibras musgosas; identificação de células integradas no sistema por eletrofisiologia. ↑ níveis de GABA.	Céls nas camadas granular e molecular do giro dentado; Maioria das céls expressando NeuN, PV e CB, indicando diferenciação em interneurônios GABAérgicos.
(Long et al. 2012)	Pilo; ratos Sprague-Dawley; período agudo	BMSC e H-BMSC; $5 \times 10^6$ ; i.v	Os resultados mostraram que a frequência de CERs, a mortalidade, e a incidência	↑ densidade neuronal das áreas corticais após transplante.	As H-BMSC transplantadas migraram para áreas parahipocampais corticais adjacentes e expressaram GAD67, NSE

Referência	Modelo; animal; período de tratamento	Tipo celular; concentração; via de administração	Resultados Comportamentais	Resultados Morfológicos, Celular e Molecular	Migração e Diferenciação Celular
			de ondas epileptiformes no EEG apresentaram uma tendência a diminuir após 4 semanas do transplante.		e GFAP, sendo capazes de se diferenciar em neurônios GABAérgicos ou astrócitos, após 4 semanas do transplante.

**Abreviações:** **ASCs-E:** Extrato citosólico de células-tronco adiposas humanas; **Adk-/- ES:** Células-tronco embrionárias modificadas para liberar adenosina; **BHE:** Barreira hemato encefálica; **BMSC:** Células-tronco da medula óssea; **CB:** Calbidina **CER:** Crises espontâneas e recorrentes; **CMMO:** Células mononucleares da medula óssea; **CR:** Calretina; **CT1-NSC:** Células-tronco neurais superexpressando cardiotrofina; **CXCL12:** Quimiocina ligante 12 **DG:** Giro dentado; **DCX:** Doublecortina; **EEG:** Eletroencefalograma; **eGFP+:** Proteína verde fluorescente; **EPO:** Eritropoietina; **ESN:** Neurônios derivados de células-tronco embrionárias; **ESNP:** Progenitores neurais derivados de células-tronco embrionárias; **fEPSP:** Campo de potencial excitatório pós-sináptico; **GABA:** Interneurônio inibitório; **GAD67+:** Ácido glutâmico descarboxilase 67; **GDNF:** Fator neurotrófico derivado da glia; **GFAP+:** Marcador de astrócitos **H-BMSC:** Células-tronco da medula óssea com baixa regulação de Hes-1; **hMSC:** Células-tronco mesenquimais humanas; **HSC:** Células-tronco hipocâmpais; **Hu:** Marcador neuronal; **i.c.v:** intracerebroventricular; **i.p:** intraperitoneal; **i.v:** intraventricular; **KA:** Modelo do ácido cáinico; **Lítio-pilo:** Modelo da Pilocarpina associado a lítio; **LTP:** Potencial de longa duração; **MGE:** Eminência medial ganglionar; **NA:** não avaliado; **NeuN:** Marcador de núcleo neuronal; **NPY:** Neuropeptídeo Y; **NSC:** Células-tronco neurais; **NSE:** Enolase neuronal específica; **Pilo:** Modelo da Pilocarpina; **PV:** Parvalbumina **SGZ:** Zona subgranular; **SOM:** Somatostatina; **S-100β+:** Marcador de astrócito.

## 1.5 FATORES TRÓFICOS

Fatores neurotróficos controlam vias de sinalização intercelulares e intracelulares que moldam circuitos neuronais durante o desenvolvimento do cérebro e regulam a sobrevivência das células, a diferenciação celular, a síntese de neurotransmissores, a plasticidade sináptica e excitabilidade no cérebro adulto (Mattson et al. 2004; Weisenhorn et al. 1999). Várias moléculas tróficas apresentaram ter um impacto sobre a sobrevivência e crescimento neuronal, desde a descoberta do fator de crescimento neural (NGF) por Rita Levi-Montalcini em 1952. A capacidade de neuroproteção e regeneração dessas moléculas ainda está sendo investigada em muitas doenças do sistema nervoso central e periférico.

Sabe-se hoje que novos neurônios podem ser integrados a determinadas regiões do encéfalo adulto, a partir de células progenitoras ou células-tronco adultas neurais, em um processo chamado neurogênese (Gross 2000), e este processo pode ocorrer devido a ação de fatores neurotróficos, como um mecanismo de neuroproteção (Oliveira et al. 2012). Estudos demonstraram que diversos tipos de células-tronco podem expressar diferentes fatores tróficos (Chen et al. 2002; He et al. 2010; Lee et al. 2012). Assim, as células-tronco poderiam promover a recuperação funcional por outros meios que não a reposição celular direta, como através da secreção desses fatores. Estes poderiam, por sua vez, promover a migração, sobrevivência e diferenciação de células progenitoras neurais endógenas (Chopp and Li 2002; Oliveira et al. 2012).

### 1.5.1 Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF)

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é um membro da família das neurotrofinas. Um dos fatores mais importantes dentro do SNC, e um dos mais amplamente distribuído no cérebro, que atua especificamente através de um receptor de alta afinidade na superfície celular, o receptor tirosina-quinase B (TrkB) (Hofer et al. 1990). Neurotrofinas regulam o crescimento, a diferenciação, a sobrevivência e a plasticidade neuronal (Huang and Reichardt 2001). E o BDNF parece ser um dos mais ativos nesses

processos (Pencea et al. 2001; Zigova et al. 1998). O BDNF atua sobre os neurônios do SNC, desempenhando um papel fundamental no desenvolvimento cerebral. Durante o desenvolvimento do hipocampo e córtex cerebral, o BDNF induz a diferenciação de progenitores neurais e promove a sobrevivência dos novos neurônios e a plasticidade sináptica. (Acheson et al. 1995; Barnabe-Heider and Miller 2003; Cheng et al. 2003; Lee et al. 2002).

Tem sido demonstrado um aumento dos níveis de mRNA do BDNF após eventos relacionados com a aprendizagem, memória e recuperação motora, onde o BDNF foi capaz de promover plasticidade sináptica e axonal (Bramham et al. 1996; Castren et al. 1993; Mizuno et al. 2000; Schabitz et al. 2004). Sabendo que síntese de BDNF é aumentada em processos epileptogênicos, bem como a expressão ou ativação de receptores TrkB (Bengzon et al. 1993; Binder et al. 2001; Binder et al. 1999; Ernfors et al. 1991; Gall and Lauterborn 1992; Katoh-Semba et al. 1999), essa neurotrofina tem sido vista como um alvo terapêutico para o tratamento da ELT (Koyama and Ikegaya 2005; Simonato et al. 2006a).

### **1.5.2 Fator de Crescimento Neural (NGF)**

Fator de crescimento neural (NGF), também membro da família das neurotrofinas foi descoberto como uma molécula que regula a sobrevivência e maturação de desenvolvimento de neurônios sensoriais e simpáticos do sistema nervoso periférico (SNP) (Levi-Montalcini and Hamburger 1951). Atua através dos receptores tirosina-quinase A (TrkA) e o receptor de neurotrofina (p75<sup>NTR</sup>) (Bothwell 1995; Kaplan and Miller 1997). NGF induz a sinalização através de TrkA (Loeb et al. 1991).

A expressão de NGF mostrou um aumento em doenças inflamatórias onde mostra suprimir a inflamação (Villoslada and Genain 2004). Terapia gênica com NGF foi capaz de prevenir ou reduzir a degeneração neuronal em modelos animais de doenças neurodegenerativas (Tuszynski and Blesch 2004). Estudos mostraram um aumento dos níveis de NGF no hipocampo de



animais, pouco depois de crises agudas, semelhante ao BDNF (Gall et al. 1991; Lauterborn et al. 1994; Shetty et al. 2003).

### **1.5.3 Fator Neurotrófico Derivado da Glia (GDNF)**

O fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) foi inicialmente identificado como um fator de sobrevivência para os neurônios dopaminérgicos (Lin et al. 1993), além de ter efeitos tróficos semelhantes sobre outras populações neuronais, incluindo motoneurônios (Henderson et al. 1994) e os neurônios noradrenérgicos (Arenas 1996). O GDNF se liga com elevada afinidade ao receptor GFR $\alpha$ -1 e é expresso no hipocampo durante a fase embrionária e adulta (Sarabi et al. 2000).

O GDNF tem sido considerado como um potencial agente terapêutico para a doença de Parkinson (Choi-Lundberg et al. 1997), lesão dos motoneurônios (Lu et al. 2004), acidente vascular cerebral (Lu et al. 2004) e, alguns estudos sugerem que o GDNF também pode ser um agente neuroprotetor contra a epileptogênese, onde a expressão aumentada de GDNF no hipocampo de ratos suprimiu crises epiléticas (Airaksinen and Saarma 2002; Kanter-Schlifke et al. 2007; Kokaia et al. 1999; Li et al. 2002; Martin et al. 1995; Paratcha et al. 2003; Walton 1999; Yoo et al. 2006). No SNC de humanos e ratos, o GDNF é amplamente distribuído, principalmente no hipocampo (Springer et al. 1994), uma região importante na geração de crises. Expressão elevada de GDNF é encontrada nas células piramidais do hipocampo e células granulares do giro dentado (DG) (Pochon et al. 1997). No hipocampo de ratos, o receptor GFR $\alpha$ -1 também é expresso nas células piramidais e granulares (Burazin and Gundlach 1999).

### **1.5.4 Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)**

O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é um sinal químico considerado um regulador crucial da formação de vasos e da permeabilidade

vascular em condições fisiológicas e patológicas. Além disso, apresenta efeitos tróficos em células neuronais e gliais no SNC estimulando o crescimento axonal e a sobrevivência das células nervosas (Carmeliet and Storkebaum 2002; Galvan et al. 2006; Greenberg and Jin 2005; Raab and Plate 2007).

A via de sinalização do VEGF tem sido implicada em várias doenças neurológicas, incluindo epilepsia (Croll et al. 2004). Além disso, a infusão intra-hipocampal de VEGF recombinante protegeu contra a perda neuronal de CA1 do hipocampo no modelo de epilepsia induzida por pilocarpina. Adicionalmente, o VEGF exerceu efeitos anti-convulsivantes em modelo *in vitro* de epilepsia aguda (Newton et al. 2003; Nicoletti et al. 2008).

### **1.5.5 Fator de Crescimento Transformador $\beta$ (TGF- $\beta$ )**

O fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) é uma proteína com propriedades de transformação que facilita vários processos patofisiológicos, tais como o crescimento celular, diferenciação, a síntese de colágeno, vascularização e respostas imunes (Blobe et al. 2000; Roberts and Sporn 1993). TGF- $\beta$  consiste em três isoformas,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 e  $\beta$ 3, em várias espécies de mamíferos, e que exercem o seu efeito ligando-se aos receptores de TGF- $\beta$  tipo I (T $\beta$ R-I) e tipo II (T $\beta$ R-II) (Heldin et al. 1997; Singh et al. 2004).

Estudos sugerem que TGF- $\beta$ 1 e seus receptores são amplamente expressos no SNC (Slotkin et al. 1997; Unsicker et al. 1991), sendo considerado um fator neuroprotetor contra excitotoxicidade e apoptose (Vivien and Ali 2006). Também, desempenha um papel fundamental na comunicação intercelular (Massague and Wotton 2000).

Há evidências que o receptor T $\beta$ R-I está envolvido na patogênese da epilepsia através da regulação da captação de albumina em astrócitos, e além disso, a atividade epiléptica induzida pode ser bloqueada por um inibidor deste receptor (Ivens et al. 2007). Estes achados sugerem que os receptores estão envolvidos na epileptogênese e poderia ser um novo alvo terapêutico.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a modulação da expressão hipocampal de fatores tróficos após o transplante de células mononucleares da medula óssea em ratos com epilepsia induzida por pilocarpina.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a expressão de BDNF em hipocampo de animais controle, epiléticos não tratados e epiléticos tratados com CMMO em diferentes tempos.
2. Avaliar a expressão de GDNF em hipocampo dos animais em diferentes períodos após o transplante das CMMO em relação aos grupos não tratados.
3. Verificar os efeitos do transplante de CMMO sobre a expressão hipocampal de NGF em diferentes tempo entre os grupos;
4. Analisar em diversos tempos a modulação de VEGF induzida pelo transplante de CMMO em comparação aos animais não transplantados;
5. Avaliar a expressão de TGF- $\beta$ 1 nos hipocampos dos animais em diferentes períodos após o transplante das CMMO em relação aos grupos não tratados.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado no Laboratório de Neurociências e Laboratório de Sinalização Celular do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) e Instituto do Cérebro (InsCer) da PUCRS, onde possuem todos os equipamentos necessários para a realização dos experimentos.

#### 3.1 ANIMAIS

Neste estudo foram utilizados 32 ratos machos, da linhagem Wistar, entre 40-50 dias de vida. Todos os animais foram procedentes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Durante os experimentos, os ratos foram mantidos no alojamento do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, sob iluminação e temperatura controladas (ciclo claro-escuro de 12 horas e aproximadamente 24°C), ração e água *ad libitum*. Também foram utilizados 4 camundongos machos C57BL/6N transgênicos (C57BL/6-EGFP), pesando entre 25-30 gramas. Estes animais foram doadores de CMMO e expressam EGFP (*enhanced green fluorescent protein*), proteína verde fluorescente (Okabe et al. 1997). Todos os estudos foram realizados com a aprovação da Comissão de Ética da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

#### 3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram estabelecidos 5 grupos de estudo (Tabela 2), onde cada grupo continha 4 animais (Figura 3).

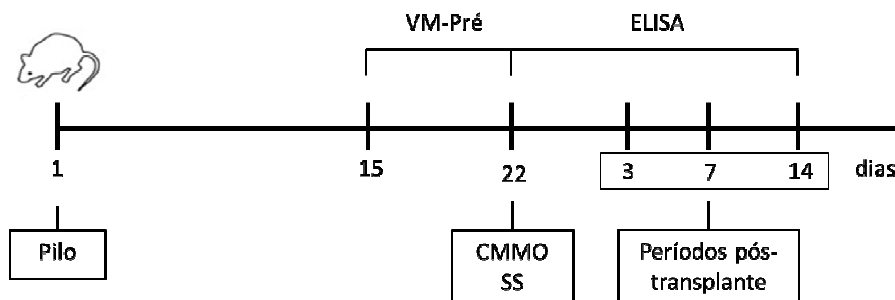
**Controle:** Estes animais receberam solução salina em substituição à PILO aos 45 dias de vida, e 100 µL de solução salina via veia da cauda após completarem 22 dias da injeção de salina.

**Grupo Pilo:** Neste grupo foi induzido SE mediante aplicação de pilocarpina. Os ratos receberam PILO (320 mg/kg, Sigma) via intraperitoneal, conforme previamente descrito (Cavalheiro et al. 1991). Para cessar as manifestações comportamentais da PILO os ratos receberam diazepam (10 mg/kg, i.p., 90 minutos após a instalação do SE). Os ratos foram pré-tratados com metilscopolamina (1mg/kg, i.p.) para atenuar as manifestações periféricas da pilocarpina. Ao completarem 22 dias da injeção de PILO, receberam 100µL de solução salina, via veia da cauda, conforme previamente descrito (Costa-Ferro et al. 2012; Venturin et al. 2011).

**Grupo Pilo+CMMO:** Este grupo recebeu tratamento idêntico aos grupos Pilo, exceto ao completarem 22 dias da injeção de PILO os animais receberam transplante de CMMO no lugar de salina (100 µL contendo  $10^7$  células EGFP<sup>+</sup>), via veia da cauda, conforme previamente descrito (Costa-Ferro et al. 2010). Após o transplante das CMMO, este grupo foi subdividido em três grupos: **Pilo+CMMO 3D** (Após 3 dias consecutivos do transplante, quatro animais foram selecionados aleatoriamente e eutanasiados para a remoção dos hipocampus); **Pilo+CMMO 7D** (Após 7 dias consecutivos do transplante, quatro animais foram selecionados aleatoriamente e eutanasiados para a remoção dos hipocampus) e **Pilo+CMMO 14D** (Após 14 dias consecutivos do transplante, quatro animais foram selecionados aleatoriamente e eutanasiados para a remoção dos hipocampus).

**Tabela 2.** Constituição dos grupos.

Grupos	PILO	CMMO	Salina
Controle			
Pilo			
Pilo+CMMO 3D			
Pilo+CMMO 7D			
Pilo+CMMO 14D			



**Figura 4.** Delineamento do estudo. Injeção de pilocarpina no dia 1; 15 dias após a injeção de pilo começa a vídeo-monitorização das crises durante sete dias antes do transplante; No 22º dia é feito o transplante das CMMO ou salina; A expressão dos fatores foi verificada por ELISA em 3, 7 e 14 dias após o transplante das CMMO. Pilo: Pilocarpina; VM-Pré: Vídeomonitoramento pré-transplante; SS: Solução salina, CMMO: Células Mononucleares da Medula Óssea.

### 3.3 INDUÇÃO DA EPILEPSIA COM O USO DO MODELO PILOCARPINA

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

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

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

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

### 3.4 PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS

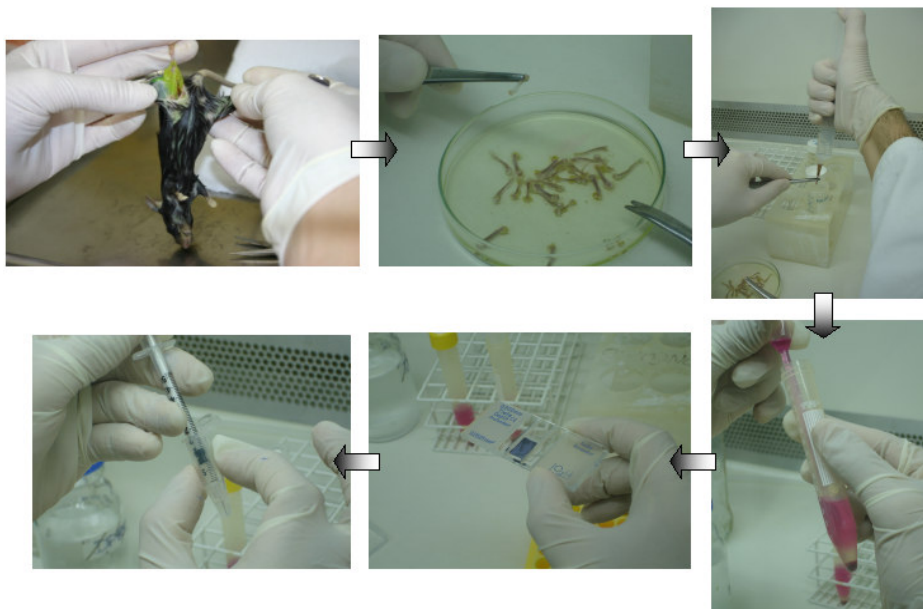
#### 3.4.1 Obtenção das células mononucleares da medula óssea

Para a obtenção das células de medula óssea, os camundongos transgênicos para a proteína fluorescente verde EGFP+ (C57BL/6EGFP) foram anestesiados com 0,4-0,6 ml de uma solução contendo quetamina (0,8%) e cloridrato de xilasina (0,2%), conforme o peso do animal e eutanasiados com dose letal de Tiopental intracardíaco. A seguir, tibia, fêmur e úmero foram dissecados e, foram feitos dois cortes na região das epífises, removendo-as, possibilitando a entrada de uma agulha 26G (0,45mm) na cavidade medular, onde foi injetado 10 mL de DMEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium - GibcoBRL) sem soro.

O material obtido foi ressuspenso e centrifugado a 1.500 rpm durante 10 minutos. O pellet ressuspenso em DMEM sem soro, num volume de cerca de 4 mL foi transferido para um outro tubo de 15 mL contendo 4 mL de Ficoll-Paque (densidade 1.077 g/mL – Sigma Aldrich) (diluição Ficoll:meio de 1:1), evitando que as duas fases líquidas se misturem. Após centrifugação a 400 g por 30 minutos à temperatura ambiente foi coletada a camada de células

mononucleares na interface Ficoll-meio de cultura. As células foram ressuspensas em DPBS e foi realizada contagem e avaliação da viabilidade pelo método de exclusão com azul de Tripán em câmara de Neubauer.

