

**Simone Amaro Alves Romariz**

**Caracterização *in vitro* de precursores neuronais da eminência  
gangliônica medial e avaliação *in vivo* do seu potencial  
anticonvulsivo após transplante em animais epiléticos.**

Tese apresentada à Universidade Federal  
de São Paulo – Escola Paulista de  
Medicina, para obtenção do título de Doutor  
em Ciências

São Paulo  
2016

**Simone Amaro Alves Romariz**

**Caracterização *in vitro* de precursores neuronais da eminência  
gangliônica medial e avaliação *in vivo* do seu potencial  
anticonvulsivo após transplante em animais epiléticos.**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo – Escola  
Paulista de Medicina, para obtenção  
do título de Doutor em Ciências

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Beatriz de Oliveira Monteiro

Co-Orientador: Dr<sup>a</sup>. Gabriela Filoso Barnabé

São Paulo  
2016

Romariz, Simone Amaro Alves

**Caracterização *in vitro* de precursores neuronais da eminência gangliônica medial e avaliação *in vivo* do seu potencial anticonvulsivo após transplante em animais epilépticos.** / Simone Amaro Alves Romariz. -

- São Paulo, 2016.

xvii, 117 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Neurologia/Neurociência.

Título em inglês: *In vitro* characterization of neuronal precursors of the medial ganglionic eminence and *in vivo* evaluation of his anticonvulsant potential after transplantation in epileptic animals.

1. Epilepsia. 2. Neuroesferas. 3. Inibição Neural. 4. Células-Tronco Neurais. 5. Transplante de Células. 6. Ratos.

**Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina  
Departamento de Fisiologia**

Chefe do Departamento:  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliane Beraldi Ribeiro

Coordenador do programa de pós – graduação:  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Célia Harumi Tengan

**Simone Amaro Alves Romariz**

**Caracterização *in vitro* de precursores neuronais da eminência  
gangliônica medial e avaliação *in vivo* do seu potencial  
anticonvulsivo após transplante em animais epiléticos.**

Presidente da Banca

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Beatriz de Oliveira Monteiro

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luiz Eugênio de Araújo Mello

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Elisa Calcagnotto

Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Angela Cristina do Valle

Prof. Dr. Gabriel Maisonnave Arisi

Suplente:

Prof. Dr. Ricardo Mario Arida

Prof. Dr. Alexandre Hiroaki Kihara

Esta tese foi realizada na disciplina de Neurofisiologia e Fisiologia do Exercício do departamento de Fisiologia da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina durante o curso de Pós-graduação de Neurologia/ Neurociência, com auxílio financeiro da (o) CAPES, CNPq e FAPESP. A aluna foi bolsista FAPESP.

## **Dedicatória**

Dedico esta tese aos meus pais Angela e Waldir, por todos os ensinamentos, dedicação, incentivo, amor e exemplos dados ao longo da minha vida.

## **Agradeço**

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Beatriz de Oliveira Monteiro (Bia), minha querida orientadora, por ter acreditado em mim desde o início, pela oportunidade e apoio para a realização do doutorado. Você foi fundamental na minha trajetória acadêmica, uma mãe científica que investiu no meu crescimento, me incentivou a prosseguir na pesquisa, me orientou dando o seu melhor, respondendo prontamente minhas dúvidas e me ensinando muitas coisas. Obrigada por tudo e por ser uma grande amiga com quem compartilhei e vivi ótimos momentos durante todos esses anos !

## **Agradecimentos**

Ao meu marido Felipe pela paciência, companheirismo, amor, carinho e respeito..... Por tudo que passamos nesses anos juntos.

A todos da minha família, meus pais e amigos

A Gabi minha grande amiga e co-orientadora que me ensinou muitas coisas, sempre com um incentivo e boas sugestões. Presente desde a elaboração do projeto, contribuindo muito para elaboração dessa tese. Obrigada pelas conversas, desabafos e co-orientação!

A Daisy que esteve ao meu lado durante todo meu doutorado ajudando com os experimentos, com as dúvidas, dando sugestões e dividindo os momentos bons e ruins, se tornando uma grande amiga.

A todos os meus amigos e colegas do laboratório: Thaisinha, Diego, Guto, Deborah, Nilma, Miguel, Edivando, Yuri, Renan, André, Wu, Prof<sup>a</sup> Luciene, Bia Amorim, Cris Amaral, Helen, Chris, nossa mais nova técnica, e a Roseli, a melhor secretaria da Unifesp. Obrigada pelas boas conversas, por compartilhar um ambiente agradável e pelo aprendizado de muitas coisas.

A Prof<sup>a</sup> Marimélia e ao Prof Luiz Eugênio, por permitir o uso do laboratório, principalmente da sala de cultura, e a todos os seus alunos: Vando, Deborah, Renato, Douglas, Fernando, Natália, Patrícia, Michelle, Alessandro, em especial a Layla, Mayara e Marcella, que se tornaram minhas grandes amigas, pela maneira como vocês me acolheram e pela ajuda com os experimentos.

A Prof<sup>a</sup> Maria Elisa, uma ótima pesquisadora e amiga, que me recebeu em seu laboratório e ajudou com ensinamentos de eletrofisiologia.

Ao Prof Gus Schoorlemmer pela grande ajuda com os registros e análises de EEG e a Andréa Choi pela ajuda na confecção dos eletrodos.

Ao Emanuel pela ajuda nos acasalamentos e manutenção da colônia dos animais GFPs, assim como, a Darcy que me ajudou com a genotipagem dos mesmos.

Aos Bioteristas Emanuel, Wilton e Claudinei pela ajuda no cuidado com os animais.

As meninas da faxina Edilza, Irene e Tina, pela grande ajuda com a limpeza da vidraria e por proporcionar um ambiente limpo.

A Universidade Federal de São Paulo / EPM

A FAPESP pelo auxílio financeiro

## Sumário

<b>Dedicatória</b> .....	<b>vi</b>
<b>Agradecimentos</b> .....	<b>viii</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>xi</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>xii</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>xiv</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xvi</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1 Epilepsia. ....	1
1.1.1. História e conceitos. ....	1
1.1.2. Epilepsia do Lobo Temporal Mesial. ....	3
1.1.3. Formação hipocampal e desequilíbrio excitação/inibição na ELTM. ....	6
1.1.4. Epilepsia do Lobo Temporal – Modelo Experimental da Pilocarpina .....	10
1.2. Células-tronco e terapias celulares.....	12
1.2.1. Células-tronco .....	12
1.2.2. Células-tronco neurais .....	14
1.2.3. Eminência Gangliônica Medial .....	15
1.2.4. Neuroesferas .....	18
1.2.5. Aplicação de terapias celulares em Epilepsia do Lobo Temporal .....	24
<b>2. Justificativa e Hipótese</b> .....	<b>28</b>
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>30</b>
3.1. Objetivos específicos .....	30
<b>4. Materiais e Métodos</b> .....	<b>31</b>
4.1. Grupos experimentais.....	31
4.2. Animais .....	32
4.3. Cultura de neuroesferas .....	33
4.4. Fixação e imunofluorescência de neuroesferas.....	35
4.5. Citometria de fluxo .....	36
4.6. Diferenciação e imunofluorescência de neuroesferas .....	37
4.7. RT e PCR em tempo real.....	37
4.8. Grupos experimentais.....	40
4.9. Modelo de indução de epilepsia – administração de pilocarpina .....	41
4.10. Procedimento cirúrgico para injeção intra-hipocampal de células precursoras neurais.....	42
4.11. Análise de frequência de crises epilépticas espontâneas e recorrentes.....	43
4.12. Implantação de eletrodos.....	44

4.13. Eletroencefalograma (EEG).....	44
4.14. Imunofluorescência.....	45
4.15. Análises estatísticas .....	46
<b>5. Resultados .....</b>	<b>47</b>
5.1. <i>IN VITRO</i> .....	47
5.1.1. Avaliação do tamanho das neuroesferas da EGM cultivadas nas quatro diferentes condições de cultura.....	47
5.1.2. Avaliação dos tipos celulares presentes em neuroesferas da EGM cultivadas em diferentes condições de cultura.....	49
5.1.3. Análise da expressão relativa dos genes Dlx1, Lhx6 e Nkx2.1 em neuroesferas oriundas da EGM cultivadas nas quatro diferentes condições de cultura. ....	54
5.1.4. Investigação da população neuronal de células de neuroesferas após diferenciação.....	57
5.2. <i>IN VIVO</i> .....	60
5.2.1. Avaliação das crises epiléticas crônicas após transplante.....	60
5.2.2 Análise fenotípica das células transplantadas no hipocampo de animais epiléticos. ....	70
<b>6. Discussão .....</b>	<b>78</b>
<b>7. Conclusões .....</b>	<b>94</b>
<b>9. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>96</b>
<b>8. Anexos .....</b>	<b>118</b>

## Lista de Figuras

Figura 1. Esquema dos eventos epileptogênicos	6
Figura 2. Esquema da circuitaria tri-sináptica do hipocampo	8
Figura 3. Eminências durante o desenvolvimento	18
Figura 4. Formação de Neuroesferas	20
Figura 5. Desenho experimental 1	32
Figura 6. Dissecação da EGM	35
Figura 7. Desenho experimental 2	41
Figura 8. Escala de Racine	43
Figura 9. Tamanho das neuroesferas	48
Figura 10. Citometria e Imunofluorescência para o marcador $\beta$ -tubulina III	51
Figura 11. Citometria e Imunofluorescência para o marcador GFAP	52
Figura 12. Citometria e Imunofluorescência para o marcador Nestina	53
Figura 13. Expressão relativa dos genes Dlx1, Nkx2.1 e Lhx6	56
Figura 14. Porcentagem de neurônios diferenciados	59
Figura 15. Incidência e variabilidade das CER	62
Figura 16. Categorização das CER	63
Figura 17. Frequência e duração das crises	65
Figura 18. Evolução Temporal da Frequência de CER	66
Figura 19. Padrão dos registros e frequência de crises registradas por EEG	68
Figura 20. Número de Células GFP <sup>+</sup>	71
Figura 21. Imunofluorescência das células transplantadas	73
Figura 22. Porcentagens de interneurônios inibitórios e astrócitos	77

## Lista de Abreviaturas

AR	Ácido Retinóico
CA	Corno de Ammon
CAR	Carenciadas
CB	Calbindina
CCK	Colecistoquinina
CR	Calretinina
CER	Crises Espontâneas Recorrentes
DMEM-F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dlx1	<i>Distal-less homeobox 1</i>
DAPI	<i>4'-6-Diamidino-2-phenylindole</i>
EEG	Eletroencefalográfico
EGC	Eminência Gangliônica Caudal
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGL	Eminência Gangliônica Lateral
EG	Eminência Gangliônica
EGM	Eminência Gangliônica Medial
ELT	Epilepsia do Lobo Temporal
ELTM	Epilepsia do Lobo Temporal Mesial
FAT	Fatores
FGF-2	<i>Fibroblast Growth Factor-2</i>
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GAD	Ácido glutâmico descarboxilase
GD	Giro Denteado
GDNF	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i>
IBE	Bureau Internacional de Epilepsia
iPSC	<i>Induced Pluripotent Stem Cell</i>
Lhx6	LIM homeobox 6

Nkx2.1	NK2 homeobox 1
NPY	Neuropeptídeo Y
PILO	Pilocarpina
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PoGD	Polimorfa do giro denteado
PSA	Penicilina-Estreptomicina-Anfotericina
PTZ	Pentilenotetrazol
PV	Parvalbumina
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Transcriptase reversa
SAL	Salina
SE	<i>Status Epilepticus</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SHH	Sonic Hedgehog
SST	Somatostatina
VIP	Peptídeo Intestinal Vasoativo
ZSG	Zona Subgranular
ZSV	Zona Subventricular

## Resumo

Na epilepsia, crises epilépticas espontâneas e recorrentes se desenvolvem a partir de disparos neuronais contínuos e de alta frequência que podem ser gerados por uma disfunção sináptica inibitória. Portanto, as consequências da perda ou disfunção de interneurônios GABAérgicos no desenvolvimento do quadro epiléptico são importantes. Os interneurônios inibitórios se originam na região do telencéfalo conhecida como eminência gangliônica medial (EGM). Células progenitoras da EGM têm a capacidade de migrar e se diferenciar em interneurônios inibitórios GABAérgicos, modificando o tônus inibitório quando transplantadas no cérebro do hospedeiro. Assim, o transplante de células progenitoras derivadas da EGM pode modificar a circuitaria neuronal em disfunções neurológicas onde há alteração da função inibitória, como na epilepsia. No entanto, o transplante de células da EGM requer uma grande quantidade de células fetais, esbarrando em questões éticas. A expansão *in vitro* desses progenitores em neuroesferas pode ser uma alternativa para a aplicação terapêutica das células da EGM em maior escala.

Nosso objetivo foi comparar diferentes condições de cultivo de neuroesferas derivadas da EGM quanto ao padrão de diferenciação neuronal e expressão de genes presentes na EGM *in vitro* e, avaliar *in vivo* após transplante em animais adultos no período epileptogênico, o potencial anticonvulsivo e de diferenciação em interneurônios inibitórios de células oriundas da EGM cultivadas ou não como neuroesferas.

Os resultados *in vitro* mostraram que a remoção dos fatores de crescimento EGF e FGF2, bem como a adição de ácido retinóico ao meio de cultivo de neuroesferas oriundas da EGM aumentam a proporção de neurônios e a expressão de genes relacionados à especificação celular de interneurônios inibitórios nas neuroesferas, comparado à condição padrão de cultura. Os resultados *in vivo* indicam que as células derivadas da EGM que não foram cultivadas como neuroesferas originam mais interneurônios inibitórios e apresentam um efeito anticonvulsivo mais eficaz quando comparadas com células da EGM cultivadas como neuroesferas, independente das modificações realizadas no meio de cultivo. Dentre as células da EGM cultivadas como neuroesferas, as que foram cultivadas na presença de fatores de crescimento reduziram a frequência de crises do tipo IV e se diferenciaram, preferencialmente, em astrócitos.

Concluimos que os precursores neuronais oriundos da região da EGM apresentam um potencial anticonvulsivo e que a técnica de expansão dessas células em neuroesferas, mesmo com as modificações no meio de cultivo, não favoreceu o aumento de interneurônios inibitórios após transplante em animais epiléticos. Apesar disso, as células cultivadas como neuroesferas na condição padrão se diferenciaram em astrócitos após o transplante, um tipo celular que pode ser importante no controle das crises espontâneas e recorrentes devido a possíveis mecanismos de redução de crises que devem ser melhor investigados.