Por fim, são feitas alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  de solução salina 0,9% estéril contendo  $1 \times 10^7$  células mononucleares EGFP<sup>+</sup>, e estas foram transplantadas nos animais pela veia da cauda, 22 dias após a injeção de PILO. Os animais do grupo controle receberam solução salina em mesma quantidade.



**Figura 5 – Obtenção de CMMO de camundongos C57BL/6-EGFP.** Animais são anestesiados e dissecados, isolam-se os ossos longos, e procede-se a lavagem das cavidades ósseas. O material coletado é processado em centrifugações e ressuspensões. Por fim, a camada de células mononucleares é obtida por gradiente de ficoll, e as células são contadas em câmara de Neubauer e aliqüotadas.

### 3.5 COLETA E PREPARAÇÃO DO TECIDO

Após os tempos correspondentes do transplante das CMMO de 3, 7 e 14 dias, os animais foram eutanasiados por decapitação e o encéfalo foi dissecado sobre uma placa de gelo. Foi coletado o hipocampo e estocado em -80°C até a obtenção de todas as amostras. Os hipocampos foram homogeneizados em tampão de lise (137 mM de NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1% NP40, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 50 mM NaF, 1mM



PMSF e pastilha de inibidores de protease), e, em seguida, centrifugou-se a 14000× g durante 10 min a 4°C.

### 3.6 QUANTIFICAÇÃO DOS FATORES TRÓFICOS POR ELISA

Para medir os níveis dos fatores tróficos nos tecidos coletados utilizamos kits de ELISA específicos onde as amostras foram acidificadas e depois neutralizadas a fim de medir o nível total de fatores tróficos. A avaliação da expressão dos fatores BDNF, GDNF, NGF e TGF- $\beta$ 1 foi determinada usando os sistemas de imunoenensaio Emax® (Promega, Madison, WI) e VEGF (PeproTech, Rocky Hill, NJ), de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis de cada fator trófico estão expressos como pg/mg.

ELISA é um imunoenensaio, utiliza um ou mais anticorpos específicos para um determinado antígeno, que depende de uma enzima para a detecção/quantificação da molécula de interesse. Embora existam diversas variações, o princípio comum envolve um conjugado anticorpo-enzima, sendo esta geralmente uma peroxidase, que se ligará ao antígeno revelando sua presença após a conversão de um substrato em uma cor detectável e quantificável. O ELISA pode ser simplificada, dividido nas seguintes etapas:

1. Sensibilização: uma placa acrílica de 96 poços é revestida com o anticorpo (quando se quer detectar antígeno) ou antígeno (quando se quer detectar anticorpo) de escolha.
2. Ligação: a substância contendo o antígeno ou anticorpo ser dosado é posta em contato com os poços da placa para que se liguem e fiquem retidos. A placa é lavada diversas vezes para eliminar as moléculas que não se quer detectar.
3. Adição do conjugado: o conjugado enzima-anticorpo é adicionado ao poço para ligar-se com a molécula que se quer detectar. Novamente o excesso é retirado por múltiplas lavagens do poço.
4. Adição do substrato: o substrato a ser convertido pela enzima é adicionado ao poço. Esse substrato pode ser diretamente convertido

a uma substância de cor detectável, ou ainda um reagente pode ser adicionado formando a cor.

5. Leitura: a detecção/quantificação é feita por um espectrofotômetro, lendo-se a absorbância do poço e calculando-se a concentração a partir de uma curva de quantidades conhecidas.

### 3.7 ANÁLISE ESTÁTISTICA

A ANOVA de uma via seguido de teste de Tukey foi aplicado para a análise dos resultados obtidos por ELISA. Valores com  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Toda a análise estatística foi realizada com auxílio do *software* estatístico *GraphPad Prism 5*.

## 4 RESULTADOS

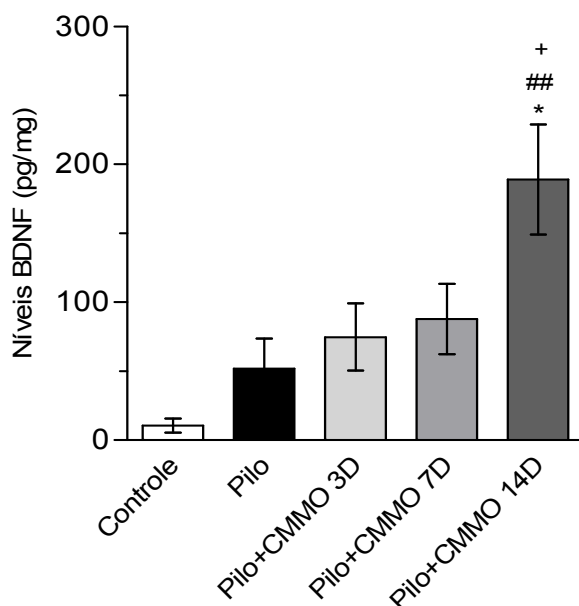
### 4.1 EPILEPSIA INDUZIDA POR PILOCARPINA

Um total de 32 animais recebeu tratamento com pilocarpina. A taxa de mortalidade foi de 28,1% (9/32). Além disso, quatro ratos não apresentaram crises comportamentais correspondentes ao grau 5 da Escala de Racine logo após a injeção de pilocarpina, e outros três animais não apresentaram crises comportamentais durante os sete dias de monitoramento por vídeo, sendo portanto excluídos do estudo. Os animais restantes foram divididos randomicamente entre os grupos.

### 4.2 O TRATAMENTO COM AS CMMO MODULA A EXPRESSÃO PROTEICA HIPOCAMPAL DE FATORES TRÓFICOS NOS ANIMAIS EPILÉPTICOS

#### **4.2.1 Transplante de CMMO aumenta os níveis hipocampais de BDNF em ratos epiléticos**

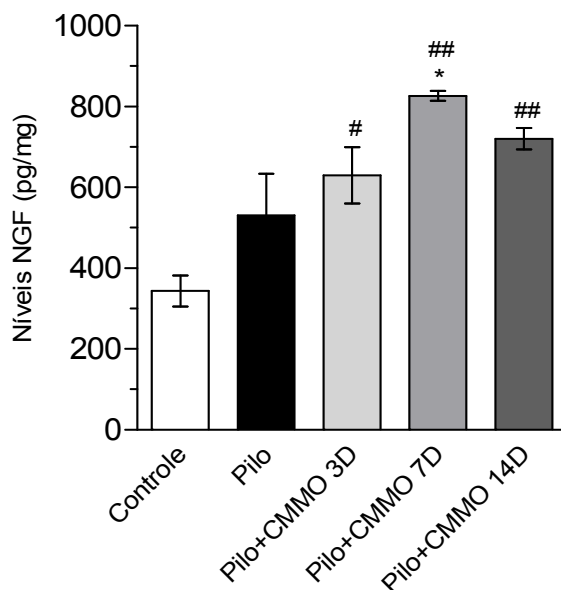
Os níveis de BDNF mostraram-se significativamente elevados no grupo tratado com as CMMO apenas 14 dias após o transplante ( $189,1 \pm 39,90$  pg/mL), onde este aumento foi significativo em relação ao grupo Pilo ( $52 \pm 21,58$  pg/mL;  $p < 0,05$ ) e Controle ( $11 \pm 5,1$  pg/mL;  $p < 0,01$ ), como indicado pelas médias. Entre os grupos tratados, houve maior expressão de BDNF no grupo avaliado 14 dias em relação ao grupo avaliado 3 dias após o transplante das CMMO ( $74,72 \pm 24,46$  pg/mL;  $p < 0,05$ ). Os animais do grupo Pilo não apresentaram diferenças em relação aos animais do grupo Controle. A figura 6 apresenta os níveis hipocampais médios deste fator trófico.



**Figura 6- O tratamento com as CMMO aumenta a expressão de BDNF no hipocampo de animais epiléticos.** O gráfico mostra os níveis de BDNF expressos em pg/mg de tecido, significativamente elevados no grupo Pilo+CMMO 14D em relação aos grupos Pilo e Controle (\*  $p < 0,05$  vs Pilo; ##  $p < 0,01$  vs Controle). O grupo Pilo+CMMO 14D também apresentou maior expressão de BDNF quando comparado com o grupo Pilo+CMMO 3D (+  $p < 0,05$ ). Não houve diferença entre os grupos Pilo e Controle. Os dados estão expressos como a média  $\pm$  EP. Teste de Tukey após ANOVA de uma via,  $n=4$  por grupo.

#### 4.2.2 Transplante de CMMO aumenta os níveis hipocampais de NGF em ratos epiléticos

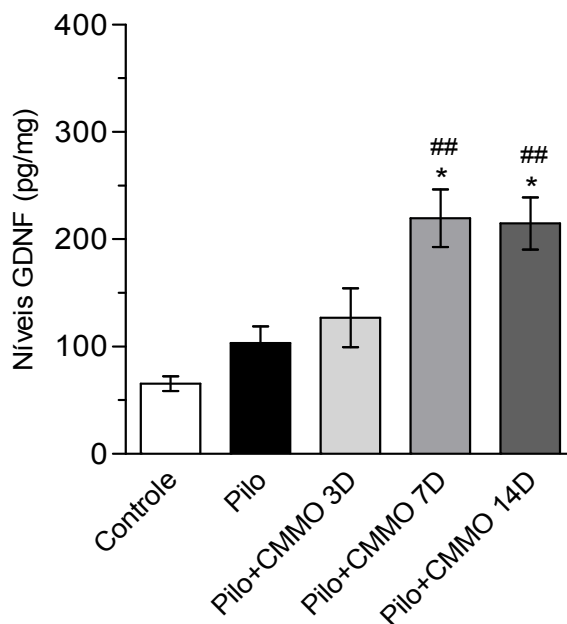
Pode-se observar na figura 7, os níveis de NGF encontraram-se elevados em relação aos animais do grupo Pilo ( $530,7 \pm 102,9$  pg/mL) somente no período de 7 dias após o transplante ( $p < 0,05$ ). E mostraram-se significativamente elevados nos grupos tratados com as células em relação ao grupo Controle ( $344,1 \pm 38,29$  pg/mL) nos períodos de 3 ( $629,8 \pm 69,66$  pg/mL;  $p < 0,05$ ), 7 ( $826,4 \pm 12,14$  pg/mL;  $p < 0,01$ ) e 14 dias ( $720,3 \pm 26,93$  pg/mL;  $p < 0,01$ ) após o transplante. Entretanto, não foram observadas diferenças entre os animais dos grupos Controle e Pilo.



**Figura 7 – O tratamento com as CMMO aumenta a expressão de NGF no hipocampo de animais epiléticos.** O gráfico mostra os níveis de NGF expressos em pg/mg de tecido, significativamente elevados no grupo do período de 7 dias após o transplante das CMMO em relação aos grupos controle e pilo (\*  $p < 0,05$  vs Pilo; ##  $p < 0,01$  vs Controle). Os grupos Pilo+CMMO 3D e Pilo+CMMO 14D foram significativos apenas com o grupo Controle (#  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$  vs Controle). Não houve diferença entre os grupos Controle e Pilo. Os dados estão expressos como a média  $\pm$  EP. Teste de Tukey após ANOVA de uma via,  $n=4$  por grupo.

#### 4.2.3 Transplante de CMMO aumenta os níveis hipocampais de GDNF em ratos epiléticos

Os níveis de GDNF encontraram-se significativamente elevados nos grupos tratados com CMMO, nos períodos de 7 ( $219,7 \pm 26,89$  pg/mL) e 14 dias ( $214,9 \pm 24,36$  pg/mL) após o transplante em relação aos grupos Pilo ( $103,2 \pm 15,5$  pg/mL;  $p < 0,05$ ) e Controle ( $65,41 \pm 6,86$  pg/mL;  $p < 0,01$ ). Por outro lado, não foram observadas diferenças nos níveis hipocampais de GDNF entre os grupos Controle e Pilo, como mostra a figura 8.

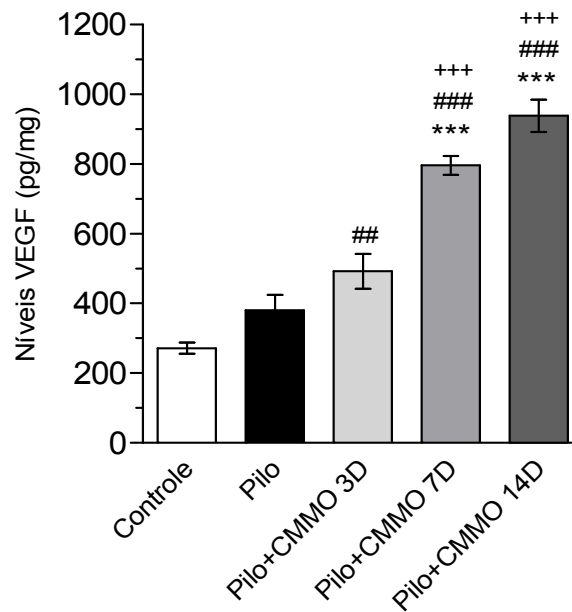


**Figura 8 – O tratamento com as CMMO aumenta a expressão de GDNF no hipocampo de animais epiléticos.** O gráfico mostra os níveis de GDNF expressos em pg/mg de tecido, significativamente elevados nos grupos Pilo+CMMO 7D e Pilo+CMMO 14D em relação aos grupos Controle e Pilo (\*  $p < 0,05$  vs Pilo; ##  $p < 0,01$  vs Controle). Não houve diferença entre os animais do grupo Pilo e Controle. Os dados estão expressos como a média  $\pm$  EP. Teste de Tukey após ANOVA de uma via,  $n=4$  por grupo.

#### 4.2.4 Transplante de CMMO aumenta os níveis hipocampais de VEGF em ratos epiléticos

Foi observado no hipocampo dos animais o aumento significativo da expressão de VEGF em todos os grupos tratados com as CMMO, em relação ao grupo Pilo ( $380,3 \pm 44,33$  pg/mL), como podemos observar na figura 9. Essa elevação dos níveis de VEGF mostrou-se gradual de acordo com a ordem crescente dos tempos avaliados, onde se observou maior aumento da expressão no período de 7 ( $796,7 \pm 27,24$  pg/mL;  $p < 0,001$ ) e 14 dias ( $938,7 \pm 45,73$  pg/mL;  $p < 0,001$ ) após o transplante das células. Houve diferença significativa também entre os próprios grupos transplantados com as CMMO: os grupos avaliados 7 e 14 dias após o transplante apresentaram maiores níveis de expressão do VEGF em relação ao período de 3 dias pós-transplante ( $492,5 \pm 50,13$  pg/mL;  $p < 0,001$ ). Todos os grupos tratados com as CMMO apresentaram aumento dos níveis de VEGF em relação ao grupo Controle

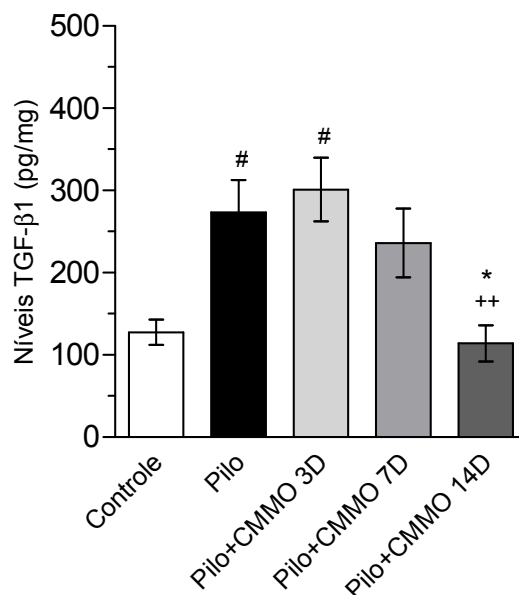
( $271,7 \pm 16,65$  pg/mL;  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$  para 3, 7 e 14 dias, respectivamente). E não houve diferença entre os animais epiléticos não tratados do grupo Pilo e animais do grupo Controle.



**Figura 9 – O tratamento com as CMMO aumenta a expressão de VEGF no hipocampo de animais epiléticos.** O gráfico mostra os níveis de VEGF expressos em pg/mg de tecido, significativamente elevados nos grupos tratados com as CMMO em relação ao Pilo, com uma elevação gradual dos níveis entre os tempos avaliados 3, 7 e 14 dias pós-transplante das células, porém somente os grupos Pilo+CMMO 7D e Pilo+CMMO 14D apresentaram aumento significativo em relação ao grupo Pilo (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  vs Pilo). Todos os grupos tratados com as CMMO apresentaram diferença significativa em relação ao grupo Controle (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  vs Controle). Também houve diferença entre os grupos tratados, onde os grupos Pilo+CMMO 7D e Pilo+CMMO 14D mostraram-se significativamente mais elevados que o grupo Pilo+CMMO 3D (\*\*\*  $p < 0,001$  vs Pilo+CMMO 3D). Não houve diferença entre os grupos Controle e Pilo. Os dados estão expressos como a média  $\pm$  EP. Teste de Tukey após ANOVA de uma via,  $n=4$  por grupo.

#### 4.2.5 Transplante de CMMO diminui os níveis hipocampais de TGF- $\beta$ 1 em ratos epilépticos

A expressão de TGF- $\beta$ 1 no hipocampo dos animais epilépticos tratados com as CMMO apresentou níveis significativamente reduzidos apenas no período após 14 dias do transplante ( $113,8 \pm 22,2$  pg/mL;  $p < 0,05$ ) em relação ao grupo Pilo ( $273,3 \pm 39,57$  pg/mL). O nível de expressão deste fator se encontrou maior no grupo Pilo e no grupo tratado com as CMMO avaliado 3 dias após o transplante ( $301 \pm 38,61$  pg/mL), em relação ao animais do grupo Controle ( $127,4 \pm 15,21$  pg/mL;  $p < 0,05$ ). Porém, nos grupos tratados com as CMMO observou-se uma diminuição gradual desde o período inicial de 3 dias até o período máximo de avaliação de 14 dias após o transplante ( $113,8 \pm 22,2$  pg/mL), havendo diferença significativa entre os grupos tratados, como mostra a figura 10.



**Figura 10 – O tratamento com as CMMO diminui a expressão de TGF- $\beta$ 1 no hipocampo de animais epilépticos.** O gráfico mostra os níveis de TGF- $\beta$ 1 expressos em pg/mg de tecido, significativamente reduzidos no grupo Pilo+CMMO 14D em relação ao grupo Pilo (\*  $p < 0,05$  vs Pilo). O grupo Pilo e o Pilo+CMMO 3D apresentaram maior expressão de TGF- $\beta$ 1 em relação ao grupo Controle (#  $p < 0,05$ ). Também houve uma diferença significativa entre os grupos Pilo+CMMO 3D e Pilo+CMMO 14D, onde no período de 14 dias se observou uma redução significativa dos níveis de TGF- $\beta$ 1 em relação ao período de 3 dias pós-transplante das CMMO (++  $p < 0,01$  vs Pilo+CMMO 3D). Os dados estão expressos como a média  $\pm$  EP. Teste de Tukey após ANOVA de uma via,  $n=4$  por grupo.



## 5 DISCUSSÃO

O objetivo principal desse estudo foi verificar se as CMMO transplantadas sistemicamente em ratos epilépticos crônicos eram capazes de modular a expressão de fatores tróficos, como BDNF, GDNF, NGF, TGF- $\beta$  e VEGF. Os nossos resultados indicaram que as células injetadas modularam a expressão desses fatores, seja aumentando ou diminuindo os níveis de expressão no hipocampo de ratos epilépticos, avaliados em 3, 7 e 14 dias após o transplante.

Nosso grupo de pesquisa tem obtido resultados promissores no uso de terapia celular para o tratamento da epilepsia do lobo temporal. Os dados indicam que as células-tronco apresentam propriedades neuroprotetoras, levando a melhores desfechos funcionais em animais com epilepsia induzida por pilocarpina, como a prevenção ou redução de crises e melhora nos déficits cognitivos (Costa-Ferro et al. 2012; Costa-Ferro et al. 2010; Venturin et al. 2011). No entanto, os mecanismos de ação responsáveis por esses efeitos ainda não foram completamente esclarecidos. Embora, inúmeros estudos tenham demonstrado que as células-tronco da medula óssea transplantadas expressam marcadores neurais e microgliais no SNC (Brazelton et al. 2000; Cogle et al. 2004; Eglitis et al. 1999; Mezey et al. 2000), é pouco provável que este mecanismo seja o único responsável pelos efeitos terapêuticos após o transplante dessas células em animais com epilepsia. Em concordância a outros estudos, foi demonstrado que a recuperação funcional nos animais tratados tem ocorrido independente da presença significativa de células-tronco com expressão de marcadores neuronais nas áreas epileptiformes (Costa-Ferro et al. 2012; Venturin et al. 2011). Assim, os desfechos observados podem estar relacionados a uma modulação da resposta inflamatória (Costa-Ferro et al. 2012), ou, ainda, a uma alteração nos níveis de expressão de fatores tróficos, como demonstrado no presente estudo.

Atualmente, vários estudos mostram que transplantes de diferentes tipos de células-tronco podem fornecer ao cérebro uma série de fatores tróficos,

gerando efeitos benéficos em modelos experimentais de diversas lesões e/ou doenças do sistema nervoso. Em modelos de hipóxia-isquemia (HI) foi demonstrado que o transplante de células do cordão umbilical humano (HUCB) aumenta os níveis de fatores tróficos como BDNF, GDNF, NGF e VEGF, e promove melhoras funcionais (Borlongan et al. 2004; Rosenkranz et al. 2012; Yasuhara et al. 2009). A liberação de fatores neurotróficos mediada pelas células transplantadas pode reduzir o número de neurônios que sofrem apoptose, resultando em preservação neuronal (Rosenkranz et al. 2012). Também em modelos de HI, células-tronco mesenquimais (CTM) induzem a expressão de NGF, BDNF e EFNB1 (van Velthoven et al. 2012).

Na isquemia, estudos demonstraram o aumento da expressão de fatores tróficos após infusão de CTMs, *in vitro* e *in vivo*, como BDNF, NGF, VEGF, HGF, e junto com este aumento diversos benefícios foram observados, como a recuperação do comportamento dos animais, bem como da lesão, e também um aumento da neurogênese (Bao et al. 2011; Chen et al. 2002). Além disso, em modelos de lesão medular após transplante de células-tronco da medula óssea (CTMO) ocorre a modulação da expressão de diversos fatores tróficos como, NGF, LIF, TGF- $\beta$ , IGF-1, PDGF-A, GDNF, bFGF, CTNF e EGF, sugerindo que esses fatores possam contribuir para os benefícios observados (Hawryluk et al. 2012).

Em conjunto, esses estudos indicam que um dos mecanismos de ação dessas células seja a modulação da expressão de fatores tróficos. É possível que estes fatores, em conjunto com outros efeitos parácrinos, como a modulação da inflamação, possam estar atuando no órgão alvo e proporcionando uma série de benefícios em diferentes doenças neurológicas.

Por outro lado, em estudo recente, demonstrou-se que a permeabilidade da BHE induzida por manitol é necessária para que os fatores tróficos derivados do transplante exerçam sua função (Borlongan et al. 2004; Yasuhara et al. 2009). Nesse estudo, a abertura espontânea produzida pela oclusão da artéria cerebral média não foi suficiente para permitir a entrada dos fatores tróficos derivados das células transplantadas no SNC. No entanto, como nosso estudo é em epilepsia crônica, acreditamos que a BHE não seja um

impedimento para a passagem dessas moléculas, visto que ela abre durante as crises (Costa 1972), que por sua vez são frequentes no modelo que utilizamos.

Os fatores tróficos parecem desempenhar papéis importantes em condições fisiopatológicas, como nas crises epiléticas (Jankowsky and Patterson 2001). Uma variedade de fatores neurotróficos têm efeitos potentes na sobrevivência neuronal, diferenciação celular, síntese de neurotransmissores, plasticidade sináptica e excitabilidade (Weisenhorn et al. 1999). No entanto, os efeitos epileptogênicos ou anti-epiléticos de vários fatores neurotróficos após as crises, ainda não estão bem estabelecidos. Embora alguns estudos sugiram que o aumento da expressão de muitos fatores neurotróficos após as crises ou outras lesões cerebrais contribui para a neuroproteção do cérebro, outros estudos sugerem que o aumento de alguns dos fatores neurotróficos acarreta em maiores danos cerebrais (Simonato et al. 2006a).

Neste estudo os níveis de BDNF apresentaram uma elevação significativa nos hipocampos dos animais epiléticos após o transplante das CMMO, enquanto nos animais epiléticos não tratados não houve aumento em relação aos animais controle. A interação entre BDNF e o receptor TrkB parece ser neuroprotetora após inúmeras formas de lesão cerebral (Beck et al. 1994; Bullock et al. 1999). Na isquemia cerebral, o papel do BDNF está bem elucidado como um fator de grande potencial terapêutico. Ele reduz a lesão cerebral (Schabitz et al. 1997) impede a apoptose, (Kubo et al. 1995) e aumenta a expressão de marcadores de brotamento axonal e sinaptogênese (Kawamata et al. 1997), modulando a neurogênese e levando a melhoras funcionais (Schabitz et al. 2007).

No entanto, o papel do BDNF na epilepsia ainda é controverso. Há relatos de que a infusão crônica de BDNF no hipocampo tanto atrasa (Reibel et al. 2000) quanto acelera (Scharfman et al. 2002) a epileptogênese. Sabe-se que os processos epileptogênicos, assim como outros estímulos, podem aumentar a síntese da proteína e mRNA de BDNF e receptores TrkB, principalmente no hipocampo, levando a efeitos sobre a estrutura e a função sináptica e, finalmente, a hiperexcitabilidade (Binder et al. 2001). A expressão

de BDNF é aumentada após crises em diversos modelos de epilepsia, abrasamento, ácido caínico (Kato-Semba et al. 1999), pilocarpina (Schmidt-Kastner et al. 1996). Porém, em outros estudos o BDNF apresentou alta regulação durante a fase aguda da epilepsia, mas baixa regulação sob condições epiléticas crônicas (Hattiangady et al. 2004; Shetty et al. 2003). Assim como, no presente estudo, em que avaliamos a expressão dos fatores no período crônico da doença, não foi encontrado aumento da expressão de BDNF nos animais epiléticos não tratados. De fato a infusão de agentes para inibir a atividade do BDNF (Binder et al. 1999) ou a utilização de animais knockout para BDNF e receptor TrkB (Binder et al. 2001; Kokaia et al. 1995; Lahtinen et al. 2002) mostraram inibir a epileptogênese. Já foi mostrado que o BDNF potencializa sinais excitatórios (Kang and Schuman 1995; Lohof et al. 1993), e reduz a transmissão sináptica inibitória (Tanaka et al. 1997).

Porém, o BDNF também tem sido visto como um alvo terapêutico para o tratamento da ELT (Koyama and Ikegaya 2005; Simonato et al. 2006a). Estudos relatam que com o aumento dos níveis desse fator durante a epilepsia ou ainda a infusão de BDNF em animais epiléticos, aumenta a neurogênese, reduz a perda neuronal, e diminui a ocorrência de crises espontâneas (Bovolenta et al. 2010), e também previne o desenvolvimento de SE (Paradiso et al. 2009). Além disso, o BDNF ajuda a sobrevivência e a regeneração de neurônios após SE (Simonato 2006b). O BDNF também foi mostrado a participar da inibição da apoptose e inflamação (Almeida et al. 2005; Makar et al. 2008). Estudos evidenciam que esta baixa regulação provavelmente reflete em um mecanismo adaptativo para minimizar crises que se originam a partir do hipocampo, pois o circuito está reorganizado, e ficaria propenso a gerar crises e provavelmente contribuir para a hiperexcitabilidade neuronal (Tauck and Nadler 1985). De acordo com estudos anteriores, os animais apresentam melhoras significativas após o transplante de CMMO, em relação à ocorrência de crises e déficits cognitivos (Costa-Ferro et al. 2010; Venturin et al. 2011). O aumento de BDNF após o transplante pode estar contribuindo para esses benefícios descritos pelo nosso grupo, aumentando a neurogênese, reduzindo a morte neuronal, deste modo diminuindo a hiperexcitabilidade neuronal, contribuindo com a redução da frequência das crises e também, com um melhor desempenho cognitivo de animais epiléticos. Com isso, sugerimos que

o aumento da expressão de BDNF após o transplante das CMMO não esteja prejudicando os animais epiléticos, e sim esteja relacionado com efeitos benéficos vistos anteriormente na epilepsia crônica.

Encontramos níveis elevados de GDNF nos animais transplantados com as CMMO 7 e 14 dias após o transplante, e não houve aumento da expressão nos animais epiléticos não tratados. O GDNF é um fator de sobrevivência para vários tipos de neurônios (Lin et al. 1993; Tolbert et al. 2001; Zurn et al. 1994). Na epilepsia, o GDNF parece estar relacionado com uma potente ação terapêutica. O aumento da proteína GDNF pode promover a sobrevivência celular e a supressão das crises em diversos modelos de epilepsia (Duveau and Fritschy 2010; Martin et al. 1995; Mikuni et al. 1999; Yoo et al. 2006). Estudos anteriores sugeriram que o GDNF tem propriedades anticonvulsivantes, reduz a frequência e duração de crises generalizadas induzidas por abrasamento e também suprime crises límbicas. (Kanter-Schlifke et al. 2009; Kanter-Schlifke et al. 2007; Li et al. 2002). Foi mostrado que a supressão das crises depois do transplante de MGE-NSC estaria relacionada com a adição de novas células que sintetizavam GDNF, assim como a restauração da expressão de GDNF em astrócitos no hipocampo (Waldau et al. 2010). Além disso, Li e colegas demonstraram que a administração intraventricular de GDNF preveniu a inflamação induzida pelo aumento da área hilar e brotamento de fibras musgosas, no hipocampo de ratos (Li et al. 2002). Porém, também já foi evidenciado alguns contras da participação de GDNF na epilepsia. Nanobashvili e colaboradores, mostraram que camundongos knockout para o receptor GFR- $\alpha$ 1 apresentaram supressão do desenvolvimento de crises induzidas por abrasamento (Nanobashvili et al. 2000). No entanto, juntos estes resultados sugerem que o GDNF é um agente neuroprotetor contra a epilepsia. Diferente dos estudos com epilepsia aguda, no presente estudo não foi visto aumento da expressão deste fator nos animais cronicamente epiléticos. Somente após o transplante das CMMO ocorreu o aumento da expressão de GDNF nos hipocampos dos animais epiléticos. Em concordância com as evidências na literatura, o aumento de GDNF após o transplante pode estar proporcionando alguns efeitos contra o progresso da atividade epilética no período crônico da epilepsia, como prevenindo a

inflamação, podendo promover a redução da frequência das crises como demonstrado pelo nosso grupo anteriormente (Costa-Ferro et al. 2012).

Os resultados sobre a expressão de NGF demonstram que os níveis estão elevados nos animais 7 dias após o transplante das CMMO. O NGF desempenha um papel importante na diferenciação, sobrevivência, reparação e plasticidade de neurônios (Hefti et al. 1993; Sofroniew et al. 2001). As evidências sugerem que a interação entre o NGF e o receptor TrkA é neuroprotetora em várias formas de lesões cerebrais (Sofroniew et al. 2001; Zhang et al. 2005). O NGF é conhecido por ter papel importante na remodelagem de redes cerebrais após crises (Holtzman and Lowenstein 1995). Foi mostrado que as crises podem regular o aumento da expressão de NGF e os efeitos são considerados pró-epileptogênicos. O aumento dos níveis de NGF foi observado no hipocampo, pouco depois de uma lesão ou de crises (Gall et al. 1991; Lauterborn et al. 1994; Shetty et al. 2003). Crises induzidas por eletrochoque e abrasamento aumentaram a regulação de NGF, especialmente no hipocampo de ratos (Angelucci et al. 2002; Bengzon et al. 1993; Conti et al. 2009; Morimoto et al. 1998). Ao contrário destes estudos, nós utilizamos o modelo de pilocarpina e avaliamos a expressão dos fatores durante o período crônico, onde não encontramos alterações nos níveis de NGF no hipocampo de animais epiléticos sem tratamento. Infusões de anticorpos anti-NGF retardam o desenvolvimento de inflamação, bloqueiam o brotamento de fibras musgosas e atrasam o surgimento de crises (Van der Zee et al. 1995). Do mesmo modo, a infusão intraventricular de NGF acelera o desenvolvimento de crises e aumenta o brotamento de fibras musgosas (Adams et al. 1997). Realmente, os estudos indicam que o NGF parece estar sendo modulado e piorando a epileptogênese em diversos modelos. Porém, neste estudo não ocorreu o aumento da expressão de NGF nos animais epiléticos não tratados. Os estudos que relatam esses efeitos prejudiciais e elevação da expressão de NGF foram conduzidos durante o período agudo da epilepsia. No período crônico, como visto neste estudo, a expressão de NGF nos animais epiléticos não tratados se encontra em níveis similares aos animais controle, ao passo que, somente nos animais transplantados com CMMO ocorre um aumento dos níveis. Sugerindo que o aumento deste fator na epilepsia não seja prejudicial,

pois como já foi mostrado anteriormente houve melhoras evidentes dos animais epiléticos após o transplante das CMMO.

A expressão do VEGF apresentou um aumento gradual a partir do 3<sup>o</sup> até o 14<sup>o</sup> dia após o transplante de CMMO. O VEGF tem sido implicado como um sinal químico importante para o crescimento de novos vasos e para a permeabilidade vascular, além de regular a neurogênese, inflamação e a permeabilidade da barreira hemato-encefálica (Carmeliet and Storkebaum 2002; Rosenstein and Krum 2004; Sun et al. 2003; Yancopoulos et al. 2000). A aplicação de VEGF na superfície do cérebro após isquemia reduz o tamanho do infarto e da apoptose (Hayashi et al. 1998). O tratamento com VEGF em ratos após AVC reduziu déficits funcionais (Zhang et al. 2000). Na epilepsia, também há relatos sobre o papel fisiopatológico da via de sinalização de VEGF (Croll et al. 2004). A expressão do VEGF é regulada em células neuronais e gliais após crises epiléticas no hipocampo de ratos, sugerindo um papel neuroprotetor para o VEGF na epilepsia (Newton et al. 2003; Nicoletti et al. 2008; Warner-Schmidt and Duman 2007; Warner-Schmidt et al. 2008). Além disso, a alta regulação de VEGF no hipocampo foi mostrada em casos de epilepsia em humanos (Boer et al. 2008; Rigau et al. 2007). Nicoletti e colegas mostraram que o VEGF foi altamente regulado no hipocampo e outras regiões cerebrais 24 h após crises induzidas por pilocarpina. Além disso, quando utilizado um bloqueador de VEGF, aumentou a morte neuronal, ao passo que, a infusão exógena protegeu contra a morte neuronal (Nicoletti et al. 2008). Diferente de outros autores, que realizaram os estudos na fase aguda da epilepsia e observaram um aumento da expressão de VEGF, o presente estudo, no entanto, foi feito durante a fase crônica da epilepsia, e não foi encontrado aumento da expressão de VEGF nos animais epiléticos não tratados.

O VEGF tem mostrado atuar através de seu receptor VEGFR2 (Jin et al. 2001; Matsuzaki et al. 2001; Sun and Guo 2005) após o SE, promovendo a neuroproteção através de efeitos na excitabilidade neuronal (Kim et al. 2008; Ma et al. 2009). Também já foi mostrado que o VEGF diminui a atividade sináptica e excitabilidade neuronal (McCloskey et al. 2005), o que pode contribuir para preservar alguns comportamentos, como a ansiedade,

aprendizagem e memória (Nicoletti et al. 2010). Ainda, Cammalleri e colegas indicam que o VEGF controla a atividade epiléptica, influenciando tanto a transmissão glutamatérgica quanto a GABAérgica (Cammalleri et al. 2011). Enfim, parece que o aumento dos níveis de VEGF em condições epiléticas é importante para reduzir as crises espontâneas. O VEGF parece apresentar efeitos neurotróficos diretos que podem inferir em uma neuroproteção independente da angiogênese (Sondell et al. 1999). Apesar de, alguns estudos mostrarem efeitos pró-epileptogênicos, como o aumento da permeabilidade da BHE e da inflamação (Proescholdt et al. 1999; Yancopoulos et al. 2000), a maior parte dos dados descritos na literatura evidenciam que o VEGF possa atuar na epilepsia como um fator benéfico. Dessa forma, o aumento dos níveis de VEGF observado após o transplante neste estudo poderia ser associado a um aumento da angiogênese e neurogênese, resultando em um efeito de neuroproteção, como proteger os neurônios da excitotoxicidade. Isto poderia contribuir para a diminuição da frequência de crises e melhores desfechos comportamentais, como em relação à memória e aprendizagem e explicar o efeito anticonvulsivante do transplante de CMMO observado por estudos recentes (Costa-Ferro et al. 2012; Costa-Ferro et al. 2010; Venturin et al. 2011).

Nossos resultados demonstram também uma redução gradual da expressão de TGF- $\beta$ 1 nos hipocampos dos animais transplantados com as CMMO e um aumento da expressão nos animais epiléticos não tratados em relação aos animais controle. O TGF- $\beta$ 1 está envolvido com uma grande variedade de funções celulares, incluindo a proliferação celular, diferenciação, migração e apoptose, tendo um papel neuroprotetor contra a morte celular em condições fisiológicas e patológicas (Li et al. 2006; Prehn et al. 1994). O TGF- $\beta$  está listado como uma substância endógena potente para proteger contra doenças neurodegenerativas do SNC (Flanders et al. 1998). Muitos estudos consideram que o TGF- $\beta$ 1 seja uma citocina protetora (Brionne et al. 2003; McNeill et al. 1994; Prehn et al. 1993; Zhu et al. 2002).

A expressão de TGF- $\beta$  é regulada em muitas condições fisiopatológicas de várias doenças, como isquemia, esclerose múltipla, AVC, doença de Alzheimer e epilepsia (Plata-Salaman et al. 2000; Szelenyi 2001; Vitkovic et al. 2001; Zhu et al. 2000). Mas também tem sido encontrado provocando efeitos



prejudiciais, como aumento da excitotoxicidade (Mesples et al. 2005; Prehn et al. 1994), evidenciando que o efeito deste fator não tem sido benéfico na epilepsia. O envolvimento do TGF- $\beta$ 1 na epileptogênese têm sido demonstrado em animais que mostram alta regulação de TGF- $\beta$ 1 em neurônios e astrócitos após crises (Aronica et al. 2000; Plata-Salaman et al. 2000). Assim como, no presente estudo, onde a expressão de TGF- $\beta$ 1 se encontrou elevada nos hipocampos dos animais epiléticos não tratados. Estudos recentes demonstraram que a ativação da via de sinalização do TGF- $\beta$ , é suficiente para induzir atividade epileptiforme, e a aplicação de bloqueadores deste fator suprimiu o desenvolvimento da atividade epileptiforme (Cacheaux et al. 2009; Ivens et al. 2007). Tem sido demonstrado que epilepsias focais apresentam danos à BHE em humanos e ratos (Abbott et al. 2006; Neuwelt 2004; Tomkins et al. 2001). O TGF- $\beta$ 1 pode estar relacionado com a permeabilidade da BHE, a qual acontece com a ocorrência das crises (Ivens et al. 2007). Estudos mostram que o extravasamento de albumina, com a quebra da BHE, ativa os receptores T $\beta$ Rs, ativando a cascata de sinalização do TGF- $\beta$ . E este fator aumenta a absorção de albumina pelos astrócitos e baixa a regulação das correntes de K<sup>+</sup>, gerando um acúmulo anormal de K<sup>+</sup> extracelular, e aumentando a função dos receptores NMDA (Ivens et al. 2007). Ainda, um estudo verificou que a expressão do receptor T $\beta$ R-I aumenta em pacientes com ELT (Lu et al. 2009). Neste contexto, Vitkovic e colaboradores sugerem que o aumento de IL-1 $\beta$  no cérebro, o que ocorre em várias doenças, incluindo a epilepsia, provavelmente regula a expressão do TGF- $\beta$ 1 (Vitkovic et al. 2001). Isto indica que a regulação do TGF- $\beta$ 1 e IL-1 $\beta$  no cérebro não é especificamente uma resposta "anti-inflamatória", mas sim uma resposta fundamental do cérebro para perturbações, sendo semelhante às citocinas pró-inflamatórias (Vitkovic et al. 2000). Em um estudo do nosso grupo, os níveis da IL-1 $\beta$  elevaram-se nos animais epiléticos, e após o transplante das CMMO houve uma redução significativa da expressão desta citocina pró-inflamatória (Costa-Ferro et al. 2012). E no presente estudo, verificamos níveis elevados de TGF- $\beta$ 1 nos animais epiléticos e níveis reduzidos após o transplante das CMMO, sugerindo que ambos, IL-1 $\beta$  e TGF- $\beta$ 1 estariam sendo regulados após transplante das células. A diminuição do TGF- $\beta$ 1 após o transplante nos indica que este fator pode realmente estar envolvido na atividade epilética, como por

exemplo, aumentando a ativação de receptores NMDA, podendo gerar maior excitabilidade neuronal, e assim aumentar a frequência de crises (Ivens et al. 2007). Dessa maneira, a diminuição de seus níveis contribuiria para o controle na frequência de crises observado previamente (Costa-Ferro et al. 2012; Venturin et al. 2011).