Palavras chave: progenitores neurais, interneurônios inibitórios, transplante, eminência gangliônica medial, GABA, epilepsia, neuroesferas.

## Abstract

In epilepsy, spontaneous recurrent seizures develop from continuous and high frequency neuronal discharges that can be generated by a surrounding inhibitory synaptic dysfunction. Therefore, the consequences of loss or dysfunction of GABAergic interneurons are important aspects in the development of epileptic condition. The inhibitory interneurons originate in the telencephalon known as medial ganglionic eminence (MGE). Progenitor cells from MGE have the ability to migrate and differentiate into GABAergic inhibitory interneurons, modifying the inhibitory tonus when transplanted into the host brain. Thus, the transplantation of progenitor cells derived from MGE can modify the neuronal circuitry in neurological disorders in which inhibitory dysfunction is present, such as in epilepsy. However, the transplant of MGE cells requires a large amount of fetal cells, bumping into ethical issues. The *in vitro* expansion of these progenitors grown as neurospheres can be an alternative for therapeutic applications of MGE cells in larger scale.

Our goal was to compare *in vitro* different culture conditions of neurospheres from MGE regarding the pattern of neuronal differentiation and gene expression present in MGE cells, and evaluate *in vivo*, after transplantation into epileptic animals, the anticonvulsant effect and differentiation into inhibitory interneurons of MGE cells grown as neurospheres or freshly obtained.

*In vitro* results showed that the withdrawal of growth factors EGF and FGF2, as well as the addition of retinoic acid in the culture medium of MGE neurospheres increase the proportion of neurons and expression of genes related to cell specification of inhibitory interneurons in neurospheres, compared to the standard condition of culture. *In vivo* results indicate that MGE cells not grown as neurospheres originate more inhibitory interneurons and present a potently anticonvulsant effect when compared with MGE cells cultured as neurospheres, regardless the changes in culture medium. Among the MGE cells cultured as neurospheres, the cells that were cultured in the presence of growth factors have reduced the type IV seizures and differentiated preferably in astrocytes.

We conclude that neural progenitors derived from the EGM region present an anticonvulsive potential and that neurosphere technique, regardless changes in the culture medium, did not provide the increase of inhibitory interneurons after transplantation in epileptic animals. Nevertheless, cells grown as neurospheres in the

standard condition differentiated into astrocytes after transplantation, a cell type that may be important in the control of spontaneous and recurrent seizures due to possible reduction mechanisms of seizures that to be better investigated.

Keywords: interneuronal progenitors, transplantation, medial ganglionic eminence, GABA, epilepsy, neurospheres

# 1. Introdução

## 1.1 Epilepsia.

### 1.1.1. História e conceitos.

A epilepsia é um dos distúrbios que acometem o sistema nervoso central (SNC), conhecido pelos povos da antiguidade como uma doença causada por deuses e demônios, sendo assim passíveis de cura através de orações, súplicas e rituais de exorcismo que eram os fundamentos dos atos médicos (Masia & Devinsky, 2000; Niedermeyer, 1990). Com o passar dos anos, foi confirmado por Hipócrates que o cérebro era responsável por esse distúrbio, no entanto, as crenças em torno da epilepsia como possessão, maldição ou castigo perpetuaram-se por muito tempo (Niedermeyer, 1990). Assim como a loucura, a epilepsia foi estigmatizada, imprimindo marcas que persistem até os dias de hoje e em decorrência disso, muitos portadores podem ser vítimas de preconceito, fato que colabora para que muitas pessoas tornem-se resistentes em admitir o diagnóstico ou consentir em iniciar um tratamento adequado (Kandel et al., 2003).

No século XVIII, com o surgimento da disciplina de neurologia, Samuel-Auguste Tissot (1728-1797) escreveu o Tratado da Epilepsia, no qual descreveu diferentes tipos de crises e síndromes (Masia & Devinsky, 2000; Niedermeyer, 1990). John Hughlings Jackson iniciou as análises modernas da epilepsia, por meio de observações clínicas e anatômicas, demonstrando que a disfunção era causada por uma descarga anormal das células nervosas, associada a sintomas focais, e reconhecida como crises parciais focais (Kandel et al., 2003). No entanto, foi em 1930 que a investigação científica sobre as epilepsias consolidou-se, após o desenvolvimento do registro eletroencefalográfico (EEG) por Hans Berger, confirmando a natureza das crises epiléticas como uma atividade paroxística e anormal dos neurônios (Delgado-Escueta et al., 1986).

Na década de 80 foi introduzido o termo “síndrome epilética”. Mas a partir da heterogeneidade da epilepsia, o termo “distúrbio” foi sugerido e utilizado em classificações da *International League Against Epilepsy* (ILAE), no âmbito científico e social (Detolado et al., 2003; Fisher et al., 2005). Apesar de ser referida tradicionalmente como um distúrbio ou uma família de distúrbios, a ILAE e o Bureau

Internacional de Epilepsia (IBE) acordaram recentemente que a epilepsia é considerada uma doença, pois o distúrbio implica uma perturbação funcional, não necessariamente duradoura, enquanto o termo doença pode sugerir um desarranjo mais durador da função normal. Muitos problemas de saúde heterogêneos, como o câncer ou diabetes, compreendem numerosas desordens e ainda são considerados doenças, além disso, o termo distúrbio é mal compreendido pelo público e pode minimizar a gravidade da epilepsia (Fisher et al., 2014).

A epilepsia tem como principal característica a manifestação de crises epiléticas espontâneas e recorrentes que se desenvolvem a partir de disparos anormais e síncronos de neurônios em certas áreas do sistema nervoso central (Engel & Pedley, 1997). Em 2005, a ILAE definiu a epilepsia como “um distúrbio cerebral causado por predisposição persistente do cérebro a gerar crises epiléticas recorrentes e pelas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicossociais e sociais da condição caracterizada pela ocorrência de pelo menos uma crise epilética” (Berg & Scheffer, 2011). Já o termo crise epilética pode ser descrito como “sinal e/ou sintoma transitório causado por atividade anormal excessiva ou síncrona de neurônios cerebrais” (Berg & Scheffer, 2011).

As crises epiléticas inicialmente foram classificadas em duas categorias: parcial e generalizada, mas, de acordo com o Relatório da Comissão da ILAE de Classificação e Terminologia de 2005, passamos a ter três tipos de classificações para crises epiléticas: as crises generalizadas, as crises focais e as crises desconhecidas. As crises focais originam-se dentro de redes limitadas a um hemisfério, de acordo com uma ou mais características, sendo elas: motora, autonômica e cognitiva. Ainda, a crise focal pode evoluir para uma crise convulsiva bilateral, denominada de tônico-clônica secundariamente generalizada. As crises generalizadas são definidas como originárias em algum ponto dentro de, e rapidamente envolvendo, redes distribuídas bilateralmente, podendo ser assimétricas e dos tipos tônico-clônica, ausência, clônica, tônica, atônica e mioclônica. As crises desconhecidas são aquelas que não possuem evidências para classificá-las como focais, generalizadas ou ambas (Berg & Scheffer, 2011; Guilhoto, 2011).

Recentemente, na prática clínica foram incluídos novos critérios para o diagnóstico e definição de epilepsia. São eles: 1) duas crises epiléticas

espontâneas que ocorram separadamente em um período maior que 24h; 2) uma crise espontânea, com alta probabilidade (por risco conhecido) de ocorrência de outra crise não provocada em um período de 10 anos; 3) diagnóstico de síndrome epiléptica. Por outro lado, devemos considerar que a epilepsia não está mais presente em pacientes que tiveram epilepsia dependente da idade e que já ultrapassaram a idade em que as crises ocorrem habitualmente, ou em caso de pacientes que permaneceram sem crises por pelo menos 10 anos e sem medicamento anti-convulsivo nos últimos 5 anos (Fisher, 2015; Fisher et al., 2014).

Dados epidemiológicos indicam que a epilepsia é um dos distúrbios neurológicos mais frequentes, apresentando uma incidência de aproximadamente 1% nos países mais desenvolvidos, subindo para 2% em países com menos recursos socioeconômicos devido à desnutrição, enfermidades infecciosas e ao insuficiente atendimento médico-hospitalar, acometendo, na maioria das vezes, crianças e idosos (Liga Brasileira de Epilepsia, 2011). Diante disso, o impacto socioeconômico da epilepsia se tornou assunto relevante, pois envolve altos custos relacionados ao tratamento com drogas antiepilépticas e hospitalização, além de custos indiretos como, pensões, desemprego, dias de trabalho perdidos, entre outros custos sociais.

### **1.1.2. Epilepsia do Lobo Temporal Mesial.**

A Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) é responsável por 40% de todos os casos de epilepsia parcial na população adulta, sendo esta a forma mais comum dentre os diversos tipos de epilepsia. A ELT pode ser dividida de acordo com a origem e semiologia das crises, sendo ela mesial, neocortical ou lateral (Engel & Pedley, 1997; Gastaut et al., 1975).

A epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM) corresponde a aproximadamente 60% dos casos de ELT (Engel & Pedley, 1997) e seu diagnóstico se baseia em exames de neuroimagem, eletroencefalografia e no quadro clínico, caracterizado por auras e crises parciais simples ou complexas, que se originam em estruturas mesiais do lobo temporal. As crises parciais, também chamadas crises focais, se originam dentro de redes limitadas a um hemisfério, caracterizadas de acordo com uma ou mais características, sendo elas: motora, autonômica e discognitiva. Os tipos de

crises parciais complexas são basicamente os mesmos tipos de crises parciais simples, a grande diferença é que as crises parciais complexas são acompanhadas por perturbação da consciência. Ainda, as crises focais podem evoluir para uma crise convulsiva bilateral, denominada como tônico-clônicas secundariamente generalizadas. Uma característica importante do quadro clínico da ELTM é que durante os primeiros estágios do período crônico as crises espontâneas são mais propensas a serem controladas com medicação, mas com a progressão da doença as crises podem se tornar intratáveis (Cardoso et al., 2006; Wieser, 2004). Portanto, aproximadamente um terço dos pacientes com ELTM apresentam resistência farmacológica e sofrem com esse tipo de epilepsia refratária (Engel, 2001; Kwan et al., 2010). Nestes casos, os pacientes podem ser tratados cirurgicamente, uma estratégia mais eficaz no controle das crises, com resultados superiores ao tratamento clínico (Engel et al., 2012; Guerreiro, 2012). Porém, pacientes submetidos à cirurgia como a hipocampectomia podem apresentar outros *déficits* neurológicos (Berg et al., 2003; De Araujo Filho et al., 2012).

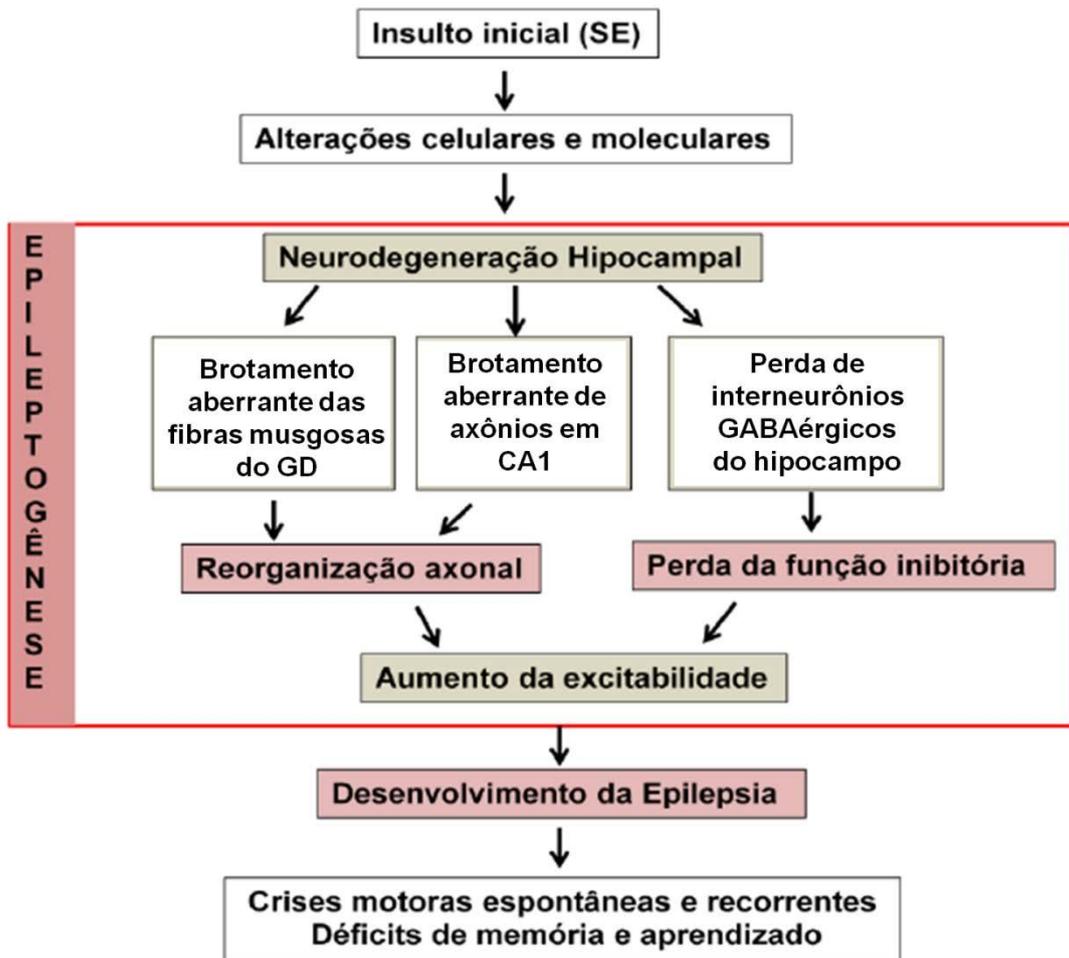
Na maioria dos pacientes, a ELTM parece ser o resultado de um insulto inicial causado por um trauma, encefalite, uma crise febril ou *status epilepticus* (SE) (Duncan et al., 2006; Sharma et al., 2007). No entanto, o tempo exato para as crises espontâneas surgirem é desconhecido, mas suspeita-se que após um primeiro insulto há um estado pré-epiléptico que transforma um cérebro normal em um cérebro epiléptico. Em muitos casos, após uma lesão cerebral, os pacientes se recuperam e podem permanecer anos sem apresentar crises epilépticas espontâneas e recorrentes. O período que precede o aparecimento dessas crises é conhecido como período latente ou silencioso (O'dell et al., 2012; Sharma et al., 2007).