Como vimos, alguns fatores tróficos já foram mostrados estar envolvidos com os benefícios observados nos estudos anteriores do nosso grupo após o transplante das CMMO na epilepsia. Alguns destes fatores já foram elucidados por ter um grande potencial terapêutico nesta doença, onde exerceram seus efeitos diminuindo a frequência de crises em diversos modelos de epilepsia (Bovolenta et al. 2010; Cammalleri et al. 2011; Kanter-Schlifke et al. 2007; Paradiso et al. 2009). Alguns podem, também, exercer o seu efeito diminuindo a inflamação. Bovolenta e colegas evidenciaram que a superexpressão de neurotrofinas, como o BDNF, pode modular a resposta inflamatória que se segue no cérebro após o SE induzido pela pilocarpina. E este efeito pode ser a base da redução da frequência de CERs (Bovolenta et al. 2010).

A inflamação na epilepsia já mostrou ser prejudicial ao cérebro, podendo aumentar ainda mais a frequência de crises, entre outros parâmetros (Vezzani and Granata 2005). As células-tronco da medula óssea têm uma ação inibidora sobre a resposta inflamatória, e elas expressam uma variedade de fatores tróficos que podem mostrar seus efeitos de maneira autócrina e/ou parácrina após o transplante (Malgieri et al. 2010; Tse et al. 2003). E o aumento da produção de fatores tróficos no SNC pode suprimir a inflamação (Villoslada and Genain 2004). Assim, os mecanismos de controle que minimizem a extensão da resposta inflamatória são necessários a fim de ajudar a preservar a arquitetura e restaurar a função cerebral.

Também, alguns dos fatores estão envolvidos com processos relacionados à memória. Tem sido demonstrado um aumento dos níveis de mRNA do BDNF após eventos relacionados com a aprendizagem (Castren et al. 1993; Patterson et al. 1992). Foi mostrado que o BDNF é requerido para formação (Alonso et al. 2005) e armazenamento de memória (Bekinschtein et al. 2008), e o bloqueio da função do BDNF com anticorpos anti-BDNF, e animais knockout para BDNF ou receptor TrkB (Alonso et al. 2002; Linnarsson

et al. 1997; Minichiello et al. 1999), parece prejudicar a aprendizagem espacial dos animais, e tanto a aquisição quanto a manutenção da memória espacial são prejudicadas quando os níveis de BDNF foram reduzidos (Mizuno et al. 2000). O VEGF também mostrou capacidade de proteger significativamente a ansiedade, aprendizagem e memória após SE (Nicoletti et al. 2010). Assim como, o aumento do mRNA de NGF tem sido demonstrado durante os processos que acompanham a consolidação da memória (Woolf et al. 2001), e pode melhorar a memória espacial dos animais (Dixon et al. 1997).

Um dos mecanismos de atuação propostos para as células-tronco é o estímulo da proliferação e diferenciação de nichos de células-tronco já presentes no tecido através de secreção/elevação de fatores tróficos. O envolvimento destes fatores com a neurogênese já foi demonstrado (Hagihara et al. 2005). Podemos hipotetizar que no caso de neurogênese induzida pelas CMMO, ela seria capaz de repor populações hipocampais, favorecendo, por exemplo, a recuperação da memória espacial dos animais, prejudicada pela epilepsia. A expressão de fatores tróficos podem contribuir para a neurogênese no hipocampo e reparação tecidual (Bovolenta et al. 2010; Chen et al. 2005; Jin et al. 2002; Kobayashi et al. 2006; Oliveira et al. 2012). Consistente com esta ideia, o aumento da neurogênese observado na epilepsia aguda é associado com uma alta regulação destes fatores. No entanto, como mostramos neste estudo e em concordância com outros, na epilepsia crônica alguns destes fatores apresentam uma concentração reduzida no hipocampo, quando comparado com o período agudo da doença (Hattiangady et al. 2004; Shetty et al. 2003). Assim, os níveis mais baixos destes fatores podem estar envolvidos tanto com a redução da neurogênese como com o aumento da frequência de CERs, ambos processos característicos da epilepsia crônica.

Muitos estudos mostram um aumento da expressão de fatores tróficos em animais epiléticos, mas a maioria destes estudos é referente ao período agudo da doença. Durante este período os níveis de fatores tróficos e de uma série de outras citocinas estão sendo modulados, devido à grande mudança no equilíbrio do sistema, modificando o comportamento neuronal nessa situação fisiopatológica (Jankowsky and Patterson 2001). A maioria dos estudos que

avaliam a expressão de fatores tróficos no período agudo da epilepsia busca identificar os fatores neurotróficos que são potencialmente úteis como agentes neuroprotetores e anticonvulsivantes após o SE para prevenir o desenvolvimento da epilepsia crônica. No entanto, este trabalho foi realizado com animais cronicamente epiléticos, avaliados 36 dias após a indução do SE. E percebemos que durante o período crônico da epilepsia os níveis destes fatores já não se encontram mais alterados, não sendo significativamente diferentes do grupo de animais controle. A expressão dos fatores apenas se altera após o transplante das CMMO, evidenciando que seu efeito possa estar sendo mediado através da modulação da expressão destes fatores.

As células residentes no seu ambiente cerebral são capazes de produzirem fatores tróficos, e isso pode ser um fator chave na determinação da resposta das CMMO. Uma vez que os kits de ELISA utilizados para a análise reconhecia proteínas tanto de rato quanto de camundongo, não é claro se a expressão destes cinco fatores ocorreu, realmente, a partir das CMMO, ou se as CMMO induziram células endógenas dos ratos a expressarem esses fatores. O transplante poderia estimular células a produzirem e secretarem maior quantidade de fatores tróficos. Esta é a hipótese mais provável para explicar o aumento da expressão dos fatores, o qual a maioria ocorreu a partir de 7 dias após o transplante. Se as CMMO secretassem diretamente os fatores tróficos, a alteração dos níveis detectados dos fatores provavelmente teria ocorrido antes.

O aumento da expressão de fatores tróficos já foi demonstrado por vários estudos que utilizaram tratamento com células-tronco em modelos experimentais de diversas doenças, e muitos destes estudos observaram melhoras funcionais nos animais após o transplante dessas células, e alguns acabaram associando os benefícios observados com o aumento da expressão desses fatores (Bao et al. 2011; Pastor et al. 2012; Rosenkranz et al. 2012). Os resultados anteriores do nosso grupo, sugerimos que as melhoras neurológicas, como redução das crises e do déficit cognitivo, após o transplante das CMMO pode ter sido, provavelmente, devido à liberação de

fatores tróficos. Estes efeitos podem contribuir para um ambiente de regeneração, permitindo neuroplasticidade e regeneração funcional.

Os trabalhos anteriores do nosso grupo mostraram que a frequência e a duração das crises foram reduzidas independente do período que foi feito o transplante, durante a fase inicial ou após um período prolongado de CERs (Costa-Ferro et al. 2012; Venturin et al. 2011). Em conjunto, também já foi mostrado que as CMMO preservaram neurônios, reduziram gliose reativa e induziram a proliferação de novos neurônios no hipocampo (Costa-Ferro et al. 2012). Esses resultados positivos, possivelmente podem ser devido a modulação da resposta inflamatória (Costa-Ferro et al. 2012) bem como, a modulação da expressão de fatores tróficos.

É de suma importância estabelecer os mecanismos das CMMO na epilepsia, pois essas células podem ser facilmente obtidas a partir de um pequeno volume de medula óssea do próprio paciente, sem necessidade de serem expandidas em culturas, evitando maiores manipulações. Portanto, as CMMO fornecem uma fonte facilmente acessível de células para a realização de transplantes autólogos. Estas células podem proporcionar uma fonte contínua de fatores tróficos essenciais para a reparação e plasticidade do cérebro epilético. No entanto, à medida que essas terapias celulares tornam-se mais prevalente em diferentes procedimentos clínicos, os seus perfis de secreção devem ser cuidadosamente investigados em termos do real papel desses fatores secretados na regeneração de tecidos e em efeitos secundários possíveis. Por isso, é necessário estudos mais detalhados sobre os mecanismos dessas células na epilepsia, para que possamos otimizar os benefícios clínicos da terapia celular, assim como, determinar estratégias clínicas seguras e efetivas.

## 6 CONCLUSÃO

Neste trabalho investigamos a modulação hipocampal dos fatores tróficos BDNF, GDNF, NGF, TGF- $\beta$ 1 e VEGF após o transplante de células mononucleares da medula óssea em ratos com epilepsia crônica.

Nosso estudo possibilitou as seguintes conclusões:

1. Houve alteração da expressão proteica de BDNF, GDNF, NGF, TGF- $\beta$  e VEGF nos hipocampos dos animais epiléticos tratados com as CMMO em relação aos animais epiléticos não tratados e controle, havendo variações da expressão de cada fator em diferentes tempos após o transplante.
2. A expressão dos fatores BDNF, GDNF, NGF e VEGF mostrou-se elevada e do TGF- $\beta$ 1 reduzida após o transplante das CMMO em relação aos animais epiléticos não tratados.
3. Não houve diferença na expressão destes fatores nos animais epiléticos não tratados em relação aos animais controle, exceto o TGF- $\beta$ 1, o qual se mostrou elevado no grupo de animais epiléticos não tratados em relação aos animais controle.

## 7 PERSPECTIVAS

Mantendo esta mesma linha de pesquisa, fundamentalmente, pretendemos aprofundar nossos achados sobre os mecanismos de ação das células-tronco da medula óssea em relação à influência da modulação da expressão de fatores tróficos na epilepsia experimental. Para tanto, planejamos:

- 1) Dosar os níveis da expressão de mRNA dos fatores avaliados nos hipocampo dos animais epiléticos tratados com as CMMO.
- 2) Transplantar ratos adultos com epilepsia crônica com CMMO e, realizar a dosagem dos níveis plasmático dos fatores. Assim, saberemos se a modulação da expressão dos fatores tróficos após o transplante é sistêmica.
- 3) Inibir a expressão endógena e/ou exógena dos fatores com a utilização de anticorpos específicos, afim de investigar se a modulação da expressão dos fatores após o transplante é mediada pelas próprias CMMO ou por indução da secreção a partir de células endógenas dos animais.
- 4) Avaliar as repercussões da modulação dos fatores tróficos após o transplante das CMMO sobre a neurogênese, angiogênese e brotamento sináptico no cérebro dos animais, a partir da técnica de imunofluorescência.
- 5) Investigar a expressão de receptores específicos para os fatores tróficos em estudo e a ativação de suas vias de sinalização nos processos avaliados, através de técnicas de biologia molecular ELISA, Western Blot e RT-PCR, e também por imunofluorescência.
- 6) Realizar o rastreamento das CMMO nos animais por meio da técnica de MicroPET/CT, para monitorar a migração das células transplantadas.

## REFERÊNCIAS

- Abbott NJ, Ronnback L, et al. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. **Nat Rev Neurosci**. 2006 Jan;7(1):41-53.
- Abdanipour A, Tiraihi T, et al. Improvement of the pilocarpine epilepsy model in rat using bone marrow stromal cell therapy. **Neurol Res**. 2011 Jul;33(6):625-32.
- Acheson A, Conover JC, et al. A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. **Nature**. 1995 Mar 30;374(6521):450-3.
- Adams B, Sazgar M, et al. Nerve growth factor accelerates seizure development, enhances mossy fiber sprouting, and attenuates seizure-induced decreases in neuronal density in the kindling model of epilepsy. **J Neurosci**. 1997 Jul 15;17(14):5288-96.
- Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. **Nat Rev Neurosci**. 2002 May;3(5):383-94.
- Almeida RD, Manadas BJ, et al. Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways. **Cell Death Differ**. 2005 Oct;12(10):1329-43.
- Alonso M, Bekinschtein P, et al. Endogenous BDNF is required for long-term memory formation in the rat parietal cortex. **Learn Mem**. 2005 Sep-Oct;12(5):504-10.
- Alonso M, Vianna MR, et al. BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. **Hippocampus**. 2002;12(4):551-60.
- Angelucci F, Aloe L, et al. Electroconvulsive stimuli alter the regional concentrations of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and glial cell line-derived neurotrophic factor in adult rat brain. **J ECT**. 2002 Sep;18(3):138-43.
- Arenas E. GDNF, a multispecific neurotrophic factor with potential therapeutic applications in neurodegenerative disorders. **Mol Psychiatry**. 1996 Jul;1(3):179-82.
- Aronica E, van Vliet EA, et al. Upregulation of metabotropic glutamate receptor subtype mGluR3 and mGluR5 in reactive astrocytes in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy. **Eur J Neurosci**. 2000 Jul;12(7):2333-44.
- Bando SY, Alegro MC, et al. Hippocampal CA3 transcriptome signature correlates with initial precipitating injury in refractory mesial temporal lobe epilepsy. **PLoS One**. 2011;6(10):e26268.
- Bao X, Wei J, et al. Transplantation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes behavioral recovery and endogenous neurogenesis after cerebral ischemia in rats. **Brain Res**. 2011 Jan 7;1367:103-13.
- Baraban SC, Southwell DG, et al. Reduction of seizures by transplantation of cortical GABAergic interneuron precursors into Kv1.1 mutant mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2009 Sep 8;106(36):15472-7.



- Barnabe-Heider F, Miller FD. Endogenously produced neurotrophins regulate survival and differentiation of cortical progenitors via distinct signaling pathways. **J Neurosci**. 2003 Jun 15;23(12):5149-60.
- Beck T, Lindholm D, et al. Brain-derived neurotrophic factor protects against ischemic cell damage in rat hippocampus. **J Cereb Blood Flow Metab**. 1994 Jul;14(4):689-92.
- Bekinschtein P, Cammarota M, et al. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2008 Feb 19;105(7):2711-6.
- Bengzon J, Kokaia Z, et al. Regulation of neurotrophin and trkA, trkB and trkC tyrosine kinase receptor messenger RNA expression in kindling. **Neuroscience**. 1993 Mar;53(2):433-46.
- Binder DK, Croll SD, et al. BDNF and epilepsy: too much of a good thing? **Trends Neurosci**. 2001 Jan;24(1):47-53.
- Binder DK, Routbort MJ, et al. Immunohistochemical evidence of seizure-induced activation of trk receptors in the mossy fiber pathway of adult rat hippocampus. **J Neurosci**. 1999 Jun 1;19(11):4616-26.
- Blobe GC, Schiemann WP, et al. Role of transforming growth factor beta in human disease. **N Engl J Med**. 2000 May 4;342(18):1350-8.
- Blumcke I, Beck H, et al. Molecular neuropathology of human mesial temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Res**. 1999 Sep;36(2-3):205-23.
- Blumcke I, Beck H, et al. Altered distribution of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptor subunit GluR2(4) and the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NMDAR1 in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. **Acta Neuropathol**. 1996 Dec;92(6):576-87.
- Blumcke I, Thom M, et al. Ammon's horn sclerosis: a maldevelopmental disorder associated with temporal lobe epilepsy. **Brain Pathol**. 2002 Apr;12(2):199-211.
- Boer K, Troost D, et al. Cellular distribution of vascular endothelial growth factor A (VEGFA) and B (VEGFB) and VEGF receptors 1 and 2 in focal cortical dysplasia type IIB. **Acta Neuropathol**. 2008 Jun;115(6):683-96.
- Borlongan CV, Hadman M, et al. Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke. **Stroke**. 2004 Oct;35(10):2385-9.
- Bothwell M. Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. **Annu Rev Neurosci**. 1995;18:223-53.
- Bovolenta R, Zucchini S, et al. Hippocampal FGF-2 and BDNF overexpression attenuates epileptogenesis-associated neuroinflammation and reduces spontaneous recurrent seizures. **J Neuroinflammation**. 2010;7:81.
- Bramham CR, Southard T, et al. Unilateral LTP triggers bilateral increases in hippocampal neurotrophin and trk receptor mRNA expression in behaving rats: evidence for interhemispheric communication. **J Comp Neurol**. 1996 May 6;368(3):371-82.

- Brazelton TR, Rossi FM, et al. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. **Science**. 2000 Dec 1;290(5497):1775-9.
- Brionne TC, Tessier I, et al. Loss of TGF-beta 1 leads to increased neuronal cell death and microgliosis in mouse brain. **Neuron**. 2003 Dec 18;40(6):1133-45.
- Bullock MR, Lyeth BG, et al. Current status of neuroprotection trials for traumatic brain injury: lessons from animal models and clinical studies. **Neurosurgery**. 1999 Aug;45(2):207-17; discussion 17-20.
- Burazin TC, Gundlach AL. Localization of GDNF/neurturin receptor (c-ret, GFRalpha-1 and alpha-2) mRNAs in postnatal rat brain: differential regional and temporal expression in hippocampus, cortex and cerebellum. **Brain Res Mol Brain Res**. 1999 Nov 10;73(1-2):151-71.
- Cacheaux LP, Ivens S, et al. Transcriptome profiling reveals TGF-beta signaling involvement in epileptogenesis. **J Neurosci**. 2009 Jul 15;29(28):8927-35.
- Cammalleri M, Martini D, et al. Vascular endothelial growth factor up-regulation in the mouse hippocampus and its role in the control of epileptiform activity. **Eur J Neurosci**. 2011 Feb;33(3):482-98.
- Carmeliet P, Storkebaum E. Vascular and neuronal effects of VEGF in the nervous system: implications for neurological disorders. **Semin Cell Dev Biol**. 2002 Feb;13(1):39-53.
- Carney BJ, Shah K. Migration and fate of therapeutic stem cells in different brain disease models. **Neuroscience**. 2011 Dec 1;197:37-47.
- Carpentino JE, Hartman NW, et al. Region-specific differentiation of embryonic stem cell-derived neural progenitor transplants into the adult mouse hippocampus following seizures. **J Neurosci Res**. 2008 Feb 15;86(3):512-24.
- Castren E, Pitkanen M, et al. The induction of LTP increases BDNF and NGF mRNA but decreases NT-3 mRNA in the dentate gyrus. **Neuroreport**. 1993 Jul;4(7):895-8.
- Cavalheiro EA, Leite JP, et al. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. **Epilepsia**. 1991 Nov-Dec;32(6):778-82.
- Chen X, Katakowski M, et al. Human bone marrow stromal cell cultures conditioned by traumatic brain tissue extracts: growth factor production. **J Neurosci Res**. 2002 Sep 1;69(5):687-91.
- Chen Y, Ai Y, et al. Progenitor proliferation in the adult hippocampus and substantia nigra induced by glial cell line-derived neurotrophic factor. **Exp Neurol**. 2005 Nov;196(1):87-95.
- Cheng A, Wang S, et al. Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain. **Dev Biol**. 2003 Jun 15;258(2):319-33.
- Choi-Lundberg DL, Lin Q, et al. Dopaminergic neurons protected from degeneration by GDNF gene therapy. **Science**. 1997 Feb 7;275(5301):838-41.

Chopp M, Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. **Lancet Neurol**. 2002 Jun;1(2):92-100.

Chu K, Kim M, et al. Human neural stem cell transplantation reduces spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus in adult rats. **Brain Res**. 2004 Oct 15;1023(2):213-21.

Cogle CR, Yachnis AT, et al. Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: a retrospective study. **Lancet**. 2004 May 1;363(9419):1432-7.

Conti G, Gale K, et al. Immunohistochemical evaluation of the protein expression of nerve growth factor and its TrkA receptor in rat limbic regions following electroshock seizures. **Neurosci Res**. 2009 Oct;65(2):201-9.

Costa-Ferro ZS, Souza BS, et al. Transplantation of bone marrow mononuclear cells decreases seizure incidence, mitigates neuronal loss and modulates pro-inflammatory cytokine production in epileptic rats. **Neurobiol Dis**. 2012 May;46(2):302-13.

Costa-Ferro ZS, Vitola AS, et al. Prevention of seizures and reorganization of hippocampal functions by transplantation of bone marrow cells in the acute phase of experimental epilepsy. **Seizure**. 2010 Mar;19(2):84-92.

Costa JC. Influência de eletroconvulsões sobre a permeabilidade da barreira sangue-cérebro ao azul tripan. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**. 1972;30:2-7.

Coulter DA, McIntyre DC, et al. Animal models of limbic epilepsies: what can they tell us? **Brain Pathol**. 2002 Apr;12(2):240-56.

Croll SD, Goodman JH, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in seizures: a double-edged sword. **Adv Exp Med Biol**. 2004;548:57-68.

Curia G, Longo D, et al. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **J Neurosci Methods**. 2008 Jul 30;172(2):143-57.

Dixon CE, Flinn P, et al. Nerve growth factor attenuates cholinergic deficits following traumatic brain injury in rats. **Exp Neurol**. 1997 Aug;146(2):479-90.

Dominici M, Le Blanc K, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**. 2006;8(4):315-7.

Du F, Whetsell WO, Jr., et al. Preferential neuronal loss in layer III of the entorhinal cortex in patients with temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Res**. 1993 Dec;16(3):223-33.

Dube CM, Brewster AL, et al. Febrile seizures: mechanisms and relationship to epilepsy. **Brain Dev**. 2009 May;31(5):366-71.

Dudek FE, Sutula TP. Epileptogenesis in the dentate gyrus: a critical perspective. **Prog Brain Res**. 2007;163:755-73.

Dunnett SB, Rosser AE. Cell therapy in Huntington's disease. **NeuroRx**. 2004 Oct;1(4):394-405.

- Duveau V, Fritschy JM. PSA-NCAM-dependent GDNF signaling limits neurodegeneration and epileptogenesis in temporal lobe epilepsy. **Eur J Neurosci**. 2010 Jul;32(1):89-98.
- Eglitis MA, Dawson D, et al. Targeting of marrow-derived astrocytes to the ischemic brain. **Neuroreport**. 1999 Apr 26;10(6):1289-92.
- Engel J, Jr. Introduction to temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Res**. 1996 Dec;26(1):141-50.
- Engel J, Jr. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. **Epilepsia**. 2001 Jun;42(6):796-803.
- Ernfors P, Bengzon J, et al. Increased levels of messenger RNAs for neurotrophic factors in the brain during kindling epileptogenesis. **Neuron**. 1991 Jul;7(1):165-76.
- Flanders KC, Ren RF, et al. Transforming growth factor-betas in neurodegenerative disease. **Prog Neurobiol**. 1998 Jan;54(1):71-85.
- Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. **Cell**. 2000 Jan 7;100(1):143-55.
- Gall C, Lauterborn J. The dentate gyrus: a model system for studies of neurotrophin regulation. **Epilepsy Res Suppl**. 1992;7:171-85.
- Gall C, Murray K, et al. Kainic acid-induced seizures stimulate increased expression of nerve growth factor mRNA in rat hippocampus. **Brain Res Mol Brain Res**. 1991 Jan;9(1-2):113-23.
- Galvan V, Greenberg DA, et al. The role of vascular endothelial growth factor in neurogenesis in adult brain. **Mini Rev Med Chem**. 2006 Jun;6(6):667-9.
- Gastaut H. Letter: 'Epileptic seizures'. **Dev Med Child Neurol**. 1973 Oct;15(5):688-9.
- Greenberg DA, Jin K. From angiogenesis to neuropathology. **Nature**. 2005 Dec 15;438(7070):954-9.
- Gross CG. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. **Nat Rev Neurosci**. 2000 Oct;1(1):67-73.
- Guedes FA, Galvis-Alonso OY, et al. Plasticidade neuronal associada à epilepsia do lobo temporal mesial: insights a partir de estudos em humanos e em modelos animais. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology** 2006;12(1):10-7.
- Guerreiro CAM, Guerreiro MM, et al. Considerações gerais. In: Guerreiro, C. A. M., Guerreiro, M. M., Cendes, F., Lopes-Cendes, I. In: Lemos, editor. Epilepsia. São Paulo 2000.
- Guttinger M, Fedele D, et al. Suppression of kindled seizures by paracrine adenosine release from stem cell-derived brain implants. **Epilepsia**. 2005 Aug;46(8):1162-9.
- Haas S, Weidner N, et al. Adult stem cell therapy in stroke. **Curr Opin Neurol**. 2005 Feb;18(1):59-64.

- Hagihara H, Hara M, et al. Tonic-clonic seizures induce division of neuronal progenitor cells with concomitant changes in expression of neurotrophic factors in the brain of pilocarpine-treated mice. **Brain Res Mol Brain Res**. 2005 Oct 3;139(2):258-66.
- Hartman NW, Carpentino JE, et al. CXCL12-mediated guidance of migrating embryonic stem cell-derived neural progenitors transplanted into the hippocampus. **PLoS One**. 2010;5(12):e15856.
- Hattiangady B, Rao MS, et al. Chronic temporal lobe epilepsy is associated with severely declined dentate neurogenesis in the adult hippocampus. **Neurobiol Dis**. 2004 Dec;17(3):473-90.
- Hattiangady B, Rao MS, et al. Grafting of striatal precursor cells into hippocampus shortly after status epilepticus restrains chronic temporal lobe epilepsy. **Exp Neurol**. 2008 Aug;212(2):468-81.
- Hawryluk GW, Mothe A, et al. An in vivo characterization of trophic factor production following neural precursor cell or bone marrow stromal cell transplantation for spinal cord injury. **Stem Cells Dev**. 2012 Aug 10;21(12):2222-38.
- Hayashi T, Abe K, et al. Reduction of ischemic damage by application of vascular endothelial growth factor in rat brain after transient ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab**. 1998 Aug;18(8):887-95.
- He J, Genetos DC, et al. Osteogenesis and trophic factor secretion are influenced by the composition of hydroxyapatite/poly(lactide-co-glycolide) composite scaffolds. **Tissue Eng Part A**. 2010 Jan;16(1):127-37.
- Hefti F, Knusel B, et al. Protective effects of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor on basal forebrain cholinergic neurons in adult rats with partial fimbrial transections. **Prog Brain Res**. 1993;98:257-63.
- Hefti F, Weiner WJ. Nerve growth factor and Alzheimer's disease. **Ann Neurol**. 1986 Sep;20(3):275-81.
- Heldin CH, Miyazono K, et al. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. **Nature**. 1997 Dec 4;390(6659):465-71.
- Henderson CE, Phillips HS, et al. GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. **Science**. 1994 Nov 11;266(5187):1062-4.
- Hofer M, Pagliusi SR, et al. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. **EMBO J**. 1990 Aug;9(8):2459-64.
- Holmes GL. Epilepsy in the developing brain: lessons from the laboratory and clinic. **Epilepsia**. 1997 Jan;38(1):12-30.
- Holtzman DM, Lowenstein DH. Selective inhibition of axon outgrowth by antibodies to NGF in a model of temporal lobe epilepsy. **J Neurosci**. 1995 Nov;15(11):7062-70.
- Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. **Annu Rev Neurosci**. 2001;24:677-736.
- Ivens S, Kaufer D, et al. TGF-beta receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis. **Brain**. 2007 Feb;130(Pt 2):535-47.

Jankowsky JL, Patterson PH. The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae. **Prog Neurobiol**. 2001 Feb;63(2):125-49.

Jeon D, Chu K, et al. A cell-free extract from human adipose stem cells protects mice against epilepsy. **Epilepsia**. 2011 Sep;52(9):1617-26.

Jin K, Mao XO, et al. Caspase-3 and the regulation of hypoxic neuronal death by vascular endothelial growth factor. **Neuroscience**. 2001;108(2):351-8.

Jin K, Zhu Y, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2002 Sep 3;99(18):11946-50.

Jing M, Shingo T, et al. The combined therapy of intrahippocampal transplantation of adult neural stem cells and intraventricular erythropoietin-infusion ameliorates spontaneous recurrent seizures by suppression of abnormal mossy fiber sprouting. **Brain Res**. 2009 Oct 27;1295:203-17.

Kaji EH, Leiden JM. Gene and stem cell therapies. **JAMA**. 2001 Feb 7;285(5):545-50.

Kang H, Schuman EM. Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. **Science**. 1995 Mar 17;267(5204):1658-62.

Kanter-Schlifke I, Fjord-Larsen L, et al. GDNF released from encapsulated cells suppresses seizure activity in the epileptic hippocampus. **Exp Neurol**. 2009 Apr;216(2):413-9.

Kanter-Schlifke I, Georgievska B, et al. Seizure suppression by GDNF gene therapy in animal models of epilepsy. **Mol Ther**. 2007 Jun;15(6):1106-13.

Kaplan DR, Miller FD. Signal transduction by the neurotrophin receptors. **Curr Opin Cell Biol**. 1997 Apr;9(2):213-21.

Katoh-Semba R, Takeuchi IK, et al. Brain-derived neurotrophic factor, nerve growth and neurotrophin-3 selected regions of the rat brain following kainic acid-induced seizure activity. **Neurosci Res**. 1999 Oct;35(1):19-29.

Kawamata T, Dietrich WD, et al. Intracisternal basic fibroblast growth factor enhances functional recovery and up-regulates the expression of a molecular marker of neuronal sprouting following focal cerebral infarction. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1997 Jul 22;94(15):8179-84.

Kim BW, Choi M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling regulates hippocampal neurons by elevation of intracellular calcium and activation of calcium/calmodulin protein kinase II and mammalian target of rapamycin. **Cell Signal**. 2008 Apr;20(4):714-25.

Kobayashi T, Ahlenius H, et al. Intracerebral infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor promotes striatal neurogenesis after stroke in adult rats. **Stroke**. 2006 Sep;37(9):2361-7.

Koda M, Okada S, et al. Hematopoietic stem cell and marrow stromal cell for spinal cord injury in mice. **Neuroreport**. 2005 Nov 7;16(16):1763-7.

Kokaia M, Ernfors P, et al. Suppressed epileptogenesis in BDNF mutant mice. **Exp Neurol**. 1995 Jun;133(2):215-24.

- Kokaia Z, Airaksinen MS, et al. GDNF family ligands and receptors are differentially regulated after brain insults in the rat. **Eur J Neurosci**. 1999 Apr;11(4):1202-16.
- Korbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? **N Engl J Med**. 2003 Aug 7;349(6):570-82.
- Koyama R, Ikegaya Y. To BDNF or not to BDNF: that is the epileptic hippocampus. **Neuroscientist**. 2005 Aug;11(4):282-7.
- Kromer LF. Nerve growth factor treatment after brain injury prevents neuronal death. **Science**. 1987 Jan 9;235(4785):214-6.
- Kubo T, Nonomura T, et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) can prevent apoptosis of rat cerebellar granule neurons in culture. **Brain Res Dev Brain Res**. 1995 Apr 18;85(2):249-58.
- Lahtinen S, Pitkanen A, et al. Decreased BDNF signalling in transgenic mice reduces epileptogenesis. **Eur J Neurosci**. 2002 Feb;15(4):721-34.
- Lauterborn JC, Isackson PJ, et al. Seizure-induced increases in NGF mRNA exhibit different time courses across forebrain regions and are biphasic in hippocampus. **Exp Neurol**. 1994 Jan;125(1):22-40.
- Lee CS, Burnsed OA, et al. Adipose stem cells can secrete angiogenic factors that inhibit hyaline cartilage regeneration. **Stem Cell Res Ther**. 2012 Aug 24;3(4):35.
- Lee J, Duan W, et al. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. **J Neurochem**. 2002 Sep;82(6):1367-75.
- Leite JP, Bortolotto ZA, et al. Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. **Neurosci Biobehav Rev**. 1990 Winter;14(4):511-7.
- Leite JP, Cavalheiro EA. Neurobiologia da esclerose mesial temporal. In: Costa, J. C.; Palmmini, A.; Yacubian, E. M. T.; Cavalheiro, E. A. . In: Lemos E, editor. Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias - aspectos clínicos e cirúrgicos 1998. p. 129-36.
- Lemos T, Cavalheiro EA. Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats. **Exp Brain Res**. 1995;102(3):423-8.
- Levi-Montalcini R, Hamburger V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. **J Exp Zool**. 1951 Mar;116(2):321-61.
- Levy YS, Bahat-Stroomza M, et al. Regenerative effect of neural-induced human mesenchymal stromal cells in rat models of Parkinson's disease. **Cytotherapy**. 2008;10(4):340-52.
- Li MO, Wan YY, et al. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. **Annu Rev Immunol**. 2006;24:99-146.
- Li S, Xu B, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor modulates kindling and activation-induced sprouting in hippocampus of adult rats. **Exp Neurol**. 2002 Nov;178(1):49-58.

- Li T, Ren G, et al. Human mesenchymal stem cell grafts engineered to release adenosine reduce chronic seizures in a mouse model of CA3-selective epileptogenesis. **Epilepsy Res.** 2009 Apr;84(2-3):238-41.
- Lin LF, Doherty DH, et al. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. **Science.** 1993 May 21;260(5111):1130-2.
- Lindsay RM, Wiegand SJ, et al. Neurotrophic factors: from molecule to man. **Trends Neurosci.** 1994 May;17(5):182-90.
- Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders. **Nature.** 2006 Jun 29;441(7097):1094-6.
- Linnarsson S, Bjorklund A, et al. Learning deficit in BDNF mutant mice. **Eur J Neurosci.** 1997 Dec;9(12):2581-7.
- Liu Z, Gatt A, et al. Long-term behavioral deficits following pilocarpine seizures in immature rats. **Epilepsy Res.** 1994 Dec;19(3):191-204.
- Loeb DM, Maragos J, et al. The trk proto-oncogene rescues NGF responsiveness in mutant NGF-nonresponsive PC12 cell lines. **Cell.** 1991 Sep 6;66(5):961-6.
- Lohof AM, Ip NY, et al. Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF. **Nature.** 1993 May 27;363(6427):350-3.
- Long Q, Qiu B, et al. Functional recovery and neuronal regeneration of a rat model of epilepsy by transplantation of Hes1-down regulated bone marrow stromal cells. **Neuroscience.** 2012 Jun 14;212:214-24.
- Loscher W. Current status and future directions in the pharmacotherapy of epilepsy. **Trends Pharmacol Sci.** 2002 Mar;23(3):113-8.
- Lu KW, Chen ZY, et al. Protective effect of liposome-mediated glial cell line-derived neurotrophic factor gene transfer in vivo on motoneurons following spinal cord injury in rats. **Chin J Traumatol.** 2004 Oct;7(5):275-9.
- Lu Y, Xue T, et al. Increased expression of TGFbeta type I receptor in brain tissues of patients with temporal lobe epilepsy. **Clin Sci (Lond).** 2009 Jul;117(1):17-22.
- Ma YY, Li KY, et al. Vascular endothelial growth factor acutely reduces calcium influx via inhibition of the Ca<sup>2+</sup> channels in rat hippocampal neurons. **J Neurosci Res.** 2009 Feb;87(2):393-402.
- Maisano X, Litvina E, et al. Differentiation and functional incorporation of embryonic stem cell-derived GABAergic interneurons in the dentate gyrus of mice with temporal lobe epilepsy. **J Neurosci.** 2012 Jan 4;32(1):46-61.
- Makar TK, Trisler D, et al. Brain derived neurotrophic factor treatment reduces inflammation and apoptosis in experimental allergic encephalomyelitis. **J Neurol Sci.** 2008 Jul 15;270(1-2):70-6.
- Malgieri A, Kantzari E, et al. Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art. **Int J Clin Exp Med.** 2010;3(4):248-69.



- Martin D, Miller G, et al. Potent inhibitory effects of glial derived neurotrophic factor against kainic acid mediated seizures in the rat. **Brain Res**. 1995 Jun 19;683(2):172-8.
- Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. **EMBO J**. 2000 Apr 17;19(8):1745-54.
- Matsuzaki H, Tamatani M, et al. Vascular endothelial growth factor rescues hippocampal neurons from glutamate-induced toxicity: signal transduction cascades. **FASEB J**. 2001 May;15(7):1218-20.
- Mattson MP, Maudsley S, et al. BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. **Trends Neurosci**. 2004 Oct;27(10):589-94.
- McCloskey DP, Croll SD, et al. Depression of synaptic transmission by vascular endothelial growth factor in adult rat hippocampus and evidence for increased efficacy after chronic seizures. **J Neurosci**. 2005 Sep 28;25(39):8889-97.
- McNamara JO. Cellular and molecular basis of epilepsy. **J Neurosci**. 1994 Jun;14(6):3413-25.
- McNeill H, Williams C, et al. Neuronal rescue with transforming growth factor-beta 1 after hypoxic-ischaemic brain injury. **Neuroreport**. 1994 Apr 14;5(8):901-4.
- Mesples B, Fontaine RH, et al. Neuronal TGF-beta1 mediates IL-9/mast cell interaction and exacerbates excitotoxicity in newborn mice. **Neurobiol Dis**. 2005 Feb;18(1):193-205.
- Mezey E, Chandross KJ, et al. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. **Science**. 2000 Dec 1;290(5497):1779-82.
- Mezey E, Key S, et al. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2003 Feb 4;100(3):1364-9.
- Mikuni N, Babb TL, et al. Time course of transient expression of GDNF protein in rat granule cells of the bilateral dentate gyri after unilateral intrahippocampal kainic acid injection. **Neurosci Lett**. 1999 Mar 12;262(3):215-8.
- Minichiello L, Korte M, et al. Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. **Neuron**. 1999 Oct;24(2):401-14.
- Mizuno M, Yamada K, et al. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats. **J Neurosci**. 2000 Sep 15;20(18):7116-21.
- Morimoto K, Sato K, et al. Time-dependent changes in neurotrophic factor mRNA expression after kindling and long-term potentiation in rats. **Brain Res Bull**. 1998 Apr;45(6):599-605.
- Morrison SJ, Shah NM, et al. Regulatory mechanisms in stem cell biology. **Cell**. 1997 Feb 7;88(3):287-98.
- Nanobashvili A, Airaksinen MS, et al. Development and persistence of kindling epilepsy are impaired in mice lacking glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor alpha 2. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2000 Oct 24;97(22):12312-7.

Neuwelt EA. Mechanisms of disease: the blood-brain barrier. **Neurosurgery**. 2004 Jan;54(1):131-40; discussion 41-2.

Newton SS, Collier EF, et al. Gene profile of electroconvulsive seizures: induction of neurotrophic and angiogenic factors. **J Neurosci**. 2003 Nov 26;23(34):10841-51.

Nicoletti JN, Lenzer J, et al. Vascular endothelial growth factor attenuates status epilepticus-induced behavioral impairments in rats. **Epilepsy Behav**. 2010 Nov;19(3):272-7.

Nicoletti JN, Shah SK, et al. Vascular endothelial growth factor is up-regulated after status epilepticus and protects against seizure-induced neuronal loss in hippocampus. **Neuroscience**. 2008 Jan 2;151(1):232-41.