O período latente é extremamente crítico para o desenvolvimento da ELTM, pois é quando se inicia o processo de epileptogênese, sugerindo que a epilepsia não é um resultado imediato da lesão cerebral, mas que envolve uma cascata de eventos epileptogênicos secundários (Chang & Lowenstein, 2003; GIBLIN & Blumenfeld, 2010; Rakhade & Jensen, 2009). O termo epileptogênese refere-se à transformação da rede neuronal normal em um estado hiperexcitável de longa duração que gera crises espontâneas e recorrentes (CER) (Figura 1). Nesse sentido, considerando a lesão inicial como o gatilho de processos secundários importantes, o

cérebro torna-se epiléptico por um processo que ocorre lentamente. Assim, as estratégias anti-epileptogênicas devem focar nos mecanismos secundários tardios que se desenvolvem algum tempo após a lesão inicial (Jiao & Nadler, 2007; Tauck & Nadler, 1985). Diante disso, o período latente pode indicar uma janela terapêutica eficaz para a prevenção da epileptogênese e o subsequente desenvolvimento de CER (Pitkanen, 2004).

A esclerose hipocampal, principal característica anatomopatológica da ELTM, é parte de um conjunto de alterações que ocorrem durante a epileptogênese e está presente em aproximadamente 60% dos pacientes, sendo o hipocampo a estrutura mais afetada (Acharya et al., 2008; French et al., 1993). O hipocampo epiléptico apresenta um padrão estereotipado, caracterizado por perda neuronal, dispersão das células granulares do giro denteado e intensa astrogliose fibrilar, que confere um aspecto esclerótico ao hipocampo (Caboclo et al., 2012; Thom, 2014). Além disso, podemos observar uma reorganização axonal, caracterizada por brotamentos de colaterais de axônios das células granulares (as fibras musgosas) na região da camada molecular interna do giro denteado (Andrade-Valenca et al., 2008; Brenneke et al., 2004; Hanaya et al., 2010; Tauck & Nadler, 1985). A perda celular hipocampal é observada em 60-70% dos espécimes cirúrgicos obtidos de pacientes submetidos à cirurgia para tratamento de epilepsia refratária (Babb et al., 1991; Chakir et al., 2006; Jardim et al., 2012), e envolve subpopulações específicas de neurônios excitatórios e inibitórios. Os principais neurônios do Corno de Ammon (CA) 1, CA3 e do hilo do giro denteado são intensamente afetados na maioria dos pacientes, apresentando neurodegeneração significativa (Nobili et al., 2015; Sloviter, 2005; Thom et al., 2009), enquanto as células piramidais de CA2 e as granulares da camada granular permanecem mais preservadas. Ainda, a perda neuronal pode ser observada em interneurônios hilares que expressam somatostatina (SST), neuropeptídeo Y (NPY), parvalbumina (PV) e calretinina (CR)(Andre et al., 2001; Chen et al., 2010; Mathern et al., 1995; Zhu et al., 1997). Diante disso, é de extrema importância o entendimento funcional e morfológico do hipocampo.

**Figura 1. Esquema dos eventos epileptogênicos.**



**Figura 1. Esquema dos eventos epileptogênicos.** Esquema dos principais eventos envolvidos na epileptogênese, período que se inicia após um insulto inicial (SE), evoluindo para o surgimento das crises espontâneas e recorrentes. Modificada de (Acharya et al., 2008).

### **1.1.3. Formação hipocampal e desequilíbrio excitação/inibição na ELTM.**

O hipocampo tem um papel central na epileptogênese, por isso abordaremos brevemente algumas características anatômicas, assim como as principais vias presentes nessa região.

Do ponto de vista anatômico, a formação hipocampal compreende quatro regiões: giro denteado (GD), Corno de Ammon (CA), complexo subicular, subdividido em subículo, para-subículo e pré-subículo; e por último o córtex entorrinal.

O termo hipocampo propriamente dito geralmente é utilizado para descrever duas regiões da formação hipocampal: o GD e o CA, este último com três subcampos: CA1, CA2 e CA3. A região superior da estrutura é chamada de CA1, a inferior de CA3 e entre elas a pequena área CA2. O principal tipo celular dessa região é o neurônio piramidal, que constituía camada piramidal de CA1, CA2 e CA3 (Kandel et al., 2003).

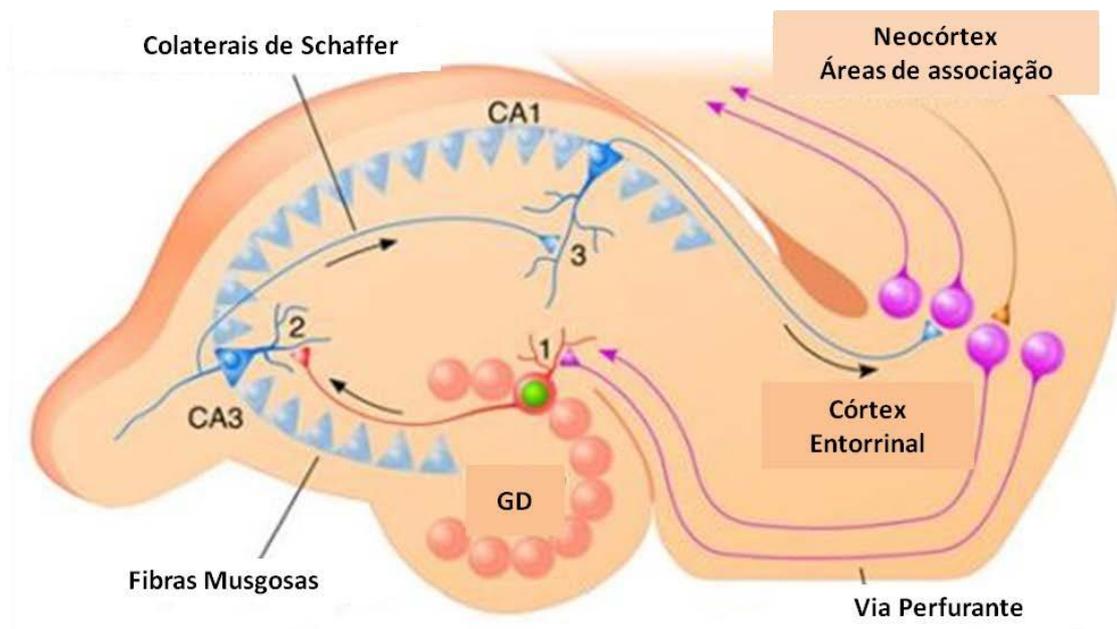
O GD é dividido em três camadas: molecular, granular e hilo ou região polimorfa do giro denteado (PoDG), chamado assim pela variedade morfológica de suas células que, entre outros tipos, contém as células musgosas. A camada granular é constituída predominantemente por células granulares. Os mais importantes interneurônios deste complexo são as células em cesto, consideradas de influência inibitória. A camada das células granulares faz limite, de um lado, com a camada polimorfa (hilo), e de outro, com as camadas moleculares interna e externa, onde estão localizados os dendritos das células granulares. A camada molecular interna é também conhecida como camada supragranular do GD (Andersen et al., 2007).

O subículo representa a transição do córtex de três camadas do hipocampo (molecular, piramidal e polimorfa) e do GD (molecular, piramidal e polimorfa) para o córtex de seis camadas da área entorrinal do giro-parahipocampal. Diferenças citoarquitetônicas permitiram dividir essa estrutura em para-subículo, pré-subículo e subículo propriamente dito. O córtex entorrinal, que nos roedores é dividido em regiões medial e lateral, constitui a aferência mais importante para o hipocampo e GD por fibras que constituem a via perfurante (Andersen et al., 2007).

A circuitaria básica do hipocampo pode ser tradicionalmente descrita em termos de um circuito tri-sináptico (Figura 2). As fibras perfurantes fazem a primeira sinapse com as células granulares, localizadas no giro denteado. Os axônios das células granulares, conhecidos como fibras musgosas, fazem sinapse com as células piramidais de CA3, que, por sua vez, através de suas projeções alcançam as células piramidais do CA1 por vias eferentes, formando o sistema colateral de Schaffer. Essas três sinapses definem a via tri-sináptica e utilizam o glutamato como principal neurotransmissor. As células da região CA1 enviam projeções para fora do hipocampo através do complexo subicular de onde seguem para outras áreas. No hilo, as células musgosas que são inervadas pelas fibras musgosas, se conectam

com as células em cesto e estas, por sua vez, com as células granulares, estabelecendo um circuito recorrente inibitório com estas últimas (Danglot et al., 2006). Além da via tri-sináptica, temos uma importante via monossináptica na formação hipocampal denominada via temporoamônica, constituída de projeções axonais de neurônios do córtex entorrinal para o complexo subicular e CA, sendo assim, as projeções do córtex entorrinal não chegam somente ao GD, mas também de maneira direta a CA3, CA2 e CA1.

**Figura 2. Esquema da circuitaria tri-sináptica do hipocampo.**



**Figura 2. Esquema da circuitaria tri-sináptica do hipocampo.** 1) Primeira sinapse, entre fibras da Via Perfurante do córtex entorrinal e células granulares do GD; 2) segunda sinapse, entre fibras musgosas das células granulares e células piramidais de CA3; 3) terceira sinapse, entre projeções de CA3, fibras conhecidas como colaterais de Schaffer, e células piramidais de CA1. Modificada de (Lie et al., 2004).

Tendo como base os circuitos hipocâmpais, algumas teorias foram propostas para explicar a epileptogênese. Uma das hipóteses é a da excitação recorrente. Após um crescimento axonale reorganização sináptica aberrante, que recebe o nome de brotamento das fibras musgosas, forma-se um circuito recorrente monossináptico excitatório entre as células granulares e células musgosas (Lothman

et al., 1992; Sharma et al., 2007; Tauck & Nadler, 1985), tendo como consequência a hiperexcitabilidade de células granulares do GD.

Outra explicação para o entendimento da epileptogênese é a “teoria das células em cesto dormentes” proposta por Sloviter (1991), que se baseia na diminuição da atividade das células GABAérgicas inibitórias gerando um desequilíbrio nos circuitos hipocampais com facilitação da excitação (Jinde et al., 2013; Sloviter, 1987;1991). Acredita-se que com a morte das células musgosas haveria uma redução dos estímulos excitatórios para as células em cesto GABAérgicas deixando-as em um estado “dormente”. Os trabalhos de Longo e Mello (1997, 1998 e 1999) corroboram os trabalhos de Sloviter e sustentam essa hipótese, pois o bloqueio do brotamento das fibras musgosas não impediu o aparecimento das crises espontâneas demonstrando que o circuito recorrente que se forma causando hiperexcitabilidade de células granulares do GD (Babb et al., 1991; Lothman et al., 1992; Sharma et al., 2007; Tauck & Nadler, 1985) não é a principal causa da geração e perpetuação das crises epiléticas.

Uma hipótese alternativa se baseia na existência de células musgosas “irritáveis” que seriam resistentes à morte induzida pelas crises epiléticas (Santhakumar et al., 2000). Estas células musgosas sobreviventes potencializariam a hiperexcitabilidade das células granulares (Jinde et al., 2013; Santhakumar et al., 2000).

Esses circuitos são de extrema importância para a discussão sobre a participação do hipocampo na gênese das crises epiléticas. Os circuitos inibitórios que modulam a excitação hipocampal decorrem de diversos tipos de interneurônios inibitórios localizados tanto no hipocampo propriamente dito quanto no GD. O GABA é um dos principais neurotransmissores que atuam em sinapses inibitórias no encéfalo. Os três tipos de receptores GABAérgicos amplamente conhecidos são: GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>C</sub>, que são receptores ionotrópicos, com ação rápida; e o receptor GABA<sub>B</sub>, que pertence a classe dos receptores metabotrópicos, ligado a uma proteína G, que abre canais iônicos através de segundos mensageiros, produzindo uma ação mais lenta.

A inibição mediada pelo GABA é de extrema importância para o controle da circuitaria sináptica, pois impede a difusão das descargas epileptiformes (Miller & Ferrendelli, 1990; Telfeian & Connors, 1998), controla propriedades intrínsecas dos

neurônios (Dichter & Ayala, 1987; Isokawa-Akesson et al., 1989) e modula a ativação das sinapses glutamatérgicas (Otis & Trussell, 1996). No hipocampo, na região do GD, encontramos alta concentração de interneurônios inibitórios que podem ser divididos em diferentes subtipos baseado em seus aspectos morfológicos, em suas propriedades eletrofisiológicas e na expressão de marcadores específicos. Os principais subtipos de interneurônios que expressam proteínas ligantes de cálcio são: calbindina (CB), PV, com axônios e corpo celular grande, e CR, com corpo celular pequeno, bipolar e orientado verticalmente (Freund & Buzsaki, 1996; Tamamaki et al., 2003; Wonders & Anderson, 2006). Outro subtipo são aqueles que expressam neuropeptídeos como a SST, peptídeo intestinal vasoativo (VIP), colecistoquinina (CCK) e NPY (Markram et al, 2004). Além disso, a maioria dos interneurônios inibitórios são locais, com associações de curto alcance e apenas cerca de 0,5% das células corticais GABAérgicas possuem projeções com axônios de longo alcance (Tamamaki & Tomioka, 2010).

Por fim, os interneurônios inibitórios controlam a hiperexcitabilidade das principais circuitarias neuronais (Freund & Buzsaki, 1996), e a perda de neurônios inibitórios ou disfunção da neurotransmissão GABAérgica no hipocampo contribuem para a epileptogênese (Houser, 2014; Liu et al., 2014; Soukupova et al., 2014).

#### **1.1.4. Epilepsia do Lobo Temporal – Modelo Experimental da Pilocarpina**

A possibilidade de reproduzir doenças humanas em animais trouxe muitos avanços para a área da medicina experimental, além disso, a maioria do conhecimento obtido ao longo desses anos é fruto de apropriados modelos animais que contribuíram para o entendimento de várias doenças, dentre elas a epilepsia. Os modelos animais desenvolvidos para o estudo da ELTM mimetizam achados encontrados em humanos quanto à resposta terapêutica farmacológica e manifestações comportamentais, assim como reproduzem com muita similaridade as características histopatológicas e eletrográficas (Ben-Ari et al., 1981; Turski et al., 1989).

Os modelos animais utilizados para o estudo da epilepsia foram classificados como: genéticos, onde o aparecimento das crises epilépticas espontâneas ou induzidas está relacionado com aspectos associados à formação e ao desenvolvimento do sistema nervoso; e não genéticos, onde as crises epilépticas

são desencadeadas através da estimulação química (pilocarpina, ácido caínico) ou elétrica (*kindling*) do sistema nervoso em animais não manipulados geneticamente (Kandratavicius et al., 2014).

Desde as décadas de 1980 e 1990 até os dias de hoje, o modelo da pilocarpina, desenvolvido por Turski e colaboradores (1983) é extensamente utilizado (Turski, 2000; Turski et al., 1983). Descrita como agonista colinérgico, a pilocarpina é extraída de uma planta brasileira, o *pilocarpus jaborandi*. A administração de pilocarpina em roedores induz crises epiléticas como as generalizadas do tipo tônico-clônica, por meio da ativação de receptores colinérgicos muscaríneos do tipo M1, uma vez que foi observado que animais *knockout* para esse receptor não desenvolveram crises após injeção de pilocarpina (Hamilton et al., 1997). Apesar do importante papel que os receptores M1 desempenham no início das crises, a manutenção das mesmas se dá pela ativação de receptores do tipo NMDA (Nagao et al., 1996; Smolders et al., 1997). Assim, a administração local ou sistêmica de pilocarpina resulta, na maioria das vezes, no SE que é caracterizado por uma crise doradoura (mais de 30 min), geralmente generalizada do tipo tônico-clônica, ou duas ou mais crises convulsivas sem completa recuperação da consciência entre qualquer uma delas (Cherian & Thomas, 2009). A duração do SE durante o insulto inicial é crítica para o desenvolvimento de danos cerebrais e das CER. Alguns estudos mostraram que é preciso uma duração mínima do SE para o desenvolvimento da epilepsia crônica, e, de acordo com Klitgaard e colaboradores e Scorza e colaboradores apenas 30 minutos de SE são suficientes para o desenvolvimento das CER (Klitgaard et al., 2002; Lemos & Cavalheiro, 1995; Scorza et al., 2009).

Após o evento agudo do SE, inicia-se um período conhecido por silente ou latente, com duração bastante variável em torno de 7- 45 dias (Cavalheiro, 1995; Goffin et al., 2007; Leite et al., 1990). Este período é caracterizado pela ausência de crises e a presença de um padrão normal de EEG. No entanto, é nesse período que vários fenômenos fisiopatológicos relacionados à epileptogênese ocorrem. Após esse período latente, os animais passam a apresentar CER, caracterizando o período crônico da epilepsia induzida por pilocarpina (Cavalheiro, 1995; Cavalheiro et al., 1991).

Alguns modelos experimentais de epilepsia, dentre eles o da pilocarpina, permitem o estudo tanto na fase aguda (fase durante a indução de um insulto inicial como o SE) como nas fases latente (período sem crises epilépticas) e crônica (períodos de CER). Devemos considerar algumas facilidades desse modelo, como a rápida indução do SE e presença de um período silencioso seguido de CER (Cavalheiro et al., 1991), brotamento das fibras musgosas (Mello et al., 1993), proliferação ectópica de células granulares (Wieser, 2004) e perda de interneurônios, evidenciada por diversos trabalhos que mostram a redução no número dos mesmos após diferentes tempos da indução do SE (Fritschy et al., 1999; Kobayashi & Buckmaster, 2003; Shetty & Turner, 2001). Além disso, todas essas alterações acontecem no hipocampo, a principal região afetada no modelo de pilocarpina (Fritschy et al., 1999). Por fim, devemos considerar o fato das crises serem dificilmente controladas por drogas anti-epilépticas, tanto em pacientes como nos animais epilépticos (Chakir et al., 2006; Leite & Cavalheiro, 1995).

Nesse sentido, o modelo de epilepsia induzido por pilocarpina se assemelha às condições humanas, e parece ser um modelo apropriado não só para o estudo de drogas anti-epilépticas, como também para tratamentos inovadores não-farmacológicos como a terapia celular.

## **1.2. Células-tronco e terapias celulares**

### **1.2.1. Células-tronco**

O número de estudos realizados com células-tronco aumentou muito nas últimas duas décadas devido ao potencial terapêutico que essas células vêm apresentando. Tal potencial baseia-se na hipótese de substituição celular e de um possível efeito protetor gerado pelas células-tronco, ou seja, elas poderiam substituir, prevenir ou retardar a morte de determinadas populações celulares, além de auxiliar na compreensão de mecanismos regenerativos. Diante disso, essas células podem se tornar uma alternativa para o tratamento de doenças que ainda não possuem um tratamento eficaz, como Parkinson, Alzheimer, lesão medular, esclerose lateral amiotrófica, entre outras.

Por definição, as células-tronco são células indiferenciadas e apresentam características de auto renovação (capacidade de poder se dividir e gerar outra

célula-tronco idêntica), e a capacidade de gerar células especializadas de diferentes linhagens celulares quando em condições específicas, conhecida como potencial de diferenciação (Wagers & Weissman, 2004).

As células-tronco podem ser classificadas de acordo com sua origem: embrionária, fetal ou adulta, e quanto a sua plasticidade ou potencialidade: totipotente, pluripotente e multipotente (Wagers & Weissman, 2004). Segundo sua potencialidade, as células totipotentes, ou zigoto, formam um organismo completo, incluindo tecidos extra embrionários como a placenta, no entanto, são carentes da capacidade de auto-renovação, provavelmente pelo ambiente em que se encontram. As células pluripotentes são as células embrionárias, provenientes da massa interna do blastocisto que originam células pertencentes às três camadas germinativas primárias (ectoderme, mesoderme e endoderme) e são facilmente expandidas em cultura. Entretanto, possuem alta capacidade de gerar teratomas, sendo um dos principais desafios para sua aplicabilidade nas terapias celulares, além de levantar algumas questões éticas.

Recentemente, células-tronco pluripotentes induzidas, também conhecidas como células iPSCs (do inglês *induced pluripotent stem cells*), passaram a ser amplamente estudadas. As iPSCs derivam de células somáticas adultas diferenciadas que, após uma reprogramação celular através da indução da expressão de genes específicos, retornam ao seu estado pluripotente e apresentam características semelhantes às de células-tronco embrionárias (Takahashi & Yamanaka, 2006). Diante disso, as iPSCs tornaram-se um atrativo devido ao seu potencial terapêutico, pois comparadas a outras células-tronco, essas permitem a utilização das células do próprio paciente, permitindo uma abordagem translacional. Além disso, possibilitam o entendimento de doenças complexas, permitindo desenvolver modelos celulares de doenças humanas com modelos celulares contendo o genoma predisposto a doença (Marchetto et al., 2010; Nageshappa et al., 2015; Revilla et al., 2015). No entanto, alguns estudos recentes encontraram anormalidades no transcriptoma destas células, bem como a formação de tumores (Liu, . et al., 2014; Nishimori et al., 2014).

Por fim, as células encontradas em várias regiões do organismo adulto, como as células mesenquimais na medula óssea e as células-tronco neurais no encéfalo, são exemplos de células-tronco adultas, multipotentes, com uma capacidade

limitada de diferenciação. Além das células-tronco neurais adultas, temos as células-tronco neurais fetais, que também são multipotentes, porém, devido à origem fetal elas são mais aptas a proliferar.

### **1.2.2. Células-tronco neurais**

As células-tronco multipotentes encontradas em determinadas regiões do encéfalo adulto são capazes de gerar novos neurônios, fenômeno ao qual é dado o nome de neurogênese, um processo que envolve a proliferação dos progenitores neurais, migração e diferenciação terminal em neurônios (Henning, 2010). As principais áreas neurogênicas são a zona subventricular (ZSV), adjacente aos ventrículos laterais onde novos neurônios migram para o bulbo olfatório pela corrente migratória rostral, e a zona subgranular (ZSG) do giro denteado encontrada no hipocampo, onde novas células granulares são produzidas (Alvarez-Buylla & Garcia-Verdugo, 2002; Alvarez-Buylla et al., 2001).

Em 1928, baseado nas técnicas disponíveis naquela época, o anatomista espanhol Ramon y Cajal sugeriu que o sistema nervoso central era imutável e que o processo de neurogênese só poderia ocorrer no período de desenvolvimento embrionário (Cajal, 1928). Este paradigma foi bem aceito durante muitos anos. No entanto, anos mais tarde Altman e seu grupo utilizaram técnicas sensíveis o suficiente para detectar a divisão celular contínua que ocorre no cérebro adulto (Altman, 1969; Altman & Das, 1965). Porém, apenas na década de 90, quando novas abordagens técnicas foram utilizadas, a comunidade científica aceitou que novos neurônios são continuamente gerados no cérebro adulto de roedores (Kaplan & Hinds, 1977), primatas não humanos (Rakic, 2002) e também em humanos (Gage, 2002).

Essa quebra de paradigma foi importante para a neurociência, pois permitiu uma melhor compreensão de processos relacionados com o surgimento de novos neurônios. A neurogênese no adulto está envolvida na aprendizagem, na formação de alguns traços da memória, e pode ser induzida em atividades como o exercício físico espontâneo, assim como em algumas doenças como a epilepsia (Kokaia, 2011; Van Praag et al., 1999).

Além das células-tronco neurais encontradas no tecido adulto, temos as células-tronco neurais fetais, também multipotentes, que possuem um potencial

maior de autorrenovação, estão presente em grande quantidade no feto em desenvolvimento e podem ser extraídas durante a formação dos mesmos (Henning, 2010). As células-tronco neurais são capazes de gerar os três tipos celulares de origem neural: neurônios, oligodendrócitos e astrócitos. Por um mecanismo de divisão assimétrica são geradas células progenitoras neuronais ou gliais que ainda podem proliferar e posteriormente sofrerão o processo de diferenciação terminal. A habilidade de originar outras células-tronco idênticas ocorre por meio de divisão simétrica (autorrenovação).

Assim, as células-tronco neurais encontram-se no topo da hierarquia dessa linhagem, enquanto as células progenitoras/precursoras já apresentam um maior comprometimento a um tipo celular específico (Gage, 2000). Uma das ferramentas utilizadas para caracterizar as propriedades das células-tronco neurais é a técnica de cultivo de neuroesferas, que será abordada no item 1.2.4.

### **1.2.3. Eminência Gangliônica Medial**

As células-tronco neurais fetais possuem a habilidade de gerar diferentes classes de neurônios *in vitro* e *in vivo*, e essa especificação depende da idade embrionária e do local de origem das células ao longo dos eixos rostral/ caudal ou dorsal/ ventral. Como exemplo, a região do mesencéfalo de embriões de ratos de 14 dias origina neurônios dopaminérgicos, usados para pesquisa em doença de Parkinson (Hahn et al., 2009; Torres et al., 2008), assim como células extraídas da medula espinal de embriões da mesma idade geram neurônios motores, utilizados em estudos sobre a esclerose lateral amiotrófica (Hedlund et al., 2007; Mazzini et al., 2008).

Durante a embriogênese, precursores neurais oriundos da região ventral do telencéfalo dão origem aos interneurônios inibitórios. Essa região é denominada eminência gangliônica (EG) (Corbin & Butt, 2011). A EG é uma estrutura cerebral transitória, ou seja, está presente durante o desenvolvimento embrionário por volta do décimo quarto dia de gestação (E14) de roedores. Essa região pode ser dividida em três partes: a Eminência Gangliônica Lateral (EGL), Eminência Gangliônica Medial (EGM) e Eminência Gangliônica Caudal (EGC), que recebem esses nomes de acordo com sua localização rostral-caudal. As células da EGL migram ventral e anteriormente dando origem a neurônios espinhosos do estriado dorsal e ventral,

incluindo o núcleo accumbens e tubérculo olfatório (Toresson et al., 2000; Wichterle et al., 2001). Já as células da EGM e EGC migram dorsalmente e se espalham pelo prosencéfalo, sendo seus principais alvos o neocórtex, o estriado dorsal, amígdala e hipocampo (Lavdas et al., 1999; Xu et al., 2004) (Figura 4).

Dentre as três eminências citadas, a EGM e a EGC são as fontes primárias de interneurônios corticais no sistema nervoso em desenvolvimento, porém a EGM é a que possui uma capacidade maior de migração, além de dar origem a uma quantidade maior de interneurônios inibitórios, que corresponde a aproximadamente 50-60% dos interneurônios neocorticais de um camundongo (Pleasure et al., 2000; Wonders & Anderson, 2006). Os dois principais subtipos de interneurônio inibitórios que derivam da EGM são PV e SST positivos (Butt et al., 2005), com poucos interneurônios expressando NPY e CR, tanto *in vitro* utilizando a técnica de neuroesferas como nos transplantes *in vivo* (Calcagnotto et al., 2010; Eriksson et al., 2003; Inan et al., 2012; Wichterle et al., 1999).

Para que ocorra a diferenciação de progenitores da EGM em interneurônios inibitórios são necessários fatores de transcrição específicos, que regulam a sobrevivência de interneurônios GABAérgicos, assim como sua migração para o córtex e a maturação do fenótipo adulto apropriado. Estudos que visam entender o desenvolvimento e especificação adequada de interneurônios GABAérgicos derivados da EGM apontam como principais fatores de transcrição o Dlx1 (*distal-less homeobox 1*), o Nkx2.1 (NK2 homeobox 1) e o Lhx6 (LIM *homeobox 6*).

A família de genes homeobox Dlx, especificamente Dlx1, é expressa na maioria das células progenitoras neurais, sendo este gene necessário para a maturação dendrítica e sobrevivência das subclasses de interneurônios, desempenhando um papel importante na especificação de progenitores interneuronais da EGM (Long et al., 2009). Animais nocautes para o Dlx1 apresentam redução de interneurônios inibitórios, preferencialmente do tipo CR e SST positivos, além disso, esses animais apresentam crises generalizadas devido a falta de interneurônios (Cobos et al., 2005).

Os interneurônios derivados da EGM e EGC precisam de Dlx1/2 para garantir a adequada migração para regiões corticais (Panganiban & Rubenstein, 2002). Camundongos duplo mutantes Dlx1/2 apresentam redução do número de interneurônios inibitórios no córtex devido a falha de migração, demonstrando a

importância desses fatores de transcrição na migração de interneurônios da EGM (Colombo et al., 2007).