Okabe M, Ikawa M, et al. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. **FEBS Lett**. 1997 May 5;407(3):313-9.

Oliveira SL, Pillat MM, et al. Functions of neurotrophins and growth factors in neurogenesis and brain repair. **Cytometry A**. 2012 Oct 8.

Paradiso B, Marconi P, et al. Localized delivery of fibroblast growth factor-2 and brain-derived neurotrophic factor reduces spontaneous seizures in an epilepsy model. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2009 Apr 28;106(17):7191-6.

Paratcha G, Ledda F, et al. The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. **Cell**. 2003 Jun 27;113(7):867-79.

Pastor D, Viso-Leon MC, et al. Comparative effects between bone marrow and mesenchymal stem cell transplantation in GDNF expression and motor function recovery in a motoneuron degenerative mouse model. **Stem Cell Rev**. 2012 Jun;8(2):445-58.

Patterson SL, Grover LM, et al. Neurotrophin expression in rat hippocampal slices: a stimulus paradigm inducing LTP in CA1 evokes increases in BDNF and NT-3 mRNAs. **Neuron**. 1992 Dec;9(6):1081-8.

Pencea V, Bingaman KD, et al. Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. **J Neurosci**. 2001 Sep 1;21(17):6706-17.

Petersen BE, Bowen WC, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. **Science**. 1999 May 14;284(5417):1168-70.

Pitkanen A, Sutula TP. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. **Lancet Neurol**. 2002 Jul;1(3):173-81.

Pitkanen A, Tuunanen J, et al. Amygdala damage in experimental and human temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Res**. 1998 Sep;32(1-2):233-53.

Plata-Salaman CR, Ilyin SE, et al. Kindling modulates the IL-1beta system, TNF-alpha, TGF-beta1, and neuropeptide mRNAs in specific brain regions. **Brain Res Mol Brain Res**. 2000 Feb 22;75(2):248-58.

- Pochon NA, Menoud A, et al. Neuronal GDNF expression in the adult rat nervous system identified by in situ hybridization. **Eur J Neurosci**. 1997 Mar;9(3):463-71.
- Prehn JH, Backhauss C, et al. Transforming growth factor-beta 1 prevents glutamate neurotoxicity in rat neocortical cultures and protects mouse neocortex from ischemic injury in vivo. **J Cereb Blood Flow Metab**. 1993 May;13(3):521-5.
- Prehn JH, Bindokas VP, et al. Regulation of neuronal Bcl2 protein expression and calcium homeostasis by transforming growth factor type beta confers wide-ranging protection on rat hippocampal neurons. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1994 Dec 20;91(26):12599-603.
- Priel MR, Dos Santos, N. F., Cavaleiro, E. A. Developmental aspects of the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy Research** 1996;26(1):115-21.
- Proescholdt MA, Heiss JD, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulates vascular permeability and inflammation in rat brain. **J Neuropathol Exp Neurol**. 1999 Jun;58(6):613-27.
- Raab S, Plate KH. Different networks, common growth factors: shared growth factors and receptors of the vascular and the nervous system. **Acta Neuropathol**. 2007 Jun;113(6):607-26.
- Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. **Electroencephalogr Clin Neurophysiol**. 1972 Mar;32(3):281-94.
- Reibel S, Larmet Y, et al. Brain-derived neurotrophic factor delays hippocampal kindling in the rat. **Neuroscience**. 2000;100(4):777-88.
- Rigau V, Morin M, et al. Angiogenesis is associated with blood-brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy. **Brain**. 2007 Jul;130(Pt 7):1942-56.
- Roberts AB, Sporn MB. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). **Growth Factors**. 1993;8(1):1-9.
- Rogawski MA, Porter RJ. Antiepileptic drugs: pharmacological mechanisms and clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds. **Pharmacol Rev**. 1990 Sep;42(3):223-86.
- Rosenkranz K, Kumbruch S, et al. Transplantation of human umbilical cord blood cells mediated beneficial effects on apoptosis, angiogenesis and neuronal survival after hypoxic-ischemic brain injury in rats. **Cell Tissue Res**. 2012 Jun;348(3):429-38.
- Rosenstein JM, Krum JM. New roles for VEGF in nervous tissue--beyond blood vessels. **Exp Neurol**. 2004 Jun;187(2):246-53.
- Ruschenschmidt C, Koch PG, et al. Functional properties of ES cell-derived neurons engrafted into the hippocampus of adult normal and chronically epileptic rats. **Epilepsia**. 2005;46 Suppl 5:174-83.
- Sanabria ERG, Cavaleiro EA. Epileptogênese: Contribuição dos Modelos Experimentais. In: G. M. M. Guerreiro C A M, Cendes F, Lopes-Cendes. . In: Ltda LeG, editor. Epilepsia. São Paulo2000. p. 29-57.

Sander JV, Hart YMA. Epidemiologia da Epilepsia. *Epilepsia: Um Guia Prático*. São Paulo 1999. p. 43-50.

Sarabi A, Hoffer BJ, et al. GFR alpha-1 is expressed in parvalbumin GABAergic neurons in the hippocampus. **Brain Res**. 2000 Sep 22;877(2):262-70.

Sarkisian MR, Tandon P, et al. Multiple kainic acid seizures in the immature and adult brain: ictal manifestations and long-term effects on learning and memory. **Epilepsia**. 1997 Nov;38(11):1157-66.

Schabitz WR, Berger C, et al. Effect of brain-derived neurotrophic factor treatment and forced arm use on functional motor recovery after small cortical ischemia. **Stroke**. 2004 Apr;35(4):992-7.

Schabitz WR, Schwab S, et al. Intraventricular brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size after focal cerebral ischemia in rats. **J Cereb Blood Flow Metab**. 1997 May;17(5):500-6.

Schabitz WR, Steigleder T, et al. Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis. **Stroke**. 2007 Jul;38(7):2165-72.

Scharfman HE, Goodman JH, et al. Spontaneous limbic seizures after intrahippocampal infusion of brain-derived neurotrophic factor. **Exp Neurol**. 2002 Apr;174(2):201-14.

Schmidt-Kastner R, Humpel C, et al. Cellular hybridization for BDNF, trkB, and NGF mRNAs and BDNF-immunoreactivity in rat forebrain after pilocarpine-induced status epilepticus. **Exp Brain Res**. 1996;107(3):331-47.

Shen H, Liu L, et al. Hippocampal stem cell grafting-mediated recovery of injured hippocampus in the rat model of temporal lobe epilepsy. **Int J Neurosci**. 2010 Oct;120(10):647-54.

Shetty AK, Zaman V, et al. Hippocampal neurotrophin levels in a kainate model of temporal lobe epilepsy: a lack of correlation between brain-derived neurotrophic factor content and progression of aberrant dentate mossy fiber sprouting. **J Neurochem**. 2003 Oct;87(1):147-59.

Shindo A, Nakamura T, et al. Seizure suppression in amygdala-kindled mice by transplantation of neural stem/progenitor cells derived from mouse embryonic stem cells. **Neurol Med Chir (Tokyo)**. 2010;50(2):98-105; discussion -6.

Shu X, Du S, et al. Transplantation of neural stem cells overexpressing cardiotrophin-1 inhibits sprouting of hippocampal mossy fiber in a rat model of status epilepticus. **Cell Biochem Biophys**. 2011 Nov;61(2):367-70.

Simonato M, Tongiorgi E, et al. Angels and demons: neurotrophic factors and epilepsy. **Trends Pharmacol Sci**. 2006 Dec;27(12):631-8.

Simonato M, Tongiorgi E, et al. Angels and demons: neurotrophic factors and epilepsy. **Trends Pharmacol Sci**. 2006a Dec;27(12):631-8.

- Simonato Mea. Effects of defective herpes simplex vectors expressing FGF-2 and BDNF on neurogenesis in vitro and on pilocarpine epileptogenesis in vivo. **Soc Neurosci Abstr.** 2006b:417.20.
- Singh J, Ling LE, et al. Transforming the TGFbeta pathway: convergence of distinct lead generation strategies on a novel kinase pharmacophore for TbetaRI (ALK5). **Curr Opin Drug Discov Devel.** 2004 Jul;7(4):437-45.
- Slotkin TA, Wang XF, et al. Expression of mRNAs coding for the transforming growth factor-beta receptors in brain regions of euthyroid and hypothyroid neonatal rats and in adult brain. **Brain Res Dev Brain Res.** 1997 Mar 17;99(1):61-5.
- Sloviter RS. Feedforward and feedback inhibition of hippocampal principal cell activity evoked by perforant path stimulation: GABA-mediated mechanisms that regulate excitability in vivo. **Hippocampus.** 1991 Jan;1(1):31-40.
- Sloviter RS. The neurobiology of temporal lobe epilepsy: too much information, not enough knowledge. **C R Biol.** 2005 Feb;328(2):143-53.
- Sofroniew MV, Howe CL, et al. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. **Annu Rev Neurosci.** 2001;24:1217-81.
- Sondell M, Lundborg G, et al. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. **J Neurosci.** 1999 Jul 15;19(14):5731-40.
- Springer JE, Mu X, et al. Expression of GDNF mRNA in rat and human nervous tissue. **Exp Neurol.** 1994 Jun;127(2):167-70.
- Sun FY, Guo X. Molecular and cellular mechanisms of neuroprotection by vascular endothelial growth factor. **J Neurosci Res.** 2005 Jan 1-15;79(1-2):180-4.
- Sun Y, Jin K, et al. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. **J Clin Invest.** 2003 Jun;111(12):1843-51.
- Suzuki J. Investigations of epilepsy with a mutant animal (EL mouse) model. **Epilepsia.** 2004;45 Suppl 8:2-5.
- Szelenyi J. Cytokines and the central nervous system. **Brain Res Bull.** 2001 Mar 1;54(4):329-38.
- Tanaka T, Saito H, et al. Inhibition of GABAA synaptic responses by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rat hippocampus. **J Neurosci.** 1997 May 1;17(9):2959-66.
- Tauk DL, Nadler JV. Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. **J Neurosci.** 1985 Apr;5(4):1016-22.
- Thom M, Eriksson S, et al. Temporal lobe sclerosis associated with hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: neuropathological features. **J Neuropathol Exp Neurol.** 2009 Aug;68(8):928-38.

- Tolbert DL, Bradley MW, et al. Chronic intraventricular infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) rescues some cerebellar Purkinje cells from hereditary degeneration. **Exp Neurol**. 2001 Aug;170(2):375-9.
- Tomkins O, Kaufer D, et al. Frequent blood-brain barrier disruption in the human cerebral cortex. **Cell Mol Neurobiol**. 2001 Dec;21(6):675-91.
- Tse WT, Pendleton JD, et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. **Transplantation**. 2003 Feb 15;75(3):389-97.
- Turski WA, Cavalheiro EA, et al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behav Brain Res**. 1983 Sep;9(3):315-35.
- Tuszynski MH, Blesch A. Nerve growth factor: from animal models of cholinergic neuronal degeneration to gene therapy in Alzheimer's disease. **Prog Brain Res**. 2004;146:441-9.
- Unsicker K, Flanders KC, et al. Transforming growth factor beta isoforms in the adult rat central and peripheral nervous system. **Neuroscience**. 1991;44(3):613-25.
- Valério RMF, E. M. T. YACUBIAN, S. R. ROSEMBERG, S.R. Anatomia Patológica em 33 pacientes com Epilepsia do Lobo Temporal. **Brazilian Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology** 1995;1(2):67-74.
- Van der Zee CE, Rashid K, et al. Intraventricular administration of antibodies to nerve growth factor retards kindling and blocks mossy fiber sprouting in adult rats. **J Neurosci**. 1995 Jul;15(7 Pt 2):5316-23.
- van Velthoven CT, van de Looij Y, et al. Mesenchymal stem cells restore cortical rewiring after neonatal ischemia in mice. **Ann Neurol**. 2012 Jun;71(6):785-96.
- Venturin GT, Greggio S, et al. Bone marrow mononuclear cells reduce seizure frequency and improve cognitive outcome in chronic epileptic rats. **Life Sci**. 2011 Aug 15;89(7-8):229-34.
- Vezzani A, Granata T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. **Epilepsia**. 2005 Nov;46(11):1724-43.
- Villoslada P, Genain CP. Role of nerve growth factor and other trophic factors in brain inflammation. **Prog Brain Res**. 2004;146:403-14.
- Vitkovic L, Konsman JP, et al. Cytokine signals propagate through the brain. **Mol Psychiatry**. 2000 Nov;5(6):604-15.
- Vitkovic L, Maeda S, et al. Anti-inflammatory cytokines: expression and action in the brain. **Neuroimmunomodulation**. 2001;9(6):295-312.
- Vivien D, Ali C. Transforming growth factor-beta signalling in brain disorders. **Cytokine Growth Factor Rev**. 2006 Feb-Apr;17(1-2):121-8.
- Waldau B, Hattiangady B, et al. Medial ganglionic eminence-derived neural stem cell grafts ease spontaneous seizures and restore GDNF expression in a rat model of chronic temporal lobe epilepsy. **Stem Cells**. 2010 Jul;28(7):1153-64.

- Walton KM. GDNF: a novel factor with therapeutic potential for neurodegenerative disorders. **Mol Neurobiol**. 1999 Feb;19(1):43-59.
- Warner-Schmidt JL, Duman RS. VEGF is an essential mediator of the neurogenic and behavioral actions of antidepressants. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2007 Mar 13;104(11):4647-52.
- Warner-Schmidt JL, Madsen TM, et al. Electroconvulsive seizure restores neurogenesis and hippocampus-dependent fear memory after disruption by irradiation. **Eur J Neurosci**. 2008 Mar;27(6):1485-93.
- Weisenhorn DM, Roback J, et al. Cellular aspects of trophic actions in the nervous system. **Int Rev Cytol**. 1999;189:177-265.
- Woolf NJ, Milov AM, et al. Elevation of nerve growth factor and antisense knockdown of TrkA receptor during contextual memory consolidation. **J Neurosci**. 2001 Feb 1;21(3):1047-55.
- Yacubian EMT. Contribuição da semiologia das crises parciais ao diagnóstico topográfico das epilepsias. In: Costa, J. C.; Palmieri, A.; Yacubian, E. M. T.; Cavalheiro, E. A. In: Ltda LEG, editor. Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias. São Paulo 1998. p. 163-72.
- Yancopoulos GD, Davis S, et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. **Nature**. 2000 Sep 14;407(6801):242-8.
- Yasuhara T, Hara K, et al. Mannitol facilitates neurotrophic factor upregulation and behavioral recovery in neonatal hypoxic-ischemic rats with human umbilical cord blood grafts. **J Cell Mol Med**. 2009 Feb 4.
- Yoo YM, Lee CJ, et al. Neuroprotection of adenoviral-vector-mediated GDNF expression against kainic-acid-induced excitotoxicity in the rat hippocampus. **Exp Neurol**. 2006 Aug;200(2):407-17.
- Zhang J, Li Y, et al. Human bone marrow stromal cell treatment improves neurological functional recovery in EAE mice. **Exp Neurol**. 2005 Sep;195(1):16-26.
- Zhang ZG, Zhang L, et al. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. **J Clin Invest**. 2000 Oct;106(7):829-38.
- Zhu Y, Roth-Eichhorn S, et al. The expression of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in hippocampal neurons: a temporary upregulated protein level after transient forebrain ischemia in the rat. **Brain Res**. 2000 Jun 2;866(1-2):286-98.
- Zhu Y, Yang GY, et al. Transforming growth factor-beta 1 increases bad phosphorylation and protects neurons against damage. **J Neurosci**. 2002 May 15;22(10):3898-909.
- Zigova T, Pencea V, et al. Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. **Mol Cell Neurosci**. 1998 Jul;11(4):234-45.
- Zurn AD, Baetge EE, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), a new neurotrophic factor for motoneurons. **Neuroreport**. 1994 Dec 30;6(1):113-8.

**ANEXOS****ANEXO A** – Artigo científico submetido à revista Experimental Neurology



Elsevier Editorial System(tm) for  
Experimental Neurology  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Transplantation of Bone Marrow Mononuclear Cells Modulates  
Expression of Growth Factors in Animal Model of Chronic Epilepsy

Article Type: Regular Paper

Section/Category: Transplantation and Repair

Keywords: Epilepsy, pilocarpine, bone marrow stem cells, trophic factors

Corresponding Author: Dr Jaderson Costa DaCosta, MD, PhD

Corresponding Author's Institution: Laboratório de Neurociências e de  
Sinalização Celular, Instituto do Cérebro, Pontifícia Universidade  
Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS)

First Author: Gabriele Zanirati

Order of Authors: Gabriele Zanirati; Fabrício Simão ; Felipe  
Rodrigues; Daniel Marinowik; Gianina T Venturin ; Samuel Greggio ;  
Jaderson Costa DaCosta, MD, PhD

Abstract: In previous studies, transplantation of bone marrow mononuclear cells (BMNCs) in epileptic pilocarpine-treated animals was shown to be neuroprotective. BMNC seem to improve functional outcomes, to prevent or reduce seizures and to improve cognitive deficits. However, the mechanisms underlying the observed effects have not been fully explained yet. This study was designed to investigate the effects of intravenous administration of BMNCs on the expression of growth factors in the epileptic rat brain. Pilocarpine-treated rats were intravenously transplanted 22 days after pilocarpine with BMNCs obtained from enhanced green fluorescent protein (eGFP) transgenic C57BL/6 mice. The expression of trophic factors, such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF), glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF), neural growth factor (NGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) was measured at different time points after cellular transplantation, by ELISA analysis. Our data show that BMNCs modulated the hippocampal expression of trophic factors in epileptic animals. High levels of BDNF, GDNF, NGF, VEGF and reduced levels of TGF- $\beta$ 1 were detected in the hippocampus of transplanted animals. We suggest that the altered expression of trophic factors caused by transplantation of BMNC may be involved with the benefits observed in epileptic animals treated with these cells in our previous studies.

**Transplantation of Bone Marrow Mononuclear Cells Modulates Expression of  
Growth Factors in Animal Model of Chronic Epilepsy**

Gabriele Zanirati, Fabrício Simão\*, Felipe Rodrigues, Daniel Marinowik, Gianina

Teribele Venturin, Samuel Greggio, Jaderson Costa DaCosta\*

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

Correspondence author:

- Jaderson Costa DaCosta, MD, PhD.

- Fabrício Simão, PhD

Laboratório de Neurociências, Instituto do Cérebro (InsCer), Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga 6690, Jardim Botânico, Prédio 63, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

Phone/Fax: +5551 33203250

E-mail: [jcc@puers.br](mailto:jcc@puers.br) and [simaof@gmail.com](mailto:simaof@gmail.com)

## ABSTRACT

In previous studies, transplantation of bone marrow mononuclear cells (BMMCs) in epileptic pilocarpine-treated animals was shown to be neuroprotective. BMMC seem to improve functional outcomes, to prevent or reduce seizures and to improve cognitive deficits. However, the mechanisms underlying the observed effects have not been fully explained yet. This study was designed to investigate the effects of intravenous administration of BMMCs on the expression of growth factors in the epileptic rat brain. Pilocarpine-treated rats were intravenously transplanted 22 days after pilocarpine with BMMCs obtained from enhanced green fluorescent protein (eGFP) transgenic C57BL/6 mice. The expression of trophic factors, such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF), glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF), neural growth factor (NGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) was measured at different time points after cellular transplantation, by ELISA analysis. Our data show that BMMCs modulated the hippocampal expression of trophic factors in epileptic animals. High levels of BDNF, GDNF, NGF, VEGF and reduced levels of TGF- $\beta$ 1 were detected in the hippocampus of transplanted animals. We suggest that the altered expression of trophic factors caused by transplantation of BMMC may be involved with the benefits observed in epileptic animals treated with these cells in our previous studies.

**Keywords:** Epilepsy, pilocarpine, bone marrow stem cells, trophic factors.

## INTRODUCTION

Epilepsy, one of the most common chronic neurological disorders, is now recognized as a progressive disorder with continuous molecular and cellular changes in addition to clinical progression (Pitkanen and Sutula 2002), especially in the case of temporal lobe epilepsy (TLE). TLE is characterized by the progressive expansion of spontaneous recurrent motor seizures stemming from the limbic system regions, especially the hippocampus (Dudek and Sutula 2007). Unfortunately, in as many as 70% of patients, TLE is intractable by pharmacologic treatment and requires brain surgery for seizure control.

Stem cells-based studies have grown exponentially in epilepsy and have shown benefits in experimental models (Abdanipour et al. 2011; Carpentino et al. 2008; Chu et al. 2004; Costa-Ferro et al. 2012; Costa-Ferro et al. 2010; Guttinger et al. 2005; Jing et al. 2009; Li et al. 2009; Maisano et al. 2012; Venturin et al. 2011; Waldau et al. 2010). We have demonstrated that intravenous administration of bone marrow mononuclear cells (BMNCs) improves the functional outcome in rats with TLE (Costa-Ferro et al. 2012; Costa-Ferro et al. 2010; Venturin et al. 2011). However, the percentage of GFP+ grafted cells expressing in the brain is limited and unlikely to explain the improvement in functional outcome seen during the duration of experiments (Costa-Ferro et al. 2012; Costa-Ferro et al. 2010; Venturin et al. 2011). Since BMNC have the capacity to produce a large array of trophic and growth factors both in vivo and in vitro (Chen et al. 2002; Hawryluk et al. 2012), a more reasonable explanation for the functional benefit derived from BMNC treatment is that these cells produce and/or induce the expression of factors that subsequently activate endogenous restorative mechanisms within the injured brain.

Trophic factors are vital for the proliferation and maturation of neurons during embryogenesis (Lindsay et al. 1994), and they are selectively expressed in different parts of the central nervous system (CNS) with different temporal profiles as CNS development proceeds. Upregulation of neurotrophic growth factors following BMNC transplantation may contribute to functional improvement seen after BMNC transplantation (Bao et al. 2011). Furthermore, these compounds have shown neuroprotective and beneficial effects on the functional outcome in animal studies of epilepsy (Simonato et al. 2006). We therefore studied the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), nerve growth factor (NGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), glial-derived neurotrophic factor (GDNF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) after intravenous transplantation of BMNCs in chronic epilepsy induced by pilocarpine.

## **MATERIAL AND METHODS**

### *Animals*

Adult male Wistar rats (40-50 days of age, 150–200 g) were used to induce epilepsy and as controls. Enhanced green fluorescent protein (EGFP+) transgenic adult male C57BL/6 mice were used as BMNC donors. All animals were kept under environmentally controlled conditions (12-hour light/dark cycle; 22–24 °C) and food and drinking water were available *ad libitum*. This study was approved by the Animal Care and Use Committee of Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (11/00265).

### *Epilepsy model*

The pilocarpine model of epilepsy was used to produce chronic spontaneous seizures (Turski et al. 1983). Rats were injected with methylscopolamine (1 mg/kg i.p., Sigma) 15–30 min prior to pilocarpine (320 mg/kg, i.p., Sigma) to minimize peripheral side effects. Systemic administration of pilocarpine induced Status Epilepticus (SE), with continuous seizure activity usually lasting 90 min. Seizures were scored using the Racine scale (Racine 1972), and only animals that were scored grade 5 were included in this study. Seizures were terminated with diazepam (10 mg/kg, i.p.) 90 min after administration of pilocarpine. Then, after a latent (seizure-free) phase of 1–2 weeks, the rats went on to develop chronic epilepsy characterized by spontaneous convulsions (Cavalheiro et al. 1991; Leite et al. 1990; Turski et al. 1983). Spontaneous recurrent seizures (SRS) were monitored from day 15 to 21 (8 h/day) by a video camera after pilocarpine injection. Animals that did not exhibit seizures during the first 7 days of video monitoring were not included in this study.

### *Isolation and Processing of BMMCs*

BMMCs were obtained from C57BL/6 mice expressing eGFP, which was used as a reporter of transplanted cells. The animals were euthanized and fresh bone marrow was extracted from the long bones (humeri, femora and tibiae). The material was centrifuged at 400 ×g for 10 min. The cell pellet was resuspended with RPMI-1640 medium and fractionated on a density gradient generated by centrifugation at 400 ×g over a Ficoll-Paque solution (Histopaque 11191 Sigma Aldrich, St. Louis, MO). The mononuclear fraction over the Ficoll-Paque layer was collected and washed twice with DPBS. Cell concentrations were determined with a Neubauer-counting chamber, and the number of viable cells was determined by Trypan Blue exclusion. For the detection of surface

antigen, BMMCs were incubated with conjugated antibodies against CD34, CD11b, CD117, CD45 and Sca1. Labeled cells were collected and analyzed using a FACSCalibur cytometer (Venturin et al. 2011).

#### *Transplantation of BMMCs*

Pilocarpine animals that showed spontaneous recurrent seizures were randomly divided into two groups on day 22: Pilo (pilocarpine-treated rats receiving saline injection, n=4); Pilo+BMMC (pilocarpine-treated rats transplanted with BMMC, n=12). Non-epileptic animals were assigned to the Control group (saline-treated rats receiving saline injection in replacement of both pilocarpine and BMMC, n=4). The BMMC suspension was prepared for transplantation in saline at a concentration of  $1 \times 10^7$  cells in 100 $\mu$ L total volume. Cells or saline were administered via tail vein injection 22 days after SE. Animals were sacrificed 3, 7 and 14 days after transplantation, and hippocampi were collected for ELISA.

#### *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Dissected hippocampal tissues were homogenized in lysis buffer (137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1% NP40, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 50 mM NaF, 1mM PMSF and proteinase inhibitors cocktail), and then centrifuged at 8,000  $\times$  g for 10 min at 4 °C. The samples were acidified and then neutralized in order to measure the total level of trophic factors. Evaluation of the expression of BDNF, GDNF, NGF, and TGF- $\beta$ 1 was determined using Immunoassay Systems Emax® (Promega, Madison, WI) and VEGF using the ELISA Development Kit (PeproTech, Rocky Hill, NJ), all carried out according to the manufacturer's instructions. The expression levels of neurotrophic factors in the brain tissue were expressed as pg/mg total protein.

### *Statistical Analysis*

Quantitative data were expressed as mean±S.E.M and multiple comparisons between the different groups were made using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. Differences of  $P < 0.05$  were considered significant. Analyses were performed using Prism-Graph 5.0 software (Graph-Pad Software, San Diego, CA).

## **RESULTS**

### *BMMC therapy induces trophic factor production in epileptic rats*

Tissue expression of trophic factors BDNF, GDNF, NGF, VEGF and TGF- $\beta$ 1 were measured in the hippocampus of control animals, untreated epileptics and treated epileptics with BMMC at different times after transplantation.

### *BMMC transplantation increases hippocampal BDNF levels*

BDNF levels were significantly elevated in BMMC-treated groups compared to pilo group. This difference was significant 14 days after transplantation ( $189.1 \pm 39.90$  pg.mL<sup>-1</sup>) when compared to pilo group ( $52 \pm 21.58$  pg.mL<sup>-1</sup>;  $p < 0.05$ ). There were no differences between animals in the Pilo and control groups. Figure 2 shows the mean hippocampal levels of BDNF.

### *BMMC transplantation increases hippocampal levels of NGF*

NGF levels were significantly higher only at 7 days after transplantation ( $826.4 \pm 12.14$  pg.mL<sup>-1</sup>) compared to pilo group ( $530.7 \pm 102.9$  pg.mL<sup>-1</sup>;  $p < 0.05$ ) Pilo group mean was



$530.7 \pm 102.9 \text{ pg.mL}^{-1}$  ( $p < 0.05$ ). No differences were observed between groups control and pilo. Figure 2 shows the mean hippocampal levels of NGF.

*BMMC transplantation increases hippocampal levels of GDNF*

We found significantly higher levels of GDNF in groups treated with BMMC, at 7 ( $219.7 \pm 26.89 \text{ pg.mL}^{-1}$ ) and 14 days after transplantation ( $214.9 \pm 24.36 \text{ pg.mL}^{-1}$ ) when compared to pilo group ( $103.2 \pm 15.5 \text{ pg.mL}^{-1}$ ;  $p < 0.05$ ). Furthermore, no differences were observed in the hippocampal levels of GDNF between the control and pilo groups, as shown in Figure 3.

*BMMC transplantation increases hippocampal levels of VEGF*

We observed a significantly increased expression of VEGF in all groups treated with the BMMC compared to Pilo group ( $380.3 \pm 44.33 \text{ pg.mL}^{-1}$ ). VEGF levels increased gradually with time, and reached the highest expression at 7 ( $796.7 \pm 27.24 \text{ pg.mL}^{-1}$ ;  $p < 0.001$ ) and 14 days ( $938.7 \pm 45.73 \text{ pg.mL}^{-1}$ ;  $p < 0.001$ ) after cell transplantation. There were also significant differences among the BMMC-transplanted groups transplanted: groups evaluated 7 and 14 days after transplantation showed the highest levels of VEGF expression in the period than 3 days after transplantation ( $492.5 \pm 50.13 \text{ pg.mL}^{-1}$ ;  $p < 0.001$ ). There was no difference between the untreated animals epileptic Pilo group and Control group animals, as it can be seen in Figure 3.

*BMMC transplantation decreases hippocampal levels of TGF- $\beta$ 1*

The TGF- $\beta$  expression in the hippocampus of epileptic animals treated with BMMC levels were significantly reduced at 14 days ( $113.8 \pm 22.2 \text{ pg.mL}^{-1}$ ) after transplantation compared to pilo group ( $273.3 \pm 39.57 \text{ pg.mL}^{-1}$ ;  $p < 0.05$ ). Furthermore, TGF- $\beta$ 1

expression was higher in the pilo group and in the group assessed 3 days ( $301 \pm 38.61$  pg.mL<sup>-1</sup>) after the cell transplantation when compared to the control group ( $127.4 \pm 15.21$  pg.mL<sup>-1</sup>;  $p < 0,05$ ). Also, among the BMMC-treated groups we observed a gradual decrease until the maximum evaluation period at 14 days after transplantation. There was a significant difference between groups evaluated at 3 and 14 days ( $113.8 \pm 22.2$  pg.mL<sup>-1</sup>,  $p < 0.001$ ) after transplantation. Figure 3 shows the mean hippocampal levels of TGF- $\beta$ 1.

## DISCUSSION

Our data show that there was a progressive increase in the expression of BDNF, NGF, GDNF and VEGF after treatment with BMMC in chronic epileptic rats. This increase reached statistical significance on days 3 to 14 for VEGF and NGF, day 7 to 14 for GDNF and day 14 for BDNF. On the other hand, TGF- $\beta$ 1 levels decreased in the timeframe analysed.

Recent data from our research group have shown promising results in the treatment of temporal lobe epilepsy by using cellular based-therapy (Costa-Ferro et al. 2012; Costa-Ferro et al. 2010; Venturin et al. 2011). This study was undertaken to gain insight into the mechanisms underlying this improvement, since in acute and subacute stages therapeutic benefit may well be due to production of neurotrophic growth factors. Neurotrophic factors control molecular signaling pathways, which regulate cell survival, proliferation, and differentiation in the central nervous system (Mattson et al. 2004). There is a large array of neurotrophic growth factors; however, we concentrated on BDNF, NGF, GDNF, VEGF and TGF- $\beta$ 1 since there is clear documentation in literature that they are produced in response to epilepsy.

BDNF is one of the most widely distributed factors, which effectively prevents neuronal cell death and promotes synaptic and axonal plasticity after various forms of brain damage (Beck et al. 1994; Bullock et al. 1999). BDNF has been seen as a therapeutic target for the treatment of epilepsy (Koyama and Ikegaya 2005; Simonato et al. 2006). It is known to increase neurogenesis, reduce neuronal loss and the occurrence of spontaneous seizures (Bovolenta et al. 2010), and also prevents the development of SE (Paradiso et al. 2009). Knockout mice for BDNF and TrkB receptor reduce epileptogenesis (Binder et al. 2001; Lahtinen et al. 2002), and BDNF expression increases early in a model of epilepsy induced by pilocarpine (Schmidt-Kastner et al. 1996). Studies show that NGF facilitates neuronal repair, as a neuroprotective effect (Sofroniew et al. 2001). The neuroprotective potential after NGF injection or via implantation of NGF-producing fibroblasts with NGF transgenic mice has been demonstrated in different paradigms of experimental brain injury (Hefti and Weiner 1986; Kromer 1987). In this study, BDNF and NGF expression was not regulated in chronic epilepsy in hippocampus, in agreement with other studies (Hattiangady et al. 2004; Shetty et al. 2003). Here, BDNF and NGF levels increased after BMNC transplantation and may be responsible for the effects seen in our group as the best performance on cognitive tests and reduced the duration and frequency of crises (Venturin et al., 2011)

GDNF is a survival factor for several types of neurons (Tolbert et al. 2001; Zurn et al. 1994) and has suggested anticonvulsant properties (Kanter-Schlifke et al. 2007; Yoo et al. 2006). Li and colleagues (2002) demonstrated that the intraventricular administration of GDNF prevented inflammation induced by increased hilar area and mossy fiber sprouting in hippocampus of rats (Li et al. 2002). Moreover, Nanobashvili and coworkers (2000) showed that knockout mice to GFR $\alpha$ 1-receptor also suppressed

the development of seizures induced by kindling (Nanobashvili et al. 2000). We showed that BMMC transplantation increased expression of GDNF in the hippocampus of epileptic rats and may be preventing inflammation, decreasing neuronal excitability, and thus reducing of seizure frequency.

VEGF signaling pathway has been implicated in several neurological disorders including epilepsy (Croll et al. 2004). In particular, VEGF expression is regulated by neuronal and glial cells after seizures in the rat hippocampus, suggesting a neuroprotective role for VEGF in epilepsy (Newton et al. 2003; Nicoletti et al. 2010; Warner-Schmidt and Duman 2007). VEGF reduces neuronal excitability and synaptic activity (McCloskey et al. 2005), and also showed the ability to significantly protect anxiety, learning and memory after SE (Nicoletti et al. 2010). VEGF increased after BMMC transplantation could contribute to the reduction of seizure frequency and improved behavioral outcomes.

Our results also demonstrate a gradual reduction of the expression of TGF- $\beta$ 1 in the hippocampus of animals transplanted with the BMMC and increased expression in untreated epileptic animals compared to sham animals. The involvement of TGF- $\beta$ 1 in epileptogenesis has been shown in animals with high regulation of TGF- $\beta$ 1 in neurons and astrocytes after seizures (Aronica et al. 2000; Plata-Salaman et al. 2000). As in the present study, these evidences suggest this factor is implicated with both acute and chronic epilepsy. Evidence that activation of signaling pathway TGF- $\beta$  and their receptors are capable of enhance epileptiform activity in the brain and blockers both can prevent increase of epileptogenesis (Cacheaux et al. 2009; Ivens et al. 2007). Studies show that the blood brain barrier (BBB) dysfunction may play a direct role in the pathogenesis of epilepsy and that TGF- $\beta$ 1 is associated with opening of the BBB, which happens with the occurrence of seizures (Ivens et al. 2007). Also, studies suggest that an

increase of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in the brain, which occurs in various diseases, including epilepsy, likely regulate the expression of TGF- $\beta$ 1 (Vitkovic et al. 2001). A study from our group demonstrated that after transplantation of BMMC there was a significant reduction in the IL-1 $\beta$  levels (Costa-Ferro et al. 2012). Our data suggest that both IL-1 $\beta$  and TGF- $\beta$ 1 are adjusted after cell transplantation. Decreased TGF- $\beta$ 1 after transplantation indicates that this factor may actually be involved in epileptic activity, such as increasing the activation of NMDA receptors, which can generate higher neuronal excitability, and thus increase the frequency of seizures (Ivens et al. 2007).

Many studies show an increased expression of trophic factors in epileptic animals, but most of these studies are taken in the acute period of the disease (Jankowsky and Patterson 2001). Most of these studies seek to identify neurotrophic factors that are potentially useful as neuroprotective agents and anticonvulsants after SE to prevent the development of chronic epilepsy. However, our study was conducted on chronically epileptic animals. In these animals, except for TGF- $\beta$ 1, the expression of trophic factors increased only after transplantation of BMMC. This treatment benefits neurological functional outcome previously described by our group (Costa-Ferro et al. 2012; Costa-Ferro et al. 2010; Venturin et al. 2011). Complementing and confirming our work, other groups have utilized stem cells to improve neurological functional outcome in epilepsy (Abdanipour et al. 2011; Long et al. 2012). However, all previous studies focused on survival, migration, and differentiation of stem cells in brain without providing mechanistic insight into how BMMC mediate functional improvement. Our finding in the present study that BMMCs induce increased production of trophic factors in the treated brain is a significant step toward understanding their mechanism of action for translation to the clinic. BMMCs can be readily obtained from a small volume of bone marrow from the patient's own iliac crest and provide an easily accessible and

replenishable source of autologous cells for transplantation. These cells may provide a continuous source of vital growth factors for repair and plasticity of injured brain. In this light, the results of this study furnish further data about the potential benefit of these agents as well as provide insight into the mechanism by which BMMCs improve functional outcome in chronic epileptic rats. These data suggest that BMMCs may constitute an abundant and accessible brain cellular and molecular reservoir of an array of trophic factors for the repair and plasticity of the epileptic brain.

### **Acknowledgments**

This work was supported by research grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS; PQG-11/1546-1 to J.C.C., and ARD-11/1678-0 to F.S.); The authors fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) or Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We acknowledge the help of Dr. Denise Cantarelli Machado for their support in bone marrow mononuclear cell processing.

### **DISCLOSURE STATEMENT**

The authors have no conflict of interest to declare.

### **ROLE OF THE FUNDING SOURCES**

Funding sources did not have any role in study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit this study for publication.