Apesar do fator de transcrição *Dlx1* desempenhar um papel importante no desenvolvimento de interneurônios inibitórios da EGM, o fator de transcrição considerado crucial para que ocorra a especificação inicial em interneurônios inibitórios é o *Nkx 2.1* (Butt et al., 2008; Xu et al., 2008). Ao contrário dos fatores de transcrição homeobox *Dlx* que são expressos na EGL, EGC e EGM, a expressão de *Nkx 2.1* está ausente na EGL e EGC, sugerindo um papel específico na neurogênese da EGM (Sussel et al., 1999).

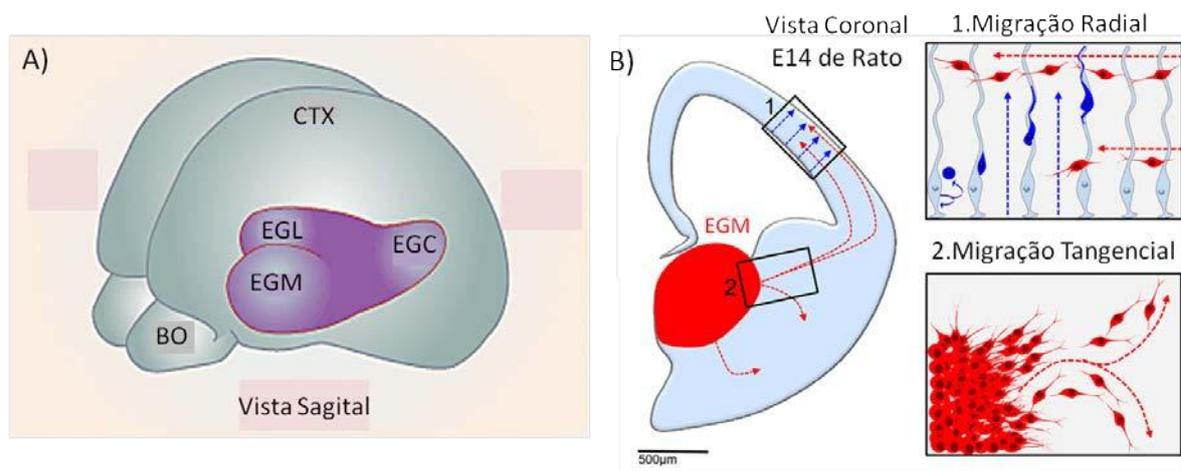
A ausência ou perda de *Nkx 2.1* resulta na diminuição do número de interneurônios. Em um estudo no qual utilizou-se animais mutantes que não apresentavam esse fator, foi observado uma redução significativa de interneurônios GABAérgicos. Dentre os subtipos que mais apresentaram redução destacam-se os interneurônios que expressam PV e SST, tornando a região da EGM a principal fonte desses interneurônios (Butt et al., 2008; Sussel et al., 1999). Além disso, a perda constitutiva de *Nkx 2.1* conduz a um encolhimento e uma transformação da EGM, que passa a adquirir características da região da EGL, reforçando a ideia do *Nkx 2.1* ser um fator de transcrição chave para a especificação de interneurônios GABAérgicos derivados da EGM (Sussel et al., 1999).

Outro papel importante do *Nkx2.1* é manter a expressão de moléculas da EGM, como o *Lhx6*, e reprimir marcadores das outras eminências (EGL e EGC). O fator de transcrição *Lhx6* é expresso durante o processo de migração de interneurônios positivos para PV e SST, sendo essencial para a adequada migração dos interneurônios GABAérgicos da EGM até o córtex. Análises de mutações no gene *Lhx6* indicaram a sua importância na determinação do destino de ambos os interneurônios positivos para PV e SST, fato observado tanto na sua ausência, que torna os mesmos defeituosos, como na sua expressão ectópica em camundongos nocautes para *Nkx2.1*, que pode resgatar a geração dos interneurônios (Du et al., 2008; Liodis et al., 2007). A maioria dos interneurônios corticais positivos para PV e SST presente no cérebro de roedores expressa *Lhx6*. Em animais duplo-mutantes para *Lhx6/8* foi observado uma redução significativa na produção de interneurônios derivados da EGM e falha na migração, no entanto isso não ocorre em animais

mutantes apenas para *Lhx8*, o que evidencia a importância do *Lhx6* (Flandin et al., 2011).

Assim, os fatores de transcrição descritos acima são de extrema importância para a região da EGM, assim como para o desenvolvimento e manutenção de precursores de interneurônios inibitórios que podem ser utilizados e melhor investigados como uma alternativa para terapia celular.

**Figura 3. Eminências durante o desenvolvimento**



**Figura 3. Eminências durante o desenvolvimento.** A) Ilustração mostrando a localização da Eminência Gangliônica Medial (EGM), Eminência Gangliônica Lateral (EGL), Córtex (CTX) e Bulbo olfatório (BO) no cérebro de um embrião de 14 dias de rato. B) Ilustração mostrando a EGM e a migração dos interneurônios inibitórios dessa região em vermelho. Figura modificada de (Tyson & Anderson, 2014).

#### 1.2.4. Neuroesferas

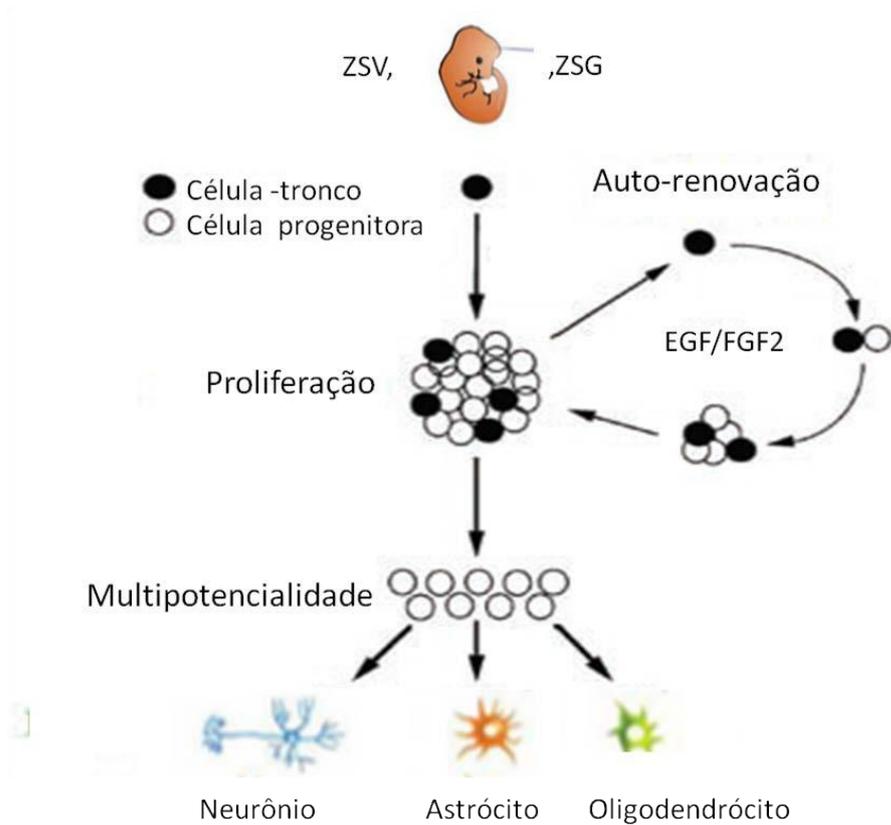
Desde a primeira descrição, as células-tronco e progenitores neurais receberam grande atenção devido ao promissor potencial no desenvolvimento de futuras terapias para as doenças neurológicas. Em 1992, células-tronco neurais foram isoladas do sistema nervoso de camundongos (Reynolds & Weiss, 1992) e em 1998 foram isoladas de tecido humano (Flax et al., 1998; Kukekov et al., 1999). Uma das maneiras de estudar as células-tronco neurais é tirando-as de seu nicho natural, isolando-as, purificando-as e expandindo-as *in vitro*.

O ensaio de formação de neuroesferas, descrito pela primeira vez em 1992 por Reynolds e Weiss, consiste no isolamento de células-tronco neurais oriundas de tecido fetal ou adulto (Reynolds & Weiss, 1992). As neuroesferas são agregados celulares que crescem em suspensão na presença de fatores de crescimento, como FGF2 (*fibroblast growth factor-2*) e EGF (*epidermal growth factor*). Cada neuroesfera é derivada de uma única célula-tronco que, por divisão simétrica, dá origem a outra célula-tronco, e por divisão assimétrica, origina um progenitor mais comprometido com uma linhagem específica. Cada progenitor dá origem somente a outros progenitores ou a células mais diferenciadas. Assim sendo, apenas uma pequena fração da neuroesfera corresponde às verdadeiras células-tronco, a maior parte de sua população é composta por progenitores mais comprometidos (Figura 3).

As células presentes nas neuroesferas são capazes de se diferenciar após a retirada de fatores de crescimento em três linhagens do sistema nervoso central; astrócitos, oligodendrócitos e neurônios, tornando-se um atrativo para terapias de reposição celular em doenças do sistema nervoso (Karbanová et al, 2004; Meissner et al, 2005).

Por meio do modelo de cultivo das neuroesferas, é possível identificar células-tronco neurais e progenitoras em diferentes áreas do encéfalo, investigar como as propriedades intrínsecas das células-tronco e progenitoras se modificam diante do envelhecimento e de patologias, além de contribuir para a compreensão de mecanismos moleculares de autorrenovação e diferenciação (Clevers, 2011; Hirschhaeuser et al., 2010).

**Figura 4. Formação de Neuroesferas.**



**Figura 4. Formação de Neuroesferas.** Esquema sobre a formação de uma neuroesfera onde uma célula-tronco, por divisão assimétrica, forma um agregado celular contendo células-tronco e progenitores neurais. ZSV - Zona subventricular. ZSG - Zona subgranular. EGF e FGF2 - Fatores de crescimento. Modificada (Ahmed, 2009).

#### **1.2.4-1. Papel dos fatores de crescimento EGF e FGF2 na cultura de células-tronco neurais.**

A descoberta do EGF e a caracterização de seu receptor (Savage et al, 1972) foram importantes para estudos na área de diferenciação e proliferação celular. Durante o desenvolvimento do sistema nervoso central, o EGF apresenta papéis importantes na indução da proliferação e migração de células-tronco neurais (Kornblum et al., 1997; Threadgill et al., 1995).

Os receptores de EGF estão associados com a manutenção da multipotencialidade das células-tronco embrionárias e neurais, independente da idade ou região do encéfalo, pois as células que apresentam altos níveis de

expressão desses receptores são progenitores com uma grande capacidade proliferativa. O uso de EGF induz a proliferação e a migração de progenitores da ZSV (Ciccolini et al., 2005; Ciccolini & Svendsen, 1998). Além disso, os receptores de EGF não estão diretamente ligados ao surgimento de novos neurônios, uma vez que as células que apresentam altos níveis desse receptor possuem baixa capacidade de diferenciação neuronal (Ciccolini et al., 2005). Esses receptores parecem estar envolvidos na diferenciação de células gliais, pois a redução de receptores de EGF nas células precursoras localizadas na região da ZSV atenua a produção de oligodendrócitos, enquanto o aumento da expressão desses receptores expande a população dos mesmos (Aguirre & Gallo, 2007).

Outro fator de crescimento bastante utilizado para manter e expandir células-tronco embrionárias e neurais é o FGF2 (Kilpatrick & Bartlett, 1995; Reynolds & Weiss, 1992), membro da família do FGF, que compreende 22 ligantes e 4 receptores (Oliveira et al., 2013). O FGF2 promove a proliferação de células-tronco neurais e, assim como o EGF, o aumento da expressão de receptores FGFR2 mantém as células precursoras neurais em um estado de multipotencialidade (Maric et al., 2007). Quando usado em células-tronco embrionárias humanas e de camundongos, o FGF2 induz um destino neural (Guillemot & Zimmer, 2011; Reynolds & Weiss, 1996). Quanto ao fenótipo de diferenciação celular, de forma diferente do EGF, o FGF2 está envolvido com a origem de células neuronais, visto que camundongos deficientes para FGF2 apresentam uma grande redução do número de neurônios da medula espinal e córtex cerebral, além de terem neurônios fenotipicamente anormais no hipocampo (Dono et al., 1998). Devemos considerar outras funções relevantes relacionadas ao FGF2 como: capacidade de favorecer a diferenciação neuronal em células-tronco neurais adultas, aumento da capacidade de migração das células-tronco neurais transplantadas no córtex, além de ser considerado um fator de sobrevivência para células neurais isoladas de diferentes regiões do cérebro de embriões (Kosaka et al., 2006; Palmer et al., 1999).

Estudos sobre neurogênese em mamíferos adultos demonstraram que o tratamento sinérgico com o FGF2 e EGF aumenta a proliferação de células progenitoras na ZSV (Tureyen et al., 2005), bem como, ambos são considerados fatores essenciais para a expansão *in vitro* sobrevivência de células-tronco neurais de embriões de roedores entre 14 a 20 dias de gestação (E14-E20) (Tropepe et al.,

1999). Adicionalmente, a retirada transiente ou o uso de baixas concentrações de EGF e FGF2 inicia a diferenciação celular (Kelly et al., 2005; Schwindt et al., 2009). Tais estudos demonstram que processos biológicos desencadeados por EGF e FGF2 são necessários para manter as células-tronco neurais em um estado proliferativo e indiferenciado em cultura, sendo, portanto, importantes para a expansão *in vitro* alongo prazo. Diante disso, altas concentrações de EGF e FGF2 são classicamente utilizadas para a expansão de progenitores neurais em culturas de neuroesferas (Conti et al., 2005; Gage et al., 1995; Guillemot & Zimmer, 2011).

A utilização de componentes variados no meio de cultura influencia a proliferação e o fenótipo celular das células-tronco neurais. A retirada dos fatores de crescimento EGF e FGF2 e a adição de soro fetal bovino no meio de cultura de neuroesferas aumenta a quantidade de astrócitos, por outro lado a adição de AR aumenta a diferenciação neuronal (Chow et al., 2000). Diante disso, vale ressaltar que as células-tronco neurais são sensíveis a mudanças nos níveis de concentração de morfógenos e fatores de crescimento. Por exemplo, neuroesferas cultivadas com baixas concentrações de EGF demonstraram maior diferenciação em neurônios, o que reforça a hipótese do EGF estar relacionado com a expansão e diferenciação de células gliais (Kelly et al., 2005).