## REFERENCES

1. Abdanipour, A., Tiraihi, T., and Mirnajafi-Zadeh, J., 2011. Improvement of the pilocarpine epilepsy model in rat using bone marrow stromal cell therapy. *Neurol Res* 33, 625-632.
2. Aronica, E., van Vliet, E. A., Mayboroda, O. A., Troost, D., da Silva, F. H., and Gorter, J. A., 2000. Upregulation of metabotropic glutamate receptor subtype mGluR3 and mGluR5 in reactive astrocytes in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci* 12, 2333-2344.
3. Bao, X., Wei, J., Feng, M., Lu, S., Li, G., Dou, W., Ma, W., Ma, S., An, Y., Qin, C., Zhao, R. C., and Wang, R., 2011. Transplantation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes behavioral recovery and endogenous neurogenesis after cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 1367, 103-113.
4. Beck, T., Lindholm, D., Castren, E., and Wree, A., 1994. Brain-derived neurotrophic factor protects against ischemic cell damage in rat hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 14, 689-692.
5. Binder, D. K., Croll, S. D., Gall, C. M., and Scharfman, H. E., 2001. BDNF and epilepsy: too much of a good thing? *Trends Neurosci* 24, 47-53.
6. Bovolenta, R., Zucchini, S., Paradiso, B., Rodi, D., Merigo, F., Navarro Mora, G., Osculati, F., Berto, E., Marconi, P., Marzola, A., Fabene, P. F., and Simonato, M., 2010. Hippocampal FGF-2 and BDNF overexpression attenuates epileptogenesis-associated neuroinflammation and reduces spontaneous recurrent seizures. *J Neuroinflammation* 7, 81.
7. Bullock, M. R., Lyeth, B. G., and Muizelaar, J. P., 1999. Current status of neuroprotection trials for traumatic brain injury: lessons from animal models and clinical studies. *Neurosurgery* 45, 207-217; discussion 217-220.
8. Cacheaux, L. P., Ivens, S., David, Y., Lakhter, A. J., Bar-Klein, G., Shapira, M., Heinemann, U., Friedman, A., and Kaufer, D., 2009. Transcriptome profiling reveals TGF-beta signaling involvement in epileptogenesis. *J Neurosci* 29, 8927-8935.
9. Carpentino, J. E., Hartman, N. W., Grabel, L. B., and Naegele, J. R., 2008. Region-specific differentiation of embryonic stem cell-derived neural progenitor transplants into the adult mouse hippocampus following seizures. *J Neurosci Res* 86, 512-524.
10. Cavalheiro, E. A., Leite, J. P., Bortolotto, Z. A., Turski, W. A., Ikonomidou, C., and Turski, L., 1991. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia* 32, 778-782.
11. Chen, X., Katakowski, M., Li, Y., Lu, D., Wang, L., Zhang, L., Chen, J., Xu, Y., Gautam, S., Mahmood, A., and Chopp, M., 2002. Human bone marrow stromal cell cultures conditioned by traumatic brain tissue extracts: growth factor production. *J Neurosci Res* 69, 687-691.
12. Chu, K., Kim, M., Jung, K. H., Jeon, D., Lee, S. T., Kim, J., Jeong, S. W., Kim, S. U., Lee, S. K., Shin, H. S., and Roh, J. K., 2004. Human neural stem cell transplantation reduces spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus in adult rats. *Brain Res* 1023, 213-221.
13. Costa-Ferreira, Z. S., Souza, B. S., Leal, M. M., Kaneto, C. M., Azevedo, C. M., da Silva, I. C., Soares, M. B., Ribeiro-dos-Santos, R., and Dacosta, J. C., 2012. Transplantation of bone marrow mononuclear cells decreases seizure incidence,

- mitigates neuronal loss and modulates pro-inflammatory cytokine production in epileptic rats. *Neurobiol Dis* 46, 302-313.
14. Costa-Ferro, Z. S., Vitola, A. S., Pedroso, M. F., Cunha, F. B., Xavier, L. L., Machado, D. C., Soares, M. B., Ribeiro-dos-Santos, R., and DaCosta, J. C., 2010. Prevention of seizures and reorganization of hippocampal functions by transplantation of bone marrow cells in the acute phase of experimental epilepsy. *Seizure* 19, 84-92.
  15. Croll, S. D., Goodman, J. H., and Scharfman, H. E., 2004. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in seizures: a double-edged sword. *Adv Exp Med Biol* 548, 57-68.
  16. Dudek, F. E., and Sutula, T. P., 2007. Epileptogenesis in the dentate gyrus: a critical perspective. *Prog Brain Res* 163, 755-773.
  17. Guttinger, M., Fedele, D., Koch, P., Padrun, V., Pralong, W. F., Brustle, O., and Boison, D., 2005. Suppression of kindled seizures by paracrine adenosine release from stem cell-derived brain implants. *Epilepsia* 46, 1162-1169.
  18. Hattiangady, B., Rao, M. S., and Shetty, A. K., 2004. Chronic temporal lobe epilepsy is associated with severely declined dentate neurogenesis in the adult hippocampus. *Neurobiol Dis* 17, 473-490.
  19. Hawryluk, G. W., Mothe, A., Wang, J., Wang, S., Tator, C., and Fehlings, M. G., 2012. An in vivo characterization of trophic factor production following neural precursor cell or bone marrow stromal cell transplantation for spinal cord injury. *Stem Cells Dev* 21, 2222-2238.
  20. Hefti, F., and Weiner, W. J., 1986. Nerve growth factor and Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 20, 275-281.
  21. Ivens, S., Kaufer, D., Flores, L. P., Bechmann, I., Zumsteg, D., Tomkins, O., Seiffert, E., Heinemann, U., and Friedman, A., 2007. TGF-beta receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis. *Brain* 130, 535-547.
  22. Jankowsky, J. L., and Patterson, P. H., 2001. The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae. *Prog Neurobiol* 63, 125-149.
  23. Jing, M., Shingo, T., Yasuhara, T., Kondo, A., Morimoto, T., Wang, F., Baba, T., Yuan, W. J., Tajiri, N., Uozumi, T., Murakami, M., Tanabe, M., Miyoshi, Y., Zhao, S., and Date, I., 2009. The combined therapy of intrahippocampal transplantation of adult neural stem cells and intraventricular erythropoietin-infusion ameliorates spontaneous recurrent seizures by suppression of abnormal mossy fiber sprouting. *Brain Res* 1295, 203-217.
  24. Kanter-Schlifke, I., Georgievska, B., Kirik, D., and Kokaia, M., 2007. Seizure suppression by GDNF gene therapy in animal models of epilepsy. *Mol Ther* 15, 1106-1113.
  25. Koyama, R., and Ikegaya, Y., 2005. To BDNF or not to BDNF: that is the epileptic hippocampus. *Neuroscientist* 11, 282-287.
  26. Kromer, L. F., 1987. Nerve growth factor treatment after brain injury prevents neuronal death. *Science* 235, 214-216.
  27. Lahtinen, S., Pitkanen, A., Saarelainen, T., Nissinen, J., Koponen, E., and Castren, E., 2002. Decreased BDNF signalling in transgenic mice reduces epileptogenesis. *Eur J Neurosci* 15, 721-734.
  28. Leite, J. P., Bortolotto, Z. A., and Cavalheiro, E. A., 1990. Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev* 14, 511-517.



29. Li, S., Xu, B., Martin, D., Racine, R. J., and Fahnstock, M., 2002. Glial cell line-derived neurotrophic factor modulates kindling and activation-induced sprouting in hippocampus of adult rats. *Exp Neurol* 178, 49-58.
30. Li, T., Ren, G., Kaplan, D. L., and Boison, D., 2009. Human mesenchymal stem cell grafts engineered to release adenosine reduce chronic seizures in a mouse model of CA3-selective epileptogenesis. *Epilepsy Res* 84, 238-241.
31. Lindsay, R. M., Wiegand, S. J., Altar, C. A., and DiStefano, P. S., 1994. Neurotrophic factors: from molecule to man. *Trends Neurosci* 17, 182-190.
32. Long, Q., Qiu, B., Liu, W., Fei, Z., Feng, G., Wang, P., Zhong, J., Yi, X., Liu, Y., Zhang, Y., and Han, R., 2012. Functional recovery and neuronal regeneration of a rat model of epilepsy by transplantation of Hes1-down regulated bone marrow stromal cells. *Neuroscience* 212, 214-224.
33. Maisano, X., Litvina, E., Tagliatela, S., Aaron, G. B., Grabel, L. B., and Naegele, J. R., 2012. Differentiation and functional incorporation of embryonic stem cell-derived GABAergic interneurons in the dentate gyrus of mice with temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 32, 46-61.
34. Mattson, M. P., Maudsley, S., and Martin, B., 2004. BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 27, 589-594.
35. McCloskey, D. P., Croll, S. D., and Scharfman, H. E., 2005. Depression of synaptic transmission by vascular endothelial growth factor in adult rat hippocampus and evidence for increased efficacy after chronic seizures. *J Neurosci* 25, 8889-8897.
36. Nanobashvili, A., Airaksinen, M. S., Kokaia, M., Rossi, J., Asztely, F., Olofsdotter, K., Mohapel, P., Saarma, M., Lindvall, O., and Kokaia, Z., 2000. Development and persistence of kindling epilepsy are impaired in mice lacking glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor alpha 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12312-12317.
37. Newton, S. S., Collier, E. F., Hunsberger, J., Adams, D., Terwilliger, R., Selvanayagam, E., and Duman, R. S., 2003. Gene profile of electroconvulsive seizures: induction of neurotrophic and angiogenic factors. *J Neurosci* 23, 10841-10851.
38. Nicoletti, J. N., Lenzer, J., Salerni, E. A., Shah, S. K., Elkady, A., Khalid, S., Quinteros, D., Rotella, F., Betancourth, D., and Croll, S. D., 2010. Vascular endothelial growth factor attenuates status epilepticus-induced behavioral impairments in rats. *Epilepsy Behav* 19, 272-277.
39. Paradiso, B., Marconi, P., Zucchini, S., Berto, E., Binaschi, A., Bozac, A., Buzzi, A., Mazzuferi, M., Magri, E., Navarro Mora, G., Rodi, D., Su, T., Volpi, I., Zanetti, L., Marzola, A., Manservigi, R., Fabene, P. F., and Simonato, M., 2009. Localized delivery of fibroblast growth factor-2 and brain-derived neurotrophic factor reduces spontaneous seizures in an epilepsy model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 7191-7196.
40. Pitkanen, A., and Sutula, T. P., 2002. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. *Lancet Neurol* 1, 173-181.
41. Plata-Salaman, C. R., Ilyin, S. E., Turrin, N. P., Gayle, D., Flynn, M. C., Romanovitch, A. E., Kelly, M. E., Bureau, Y., Anisman, H., and McIntyre, D. C., 2000. Kindling modulates the IL-1beta system, TNF-alpha, TGF-beta1, and neuropeptide mRNAs in specific brain regions. *Brain Res Mol Brain Res* 75, 248-258.

42. Racine, R. J., 1972. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32, 281-294.
43. Schmidt-Kastner, R., Humpel, C., Wetmore, C., and Olson, L., 1996. Cellular hybridization for BDNF, trkB, and NGF mRNAs and BDNF-immunoreactivity in rat forebrain after pilocarpine-induced status epilepticus. *Exp Brain Res* 107, 331-347.
44. Shetty, A. K., Zaman, V., and Shetty, G. A., 2003. Hippocampal neurotrophin levels in a kainate model of temporal lobe epilepsy: a lack of correlation between brain-derived neurotrophic factor content and progression of aberrant dentate mossy fiber sprouting. *J Neurochem* 87, 147-159.
45. Simonato, M., Tongiorgi, E., and Kokaia, M., 2006. Angels and demons: neurotrophic factors and epilepsy. *Trends Pharmacol Sci* 27, 631-638.
46. Sofroniew, M. V., Howe, C. L., and Mobley, W. C., 2001. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci* 24, 1217-1281.
47. Tolbert, D. L., Bradley, M. W., Tolod, E. G., Torres-Aleman, I., and Clark, B. R., 2001. Chronic intraventricular infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) rescues some cerebellar Purkinje cells from hereditary degeneration. *Exp Neurol* 170, 375-379.
48. Turski, W. A., Cavalheiro, E. A., Schwarz, M., Czuczwar, S. J., Kleinrok, Z., and Turski, L., 1983. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res* 9, 315-335.
49. Venturin, G. T., Greggio, S., Marinowic, D. R., Zanirati, G., Cammarota, M., Machado, D. C., and DaCosta, J. C., 2011. Bone marrow mononuclear cells reduce seizure frequency and improve cognitive outcome in chronic epileptic rats. *Life Sci* 89, 229-234.
50. Vitkovic, L., Maeda, S., and Sternberg, E., 2001. Anti-inflammatory cytokines: expression and action in the brain. *Neuroimmunomodulation* 9, 295-312.
51. Waldau, B., Hattiangady, B., Kuruba, R., and Shetty, A. K., 2010. Medial ganglionic eminence-derived neural stem cell grafts ease spontaneous seizures and restore GDNF expression in a rat model of chronic temporal lobe epilepsy. *Stem Cells* 28, 1153-1164.
52. Warner-Schmidt, J. L., and Duman, R. S., 2007. VEGF is an essential mediator of the neurogenic and behavioral actions of antidepressants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4647-4652.
53. Yoo, Y. M., Lee, C. J., Lee, U., and Kim, Y. J., 2006. Neuroprotection of adenoviral-vector-mediated GDNF expression against kainic-acid-induced excitotoxicity in the rat hippocampus. *Exp Neurol* 200, 407-417.
54. Zurn, A. D., Baetge, E. E., Hammang, J. P., Tan, S. A., and Aebischer, P., 1994. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), a new neurotrophic factor for motoneurons. *Neuroreport* 6, 113-118.

## Figure legends

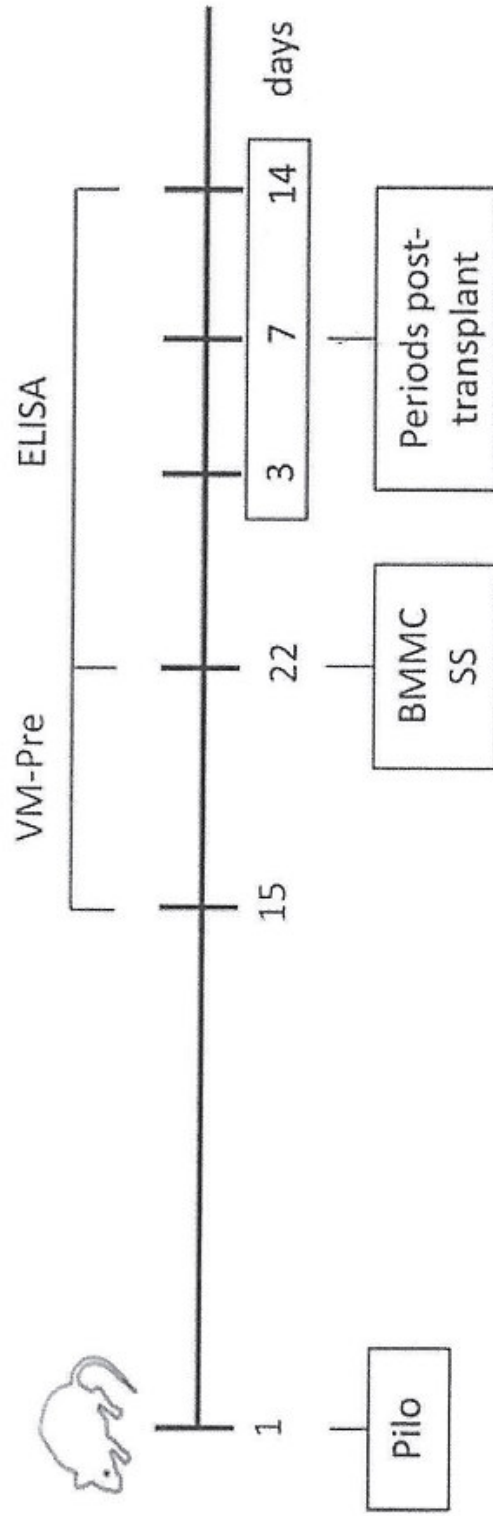
**Figure 1. Experimental procedures.** Pilo: Pilocarpine; VM: video monitoring; BMMC: Bone marrow mononuclear cell; SS: Saline solution.

**Figure 2 - BMMC transplantation increases the expression of BDNF and NGF in the hippocampus of epileptic animals.** The graph A shows the levels of BDNF expressed in  $\text{pg.mg}^{-1}$  tissue, significantly higher in the group evaluated 14 days after transplantation of BMMC in relation to groups Pilo. \*  $p < 0.05$  vs. Pilo. The graph B shows that NGF expression is significantly higher in group 7 days after transplantation BMMC compared to Pilo group. There was no difference between Pilo and Control groups. \*  $p < 0.05$  vs Pilo. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M.,  $n=4$  per group. Tukey's post hoc test after one-way ANOVA.

**Figure 3 - BMMC transplantation increases the expression of GDNF, VEGF and TGF- $\beta$ 1 in the hippocampus of epileptic animals.** The graph C shows that GDNF expression is significantly higher in the groups evaluated at 7 and 14 days after transplantation of BMMC in relation to Pilo group. There was no difference between Pilo and Control groups. \*  $p < 0.05$ . The graph D shows that VEGF expression is significantly higher in the groups evaluated at 7 and 14 days after transplantation of BMMC in relation to Pilo group. Groups Pilo+BMMC 7D and Pilo+BMMC 14D showed higher levels of VEGF than Pilo+BMMC 3D. \*\*\*  $p < 0.001$  vs Pilo; +++  $p < 0.001$  vs Pilo+BMMC 3D. The graph E shows that TGF- $\beta$ 1 expression is significantly reduced in the Pilo+BMMC group evaluated 14 days after transplantation compared to Pilo. The Pilo group showed higher expression of TGF- $\beta$ 1 than the Control group. There a significant difference between in the Pilo+BMMC 3D and Pilo+BMMC 14D, where the Pilo+BMMC 14D presented a significant reduction in TGF- $\beta$ 1 over the

Pilo+BMMC 3D. \*  $p < 0.05$  vs Pilo; ++  $p < 0.01$  vs Pilo+BMMC 3D; #  $p < 0.05$  vs. Control. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M.,  $n=4$  per group. Tukey's post hoc test after one-way ANOVA.

Figure  
Click here to download high resolution image



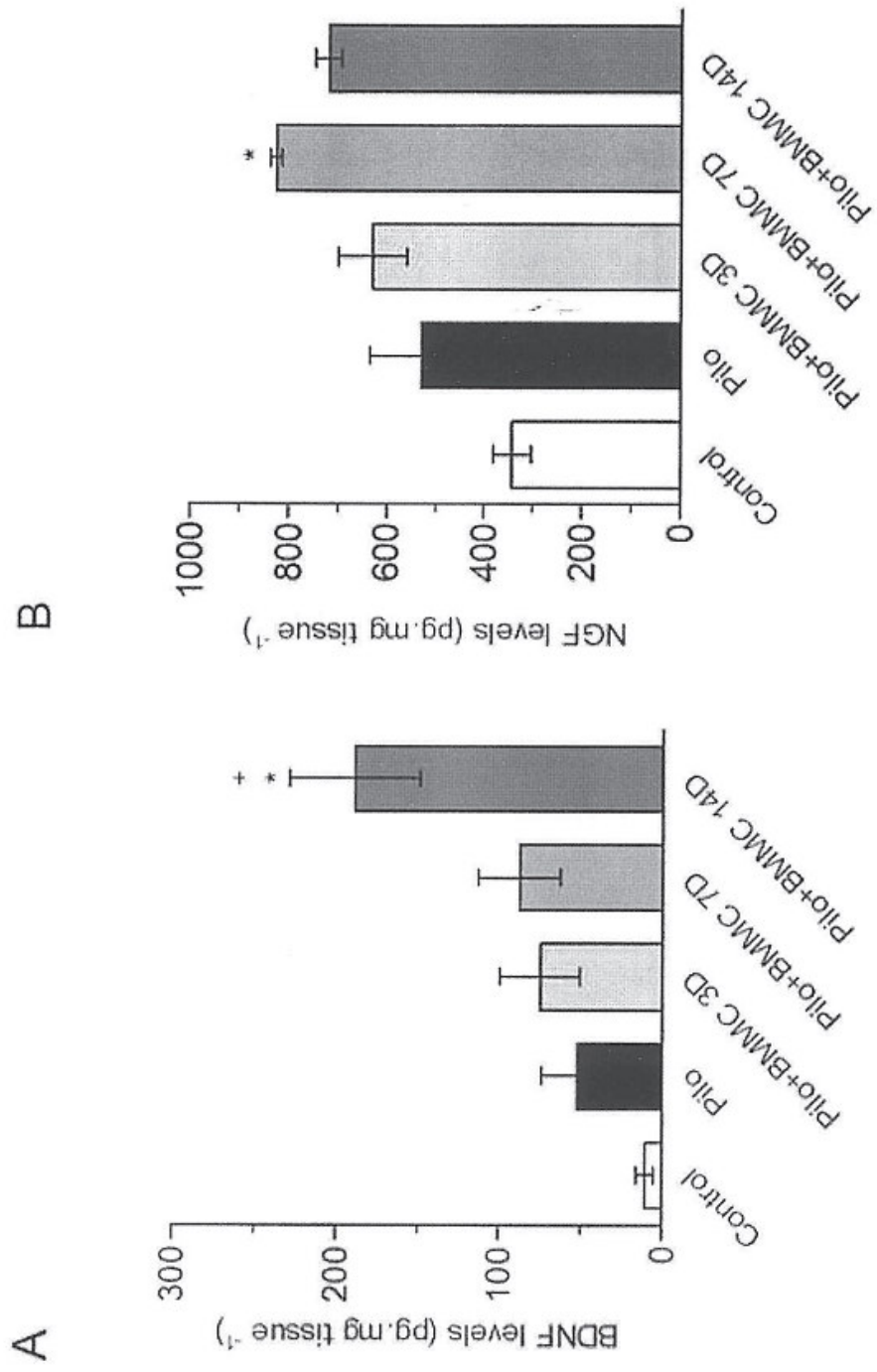


Figure  
Click here to download high resolution image

Figure  
 Click here to download high resolution image