Estudos em que os autores removeram, por curto período, os fatores EGF e FGF2 da cultura de neuroesferas demonstraram um aumento da neurogênese e da extensão dos prolongamentos neuronais, tanto em células de humanos, como em murinos (Schwindt et al., 2009; Schwindt et al., 2009). Em suma, os fatores de crescimento são críticos para a proliferação e para a decisão do destino celular de células-tronco e progenitores neurais presentes no sistema nervoso em desenvolvimento e no adulto, assim como, nas células-tronco neurais cultivadas como neuroesferas.

#### **1.2.4-2. A influência do AR no cultivo de progenitores neurais**

Assim como os fatores de crescimento, a sinalização celular mediada pelo AR tem se mostrado influente nos processos de proliferação, diferenciação e maturação celular (Baharvand et al., 2007; Duong & Rochette-Egly, 2011; Gudas & Wagner, 2011). Resumidamente, sua produção acontece por meio de duas consecutivas reações enzimáticas: o retinol (vitamina A) é oxidado em retinal (retinaldeído) e

depois oxidado em AR. Os receptores de AR regulam diretamente a expressão dos genes alvos.

O AR é de extrema importância no desenvolvimento do sistema nervoso central durante a embriogênese (Maden et al., 1996). Estudos com animais nocaute apontaram deficiências prosencefálicas, dentre elas, a diminuição da proliferação celular e expressão alterada de vários genes, como o SHH (Sonic Hedgehog), confirmando seu papel crucial durante a fase de desenvolvimento (Mark et al., 2009; Ribes et al., 2006). Outros achados indicam que a carência de AR gera uma falha na manutenção da sinalização de FGF e Notch que pode afetar a manutenção de progenitores neurais (Paschaki et al., 2012).

A ausência de sinalização pelo AR leva a uma diminuição da proliferação celular e a um aumento da morte celular em progenitores neurais do telencéfalo em desenvolvimento, além de comprometer a especificação fenotípica de progenitores da eminência gangliônica medial (EGM) (Rajaii et al., 2008). Uma outra evidência da importância do papel do AR no desenvolvimento das células da EGM deriva de um estudo que mostrou que, apesar da falta do AR em animais transgênicos que não metabolizam a vitamina A não afetar o desenvolvimento de neurônios corticais, foi observado uma deficiência nos neurônios GABAérgicos, sugerindo que o AR possa influenciar na conversão do neurotransmissor glutamato para o GABA (Chatzi et al., 2011).

O efeito indutor de células neurais atribuído ao AR mantém-se presente após o desenvolvimento completo de um organismo, pois ele participa da modulação e da proliferação celular das regiões do cérebro adulto onde encontramos os progenitores neurais, podendo regular a proliferação de astrócitos na ZSV (Haskell & Lamantia, 2005) e a diferenciação neuronal que ocorre no GD hipocampal (Jacobs et al., 2006). Além disso, a administração oral prolongada de AR foi capaz de aumentar a proliferação de células da SVZ de ratos adultos (Giardino et al., 2000).

Diante disso, o AR vem sendo amplamente utilizado em estudos que visam produzir células progenitoras neurais e neurônios a partir de células-tronco *in vitro* (Hirami et al., 2009; Kim et al., 2009; Soprano et al., 2007). Recentemente, verificou-se que a adição de AR em culturas de neuroesferas derivadas de células-tronco embrionárias de ratos e de humanos gera uma quantidade maior de progenitores neurais, podendo aumentar significativamente a diferenciação neuronal

desses progenitores (Bibel et al., 2004; Plachta et al., 2004). O mesmo acontece em culturas de células-tronco neurais adultas (SVZ e SGV) (Takahashi et al., 1999) e de células-tronco embrionárias do estriado (Wohl & Weiss, 1998). Esses indícios reforçam a habilidade do AR de induzir diferenciação neuronal em cultura celular, caracterizando um modelo promissor para o estudo *in vivo* de transplante dessas células e contribuindo para definir protocolos para terapia celular.

### **1.2.5. Aplicação de terapias celulares em Epilepsia do Lobo Temporal**

Diversas doenças neurológicas ou psiquiátricas são resultantes de disfunção dos interneurônios inibitórios, dentre elas podemos destacar o autismo, a esquizofrenia e a epilepsia (Kato & Dobyans, 2005; Lewis et al., 2005; Rossignol, 2011). Os circuitos neuronais hiperexcitáveis presentes nas epilepsias refletem essa disfunção da circuitaria inibitória. Prova disso é que a maioria dos medicamentos anti-epilépticos, amplamente utilizados na prática clínica, foi desenvolvida com o intuito de melhorar ou mimetizar a função de GABA.

Há aproximadamente duas décadas, o potencial terapêutico do transplante de células progenitoras neuronais fetais na supressão das crises epilépticas tem sido estudado. Uma das primeiras tentativas de estabelecer uma terapia celular para a epilepsia foi usando neurônios noradrenérgicos fetais transplantados no hipocampo de ratos adultos, porém o transplante de células adrenérgicas não diminuiu as crises induzidas por *kindling* (Barry et al., 1987). No entanto, em um estudo conduzido por Bortolotto e colaboradores os precursores neuronais noradrenérgicos foram capazes de reprimir as CER, geradas pelo modelo experimental da pilocarpina, quando transplantados no hipocampo de ratos epilépticos (Bortolotto et al., 1990). Outra fonte promissora de células pluripotentes são as células-tronco neurais humanas, que quando transplantadas em animais com ELT induzida por pilocarpina, são capazes de se diferenciar em células GABAérgicas, glutamatérgicas e astrócitos, além de reduzir a frequência e a severidade das crises comportamentais (Chu et al., 2004). Ainda, precursores neurais oriundos da EGL também foram transplantados em animais epilépticos que reduziram o número de crises espontâneas comportamentais avaliadas (Hattiangady et al., 2008).

Como visto, uma variedade de células-tronco neurais fetais vêm sendo transplantadas em modelos animais de epilepsia, como células precursoras do

hipocampo (Shetty & Hattiangady, 2007), células do locus ceruleus (Bengzon et al., 1993), precursores neurais da EGL (Hattiangady et al., 2008), células geneticamente modificadas para secretar ou produzir GABA (Thompson, 2009), células-tronco neurais humanas (Chu et al., 2004) e progenitores neurais oriundos de células-tronco embrionárias (Carpentino et al., 2008). Porém, após sua diferenciação no cérebro do hospedeiro, o fenótipo celular encontrado é bem heterogêneo: além de interneurônios inibitórios temos neurônios excitatórios, células gliais e células imaturas (Carpentino et al., 2008; Chu et al., 2004). Essa diversidade de tipos celulares pode complicar a interpretação de como essas células atuam no cérebro do hospedeiro, diferente do transplante de células oriundas de determinadas regiões que originam uma população celular mais homogênea quando transplantadas, como as células oriundas da EGM que se diferenciam, na sua maioria em interneurônios inibitórios (Alvarez-Dolado et al., 2006; Baraban et al., 2009).

Diferente dos precursores neurais oriundos da EGL que ficam em sua maioria restritos ao local da injeção, as células derivadas da EGM podem migrar por longas distâncias e alcançar diversas regiões do sistema nervoso central quando transplantadas em roedores neonatos e adultos (Wichterle et al., 1999). Quando transplantadas, as células da EGM dão origem a interneurônios inibitórios que apresentam atividades eletrofisiológicas típicas de vários subtipos de interneurônios inibitórios. Além disso, exibem correntes sinápticas espontâneas e evocadas, o que indica que as células transplantadas são capazes de receber sinais sinápticos funcionais de neurônios do cérebro do hospedeiro, estabelecendo assim sinapses inibitórias funcionais (Alvarez-Dolado et al., 2006; Hunt et al., 2013). Além de estudos eletrofisiológicos, contatos sinápticos foram observados através de microscopia eletrônica entre os interneurônios transplantados e os neurônios do animal hospedeiro (Baraban et al., 2009; Southwell et al., 2010). Diante disso, as células transplantadas são capazes de formar novas sinapses inibitórias e modificar esses circuitos. Estudos *in vitro* de eletrofisiologia confirmaram que células derivadas da EGM expressando o marcador GFP (*Green Fluorescent Protein*) exibem propriedades de disparos típicas de interneurônios maduros após o transplante (Alvarez-Dolado et al., 2006; Wichterle et al., 2001).

Tais achados contribuíram para a realização de estudos com células derivadas da EGM em diferentes modelos de epilepsia, com o objetivo de avaliar o

potencial terapêutico antiepiléptico dessas células. Progenitores neurais oriundos da EGM quando transplantados no córtex de camundongos transgênicos que apresentam uma forma hereditária de epilepsia produziram um aumento das correntes pós-sinápticas inibitórias, redução da frequência e melhora da intensidade das crises (Alvarez-Dolado et al., 2006; Baraban et al., 2009; Xu et al., 2004). Além disso, quando transplantadas em ratos adultos com ELT as células fetais da EGM reduziram a inflamação (Waldau et al., 2010) e a susceptibilidade às crises (Calcagnotto et al., 2010a). Um estudo que avaliou o transplante das células da EGM no córtex de neonatos mostrou um aumento do limiar para crises epiléticas, sendo observado um efeito protetor nas crises tônicas e uma diminuição da severidade e mortalidade associada às crises induzidas pelo modelo de eletrochoque convulsivo máximo, tradicionalmente usado para identificar o potencial de drogas anti-epiléticas (Calcagnotto et al., 2010a). Ainda nessa linha, em um modelo animal associado à ausência de canais de potássio, o transplante de células da EGM reduziu as crises espontâneas (Baraban et al., 2009).

Já em animais com déficits de interneurônios inibitórios gerado pela presença de uma substância neurotóxica chamada saporina, as células da EGM quando transplantadas se diferenciaram em interneurônios capazes de restaurar os níveis de inibição local, comprovados por registros eletrofisiológicos das correntes inibitórias, além disso, diminuiu a intensidade e a mortalidade das crises induzidas pelo modelo de pentilenotetrazol (PTZ) (Zipancic et al., 2010). No mesmo ano, Waldau e colaboradores observaram uma redução da frequência e intensidade de crises em animais crônicos induzidos pelo modelo do ácido kaínico, após o transplante de células da EGM (Waldau et al., 2010). Outro estudo importante com transplante de células da EGM realizado na fase crônica da epilepsia induzida pelo modelo de pilocarpina, ou seja, após o aparecimento das crises espontâneas e recorrentes, trouxe fortes evidências de melhora no quadro epilético. Após o transplante, esses animais apresentaram uma redução da frequência de crises eletrográficas, uma melhora nos déficits comportamentais relacionados ao aprendizado e memória, além de uma diminuição da resposta agressiva perante a manipulação. Nesse mesmo estudo, os transplantes foram realizados em duas regiões diferentes, na amígdala e no hipocampo, porém o transplante realizado no hipocampo apresentou resultados mais promissores (Hunt et al., 2013). Um estudo

recente desenvolvido por Henderson e colaboradores demonstrou por optogenética que essas células formam sinapses inibitórias funcionais e são capazes de diminuir as crises crônicas espontâneas observadas por longos períodos (Henderson et al., 2014).

De fato, diversos estudos realizados com animais mostraram evidências de que o transplante de células da EGM melhora aspectos comportamentais da epilepsia. O uso de progenitores neurais fetais mostrou ser uma alternativa para a reposição de interneurônios em pacientes com epilepsia refratária ao tratamento medicamentoso (Naegele et al., 2010). Essas células apresentam a capacidade de aumentar a inibição sináptica local mediada pelo GABA modificando circuitos epileptogênicos e limitando a propagação da hiperatividade neuronal através das redes neurais. Além disso, é importante ressaltar que nunca observaram formações tumorais em camundongos transplantados com células progenitoras da EGM e nem alterações comportamentais, pelo contrário, comorbidades comportamentais e cognitivas, frequentemente associadas a pacientes com ELT, são reduzidas ou melhoradas após o transplante de células da EGM (Hunt et al., 2013; Waldau et al., 2010).

Os resultados promissores dos trabalhos citados incitam uma investigação mais profunda sobre o desempenho de precursores neurais que dão origem a interneurônios inibitórios transplantados em animais epiléticos. A maioria dos estudos realizou o transplante de progenitores neurais fetais da EGM imediatamente após a extração, porém a utilização das células dessa forma está distante do uso translacional. Diante disso, é importante investigar o comportamento das células da EGM após cultura ou modificações *in vitro*.

No presente trabalho, utilizamos cultura de neuroesferas para expandir as células da EGM usadas no transplante em animais epiléticos, além disso, transplantamos células da EGM que não foram cultivadas como neuroesferas, a fim de comparar o efeito anticonvulsivo das duas maneiras de preparo das células, contribuindo para um avanço na área das terapias celulares, que ainda carece de estudos para uma utilização segura no futuro.

## **2. Justificativa e Hipótese**

Uma característica importante da ELT consiste na perda seletiva de interneurônios inibitórios, cujo principal papel é regular a atividade neuronal através de disparos inibitórios. A redução dos sinais inibitórios para os neurônios principais hipocampais gera a persistente hiperexcitabilidade encontrada na ELT (Freund & Buzsaki, 1996). Esta hiperatividade leva à excitotoxicidade e, conseqüentemente, resulta em perda neuronal, gerando assim desordens neurológicas como a manifestação de crises epiléticas. Os benzodiazepínicos potencializam a inibição mediada pelo receptor GABAA e constituem o tratamento emergencial padrão para crises recorrentes e prolongadas (Loscher & Schmidt, 2006). No entanto, o seu uso crônico ou regular pode gerar dependência. Além disso, muitos pacientes são fármaco-resistentes, sendo a epilepsia refratária ao tratamento farmacológico um dos principais problemas clínicos, já que poucos pacientes podem ser submetidos à intervenção cirúrgica, e, neste caso, outros déficits podem ser gerados (Duncan et al., 2006).

Com a descoberta das células-tronco e progenitores neurais muitos estudos foram desenvolvidos com o intuito de entender melhor o funcionamento dessas células visando uma futura aplicação das mesmas como terapia em diversas doenças neurológicas ainda carentes de tratamento efetivo. No cérebro em desenvolvimento é possível isolar e cultivar células-tronco neurais que originam populações neuronais específicas. Estudos recentes mostram que progenitores da EGM transplantadas no córtex de roedores têm capacidade de migrar para todas as camadas corticais, para o estriado, hipocampo, diferenciar em interneurônios, estabelecer sinapses funcionais com os neurônios pré-existentes e, além disso, melhoram aspectos comportamentais da epilepsia (Alvarez-Dolado et al., 2006; Hunt et al., 2013; Wichterle et al., 2001).

Uma das ferramentas que permitem a expansão de células-tronco e progenitores neurais é a cultura de neuroesferas. As neuroesferas podem se comportar de maneira diferente dependendo das condições de cultivo quanto ao padrão de diferenciação, quantidade de células e migração (Schwindt et al., 2009). Além disso, esse sistema de cultura tem potencial para prover um número ilimitado de células-tronco e progenitores neurais, permitindo assim uma produção em demanda para o uso de terapias de reposição celular em doenças do sistema

nervoso. Torna-se necessário criar condições otimizadas de cultivo para que as células provenientes de neuroesferas mantenham sua especificação neuronal e possam ser usadas terapeuticamente, sem que haja a necessidade de realizar o transplante imediatamente após a extração de células-tronco do tecido fetal.

Nossa hipótese é que progenitores da EGM cultivados como neuroesferas na presença de AR e/ou ausência de fatores de crescimento originem uma quantidade maior de neurônios que expressam genes específicos para se diferenciar em interneurônios inibitórios e conseqüentemente, quando transplantados em animais epiléticos (*in vivo*), durante o período epileptogênico, se diferenciem em um maior número de interneurônios inibitórios gerando uma diminuição das crises epiléticas.

Além disso, iremos comparar o potencial anticonvulsivante e o padrão de diferenciação neural de células da EGM cultivadas como neuroesferas em diferentes condições com células da EGM transplantadas imediatamente após a extração, sem passar pela fase de proliferação ou modificações em cultura. Diante desse cenário, poderemos observar qual a opção de transplante de células da EGM mais efetiva na redução das crises espontâneas e recorrentes e na diferenciação de interneurônios inibitórios. Esses resultados ajudarão no esclarecimento de pontos importantes sobre o comportamento das células derivadas da EGM, que podem ser úteis em condições neurológicas onde o aumento ou a modulação da inibição sináptica pode ser benéfica, assim como contribuir para maiores conhecimentos na área das terapias celulares.

### **3. Objetivos**

O objetivo geral do estudo é comparar diferentes condições de cultivo de neuroesferas derivadas da EGM quanto ao padrão de diferenciação neuronal *in vitro* e, avaliar *in vivo* seu potencial anticonvulsivo e de diferenciação em interneurônios inibitórios capazes de integrar na circuitaria e modular a excitabilidade neuronal, após transplante em animais epiléticos.

#### **3.1. Objetivos específicos**

##### ***In vitro:***

A) Investigar as modificações na composição do meio de cultivo de neuroesferas de células provenientes EGM (na presença de AR e/ou após remoção transiente dos fatores de crescimento) e sua interferência na manutenção da especificação regional durante a fase de proliferação, e no potencial de diferenciação em neurônios.

##### ***In vivo:***

A) Investigar a capacidade de diferenciação em interneurônios inibitório e de gerar um efeito anticonvulsivo de células da EGM cultivadas como neuroesfera, em uma condição favorável para a diferenciação de neurônios, quando transplantadas no período latente da ELT.

B) Comparar o possível efeito anticonvulsivo do transplante de células da EGM em animais epiléticos de células transplantadas imediatamente após a extração (“células frescas”) com células cultivadas como neuroesferas.

## 4. Materiais e Métodos

Os protocolos desenvolvidos nessa tese, assim como os resultados, foram divididos em duas partes: *in vitro* e *in vivo*.

### Parte I - *In vitro*

#### 4.1. Grupos experimentais

A parte *in vitro* busca identificar qual das quatro condições de cultura de neuroesferas de células oriundas da EGM resulta em um aumento de células neuronais. Os experimentos foram conduzidos em duas condições complementares: nos agregados em suspensão e após diferenciação das células das neuroesferas induzida por adesão na ausência de EGF/FGF2. Nos agregados celulares cultivados em suspensão foram analisados: 1) o tamanho das neuroesferas, que reflete a eficiência da expansão celular; 2) a proporção dos três principais tipos celulares que compõem a neuroesfera (glia, neurônios e progenitores neurais); 3) a expressão de conjuntos de genes que especificam os precursores neuronais da EGM. Já nas células que foram submetidas ao processo de diferenciação *in vitro*, investigamos se as modificações realizadas no meio de cultivo na fase proliferativa induzem um maior potencial de diferenciação neuronal.

As células extraídas da EGM foram cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium - Nutrient Mixture F-12* (DMEM-F12), L-Glutamina, Suplemento N2 e Penicillina-Estreptomicina-Anfotericina B (PSA), variando apenas a presença do AR e presença ou ausência dos fatores de crescimento EGF/FGF2 (todas as concentrações ou proporções utilizadas de cada reagente estão descritas no item 4.3.), que chamamos respectivamente de “fatores” ou “carenciamento”, formando assim os seguintes grupos (Tabela 1):

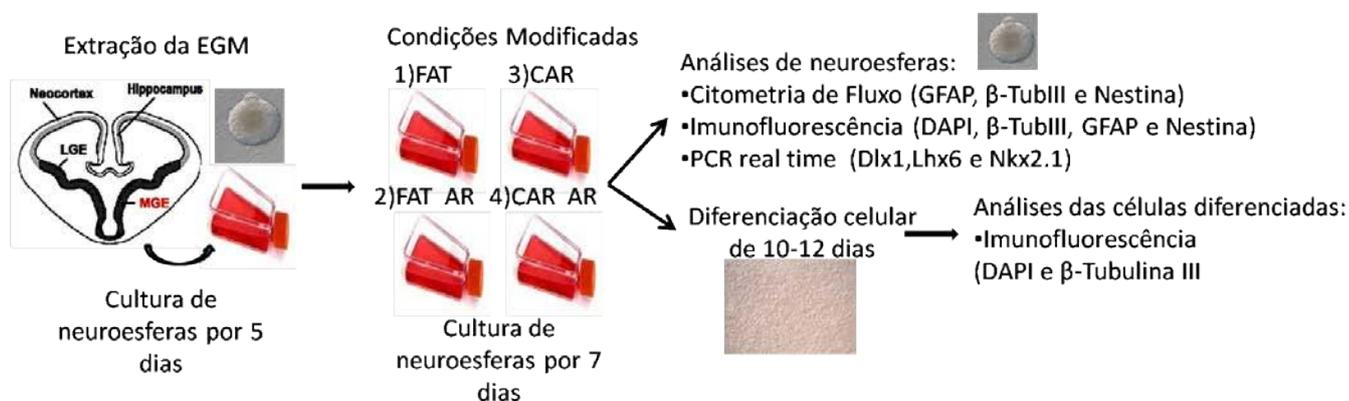
- 1) FAT - Fatores (EGF/FGF2);
- 2) FAT AR - Fatores (EGF/FGF2) + AR;
- 3) CAR - Carençadas (sem a presença de EGF/FGF2);
- 4) CAR AR - Carençadas + AR.

Tabela 1. Grupos dos experimentos (*in vitro*)

Grupos <i>in vitro</i>			
FAT (CTRL)	FAT AR	CAR	CAR AR
DMEM-F12	DMEM-F12	DMEM-F12	DMEM-F12
L-Glut, N2 e PSA	L-Glut, N2 e PSA	L-Glut, N2 e PSA	L-Glut, N2 e PSA
EGF/FGF2	EGF/FGF2	-	-
-	AR	-	AR

Tabela 1. Grupos *in vitro*. O nome dos grupos indica as quatro diferentes condições de cultura utilizadas.

**Figura 5. Desenho experimental 1.**



**Figura 5. Desenho experimental 1.** Ilustração e esquema dos experimentos realizados *in vitro*.

#### 4.2. Animais

Os ratos da linhagem Sprague Dawley, utilizados nesse trabalho foram fornecidos pelo Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, e alocados em condições controladas para o desenvolvimento dos procedimentos. Esses animais foram mantidos em número de 5 por caixa, em caixas de polipropileno (28 x

17 x 13 cm) forradas com serragem de madeira em uma sala com temperatura entre 19°C – 22°C, com ciclo claro-escuro de 12h (programa de iluminação artificial de 50 lux), com início da fase clara às 7:00 e término às 19:00. A troca das caixas foi realizada três vezes por semana, e os animais recebiam água e ração sólida para roedores *ad libitum* trocadas diariamente. Antes do início dos experimentos, os animais foram adaptados às condições padrões do biotério por um período mínimo de uma semana. Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (CEP 0024/12).

Para a obtenção das células precursoras neurais da EGM, utilizamos fetos de 14,5 dias (E14,5) de gestação das fêmeas Sprague Dawley. Para ter o controle do tempo gestacional, foi realizado esfregaço vaginal 12h após o acasalamento, detectando a cópula pela presença de espermatozoides.

Para obtenção das células da EGM para o transplante em ratos epiléticos, utilizamos embriões heterozigotos para o gene GFP. Esses embriões expressam constitutivamente a proteína GFP (origem Charles River SD-Tg (GFP) 2BalRrrc), o que permite rastrear as células GFP<sup>+</sup> no cérebro do animal epilético transplantado por imunofluorescência. Como animal receptor (hospedeiro) do transplante das células, utilizamos ratos machos adultos da linhagem Sprague Dawley, com idade de 8-10 semanas induzidos ao SE pelo modelo de pilocarpina.

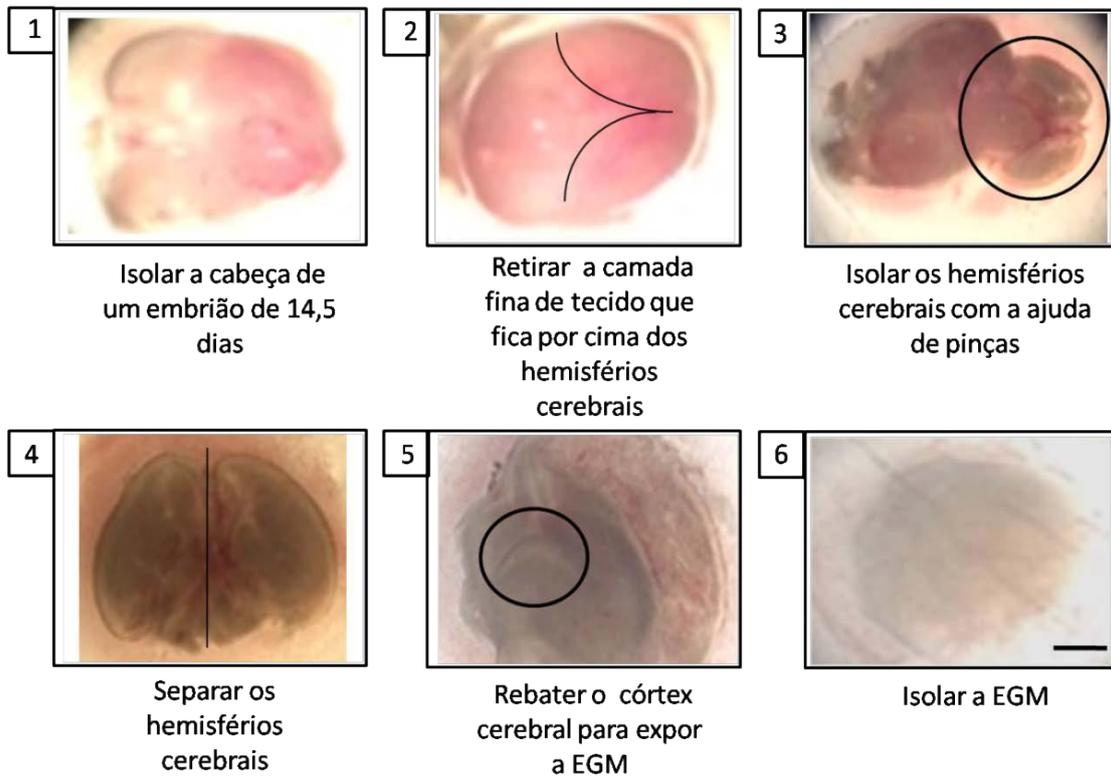
### **4.3. Cultura de neuroesferas**

Fêmeas prenhes foram sacrificadas com uma dose letal de anestésico (Tiopental 80mg/Kg), os fetos foram retirados do útero, e, com a ajuda de um microscópio de fluorescência (Nikon) na excitação b-2e/c FITC, selecionamos os fetos GFP<sup>+</sup> e GFP<sup>-</sup>. A região da EGM foi extraída de acordo com a descrição detalhada na figura 6, com a ajuda do estereomicroscópio (Nikon). Os tecidos foram colocados em um eppendorf e incubados em uma solução de tripsina 0,05% (massa/vol.) estéril por 5 minutos a 37 °C, seguido de inativação com soro fetal bovino (Gibco). Os tubos foram centrifugados a 1500 rpm por 7 minutos e o tecido dissociado mecanicamente com o auxílio de micropipetas (P1000 e P200) em DMEM-F12 + DNase. Após uma nova centrifugação, o *pellet* foi ressuspensão em 0,5 mL de DMEM. As células obtidas foram cultivadas na densidade de

aproximadamente 100.000 cél/mL em garrafas plásticas de 25 cm<sup>2</sup>, previamente tratadas com Poli 2-hidroxietil metacrilato (Sigma), um polímero para evitar a adesão das células. O meio de cultura padrão utilizado para o crescimento das neuroesferas foi composto por DMEM-F12 50:50 (Invitrogen), suplementado com 1% de N2 (Invitrogen), 1% de L-glutamina (200 mM; Invitrogen), e penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 ug/mL) e anfotericina B (0,25 ug/mL), além dos fatores EGF (20 ng/mL; Sigma) e FGF2 (10 ng/mL; R&D) (Ciccolini e Svendsen, 1998). As células foram mantidas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sup>2</sup> por aproximadamente 5 dias.

Após esse período as células oriundas de embriões não-GFP foram cultivadas nas quatro diferentes condições de cultivo, já as células oriundas de embriões GFP<sup>+</sup> foram cultivadas apenas nas condições FAT e CAR AR. Para ambos os grupos estavam presentes DMEM-F12, L-Glutamina, suplemento N2 e antibiótico. Como mencionado acima, no grupo FAT adicionamos os fatores de crescimento, no grupo FAT AR adicionamos fatores de crescimento e AR (1µM; Roche) no grupo CAR retiramos os fatores de crescimento, e no grupo CAR AR adicionamos o AR e retiramos os fatores de crescimento EGF/FGF2. As neuroesferas ainda em suspensão permaneceram em cultura por aproximadamente 7 dias.

**Figura 6. Extração da EGM**



**Figura 6. Extração da EGM.** Protocolo contendo ilustração e descrição para a extração da EGM. Barra de escala 500  $\mu\text{m}$ .

#### **4.4. Fixação e imunofluorescência de neuroesferas**

Passados os sete dias de cultivo nas diferentes condições, as neuroesferas (GFP<sup>-</sup>) foram fixadas em paraformaldeído (PFA 4%) e desidratadas em diferentes concentrações de sacarose: 10% (1h), 20% (1h), 30% (over night). No dia seguinte, as neuroesferas foram emblocadas com HistoPrep (Fisher Scientific), congeladas no gelo seco e armazenadas no freezer -80°C. As neuroesferas foram seccionadas em criostato, na espessura de 20  $\mu\text{m}$  e os cortes foram coletados em lâminas silanizadas.

Já nas lâminas, as neuroesferas foram incubadas por 30 minutos em solução de bloqueio contendo 2% de soro normal de cabra e 0,1% de TritonX-100 em PBS (*Phosphate Buffered Saline*). Em seguida, foram incubadas em anticorpo primário: anti  $\beta$ -tubulina III (Sigma-1:500), anti GFAP (*glial fibrillary acidic protein*-Dako-

1:1000) e anti Nestina (Chemicon-1:500) *overnight* a 4 °C, diluído em solução de bloqueio. Após 3 lavagens com PBS por 10 minutos, as neuroesferas foram incubadas com o anticorpo secundário (anti-mouse Alexa 555 e anti-coelho Alexa 488 - 1:600) durante 2 horas. Os núcleos foram corados com DAPI e as lâminas foram fechadas com DPX e analisadas em microscópio de fluorescência utilizando o software de captura *NeuroLucida*. Após aquisição das imagens, selecionamos as imagens que representavam as 20 maiores esferas coradas com DAPI de cada grupo para medir o diâmetro das mesmas, a fim de verificar o tamanho das neuroesferas de cada grupo. Para a medição do diâmetro foi usado o software *Image J*.

#### **4.5. Citometria de fluxo**

A citometria de fluxo foi realizada com as neuroesferas (GFP<sup>+</sup>) dissociadas após os sete dias de permanência nas quatro diferentes condições de cultura.

Os marcadores utilizados para identificar os tipos celulares das células dissociadas das neuroesferas foram:  $\beta$ -tubulina III (1:200 - Sigma), GFAP (1:200 - Dako) e Nestina (1:200 - Chemicon). As células foram tripsinizadas e dissociadas mecanicamente. Após inativação da tripsina com soro fetal bovino, as células foram dissociadas mecanicamente novamente, centrifugadas por 5 minutos a 800 x g e ressuspensas em PFA 4%, por 30 minutos para fixação. Após lavagem em PBS, as células foram distribuídas em tubos e incubadas por 30 minutos em solução de bloqueio (2% de soro normal de cabra e 0,01% de TritonX-100 em PBS). Logo em seguida, as células foram incubadas por 2 horas em solução de bloqueio contendo os anticorpos primários. Depois foram lavadas em PBS e incubadas com os anticorpos secundários fluorescentes Alexa 488 ou Alexa 555 (1:400 - Invitrogen), de acordo com a espécie na qual o anticorpo primário foi produzido. Uma pequena quantidade de células sem os anticorpos primários foi dividida em três tubos: no primeiro tubo haviam somente células que foram utilizadas para a calibração do equipamento; no segundo as células foram incubadas apenas com Alexa 488; e no terceiro com Alexa 555 para o controle da marcação. Após lavagem com PBS, as células foram ressuspensas em PBS e analisadas no equipamento FACS Calibur

(BD). Foram adquiridos 10.000 eventos de cada amostra. Os dados foram analisados pelo *software FlowJo*.

#### **4.6. Diferenciação e imunofluorescência de neuroesferas**

As neuroesferas (GFP<sup>-</sup>) cultivadas, como já descrito no item 3.3, logo após os sete dias de permanência nas quatro diferentes condições de cultura foram colocadas em lamínula estéril previamente tratada com polilisina e laminina, dentro do multiwell de 24 poços para adesão e diferenciação *in vitro*. O meio de cultura utilizado foi composto por DMEM -F-12 (Invitrogen), suplementado com 1% de N2 (100x Invitrogen), 1% de L-Glutamina (200 mM; Invitrogen) e penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 ug/mL) e anfotericina B (0,25 ug/mL) (todos na solução antibiótico-antimicótico 100x; Invitrogen), com a ausência dos fatores de crescimento. O meio de cultura foi trocado três vezes por semana e as células foram mantidas em cultura na estufa a 37°C, com umidade maior que 95% e 5% de CO<sup>2</sup> por 12 dias. As células já diferenciadas foram fixadas com PFA 4 % e em seguida processadas para imunofluorescência.

Utilizamos o anticorpo primário anti  $\beta$ -tubulina III (Sigma - 1:500), diluído em solução de bloqueio (2% de soro normal de cabra e 0,1% de TritonX-100 em PBS). Nessa solução, as células foram incubadas por 2h, e após lavagens com PBS foram incubadas em solução com anticorpo secundário fluorescente Alexa 555 (1:600; Invitrogen). Após lavagens com PBS, os núcleos foram corados com DAPI e as lâminas foram fechadas com DPX e analisadas em microscópio de fluorescência utilizando o *software de captura NeuroLucida*. Realizamos o protocolo de diferenciação seguido de imunofluorescência para  $\beta$ -tubulina III por três vezes e a cada experimento foi feito a diferenciação das células em triplicata. A partir das imagens capturadas das duplas marcações de DAPI/ $\beta$ -tubulina III, que totalizaram 30 campos sendo 10 campos referentes a soma das três triplicatas de cada experimento, realizamos uma análise da porcentagem dos marcadores de  $\beta$ -tubulina III em relação ao total de células contidas nos campos analisados (coradas com DAPI).

#### **4.7. RT e PCR em tempo real**

A técnica de PCR quantitativa em tempo real foi utilizada para investigar a expressão dos genes *Dlx1*, *Lhx6* e *Nkx2.1* nos quatro diferentes tipos de cultura, sendo eles expressos em abundância da região da EGM.

A primeira etapa consiste em realizar a extração de RNA (ácido ribonucleico). Foram extraídas amostras de RNA de neuroesferas cultivadas nas quatro diferentes condições de cultura, assim como da região da EGM recém extraída e do corpo de embriões de 14,5 dias. As neuroesferas foram retiradas das garrafas de cultivo, colocadas em *ependorf* e centrifugadas a 1500 rpm por 7 minutos para ser retirado o sobrenadante. Em seguida, foi adicionado 1mL de TRIzol (Invitrogen), tanto nas amostras de neuroesferas, como nas amostras que continham o tecido das regiões extraídas dos embriões de 14,5 dias. Após a homogeneização das amostras as mesmas foram congeladas a -80°C.

As amostras foram descongeladas e adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio e os tubos foram agitados por 15 segundos. Em seguida, realizamos uma centrifugação por 30 minutos a 4 °C a 12.000 x g a fim de obter três fases. A fase transparente, que contém o RNA, foi transferida para um tubo contendo 0,5 mL de isopropanol gelado para precipitar o RNA. Novamente as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. O RNA precipitado foi lavado com 800 µL de etanol 70% e centrifugado. O etanol foi retirado e após o *pellet* de RNA secar, o mesmo foi ressuspenso em 20 µL de água.

Como controle de qualidade dosamos a quantidade de RNA total presente nas amostras por meio de um espectrofotômetro (NanoDrop – Thermo Scientific) e verificamos a integridade com base nas bandas de RNA ribossômico presentes em gel de agarose.

A segunda etapa consiste na RT-PCR que é realizada para obtenção de DNA (ácido desoxirribonucleico) complementar a partir do RNA. Utilizamos a enzima transcriptase reversa Super Script III (Invitrogen). Um volume contendo 2 µg do RNA total de cada amostra foi utilizado para esse preparo, além disso, foi reservado uma pequena quantidade de RNA para o controle negativo da reação da transcriptase reversa, no qual a enzima estava ausente. Em seguida, foram adicionados os outros componentes da reação, um Mix de dNTP e Random Primer (OligodT - 500 µg/mL, dNTP - 10 mM, Random Primer - 100 µg/µl e água). Em seguida, as amostras foram incubadas em termociclador a 65 °C por 5 minutos. Após um minuto no gelo,

adicionou-se o Mix da Super Script III (inibidor de RNase - 40 U/ $\mu$ l, DTT - 0,1mM, tampão para RT 5x, enzima transcriptase reversa SuperScript III - 200 U/ $\mu$ L e água). As amostras foram colocadas novamente em termociclador, obedecendo às seguintes condições: 25 °C por 10 minutos, 55 °C por 60 minutos, 70 °C por 15 minutos e 4 °C por tempo indeterminado. Depois disso, o DNA complementar foi armazenado a -80 °C.

Para a realização do PCR quantitativo foram desenhados os primers com amplicon de 100 a 200 pares de bases. Os primers foram testados quanto a sua eficiência e os que apresentaram boa eficiência (> 95%) na curva padrão do PCR em tempo real foram utilizados no experimento. Os genes analisados estão descritos na tabela 3. A medida de cada amostra foi feita em triplicata e foi utilizado o reagente SYBR Green (Applied Biosystems, USA) para a quantificação do transcrito em cada amostra. Os componentes da reação foram: SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA), *forward primer* (200 nM), *reverse primer* (200 nM), água e DNA complementar (10 ng/ $\mu$ l). As condições de ciclagem foram: 95 °C por 10 minutos, 95 °C por 40 segundos e 60 °C por 1 minuto, por 40 ciclos. O equipamento utilizado foi o 7500 Real-Time PCR System da Applied Biosystems.

A quantificação relativa do mRNA foi realizada usando o método de limiar comparativo (Pfaffl et al., 2002). A quantidade do gene alvo foi normalizada pelos genes GAPDH e HPRT e depois relacionada ao controle experimental (FAT), por meio da fórmula  $e^{-\Delta\Delta C_t}$ , onde “e” é a eficiência do gene determinada pela curva padrão e “Ct” é o ciclo quantitativo da PCR. Os dados foram expressos como uma diferença de n-vezes em relação à expressão do controle.

Tabela 2. Genes analisados por PCR em tempo real

<b>Gene</b>	<b>Forward primer (5'- 3')</b>	<b>Reverse primer (5'- 3')</b>
Dlx1	AGTTCCGTGCAGTCCTACCC	GCCGTTAAAGCGCACTTCTC
Lhx6	TGCAGAAGCTAGCGGACATGACG	GATGTAGCCGTGCAAGGTGACCA
Nkx2.1	AGGACACCATGCGGAACAG	GGCCATGTTCTTGCTCACG
GAPDH*	AAGAAGGTGGTGAAGCAGGCATCT	ACCCTGTTGGTGTAGCCGTATTCA
HPRT*	CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC	GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC

\*GAPDH e HPRT foram usados como genes normalizadores interno

## **Parte II - *In vivo***

### **4.8. Grupos experimentais**

A parte *in vivo* consiste no transplante de células dissociadas de neuroesferas oriundas da EGM em animais previamente induzidos ao modelo de pilocarpina, mais precisamente no período epileptogênico, ou seja, 7 a 10 dias após o SE.

Para a realização do transplante, utilizamos células que foram cultivadas nas condições CAR AR, baseado nos resultados *in vitro*, que descreveremos em detalhes no próximo tópico, esta condição apresentou a maior porcentagem de neurônios, e FAT representando a condição padrão de cultura de neuroesferas, formando assim os grupos:

- 1) Pilo FAT;
- 2) Pilo CAR AR.

Além desses grupos temos também os grupos:

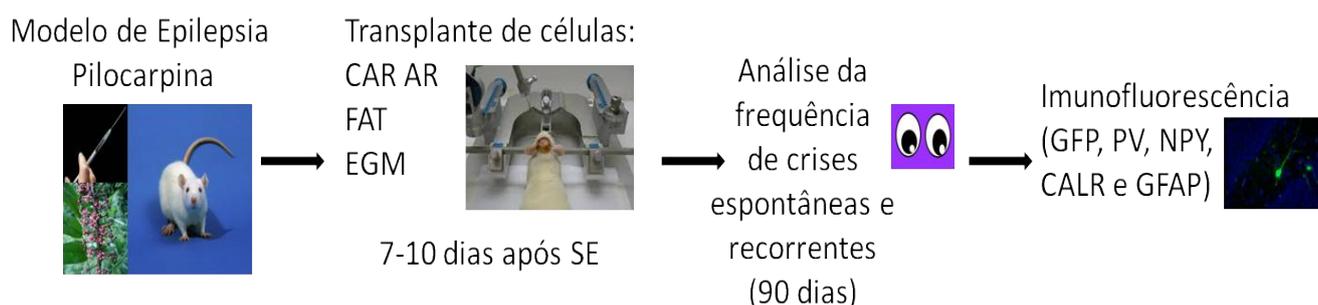
- 3) Pilo CTRL que recebeu DMEM-F12 no lugar de células;
- 4) Pilo EGM, transplantado com células da EGM imediatamente após a extração, que chamamos de “frescas”, ou seja, sem passar pela fase de proliferação em cultura (Tabela 3).

Tabela 3. Grupos (*in vivo*)

Grupos de animais epiléticos	Células Transplantadas
Pilo CTRL	-----
Pilo CAR AR	Neuroesferas - CAR AR
Pilo FAT	Neuroesferas - FAT
Pilo EGM	Frescas

Tabela 3. Grupos *in vivo*. O nome dos grupos indica as células utilizadas para cada grupo de animais epiléticos.

**Figura 7. Desenho experimental 2.**



**Figura 7. Desenho experimental 2.** Ilustração e esquema dos experimentos realizados *in vivo*.

#### 4.9. Modelo de indução de epilepsia – administração de pilocarpina

No modelo experimental da pilocarpina, os animais são submetidos ao SE por administração i.p. de pilocarpina. Resumidamente, ratos Sprague Dawley com aproximadamente 10 semanas receberam injeção de pilocarpina, via intraperitoneal (i.p.), na dose de 320 mg/kg. Dez minutos antes da administração de pilocarpina, os animais foram pré-tratados com metil-escopolamina (i.p.), na dose de 1 mg/kg, para bloquear a ação periférica da pilocarpina. Os animais desenvolveram SE por 90 minutos e após esse período foram tratados com Tionembutal® (25 mg/kg, i.p.) para interromper o SE e reduzir a alta taxa de mortalidade.

#### **4.10. Procedimento cirúrgico para injeção intra-hipocampal de células precursoras neurais**

No dia da cirurgia, as neuroesferas da EGM cultivadas nas condições de cultivo CAR AR e FAT, como descrito no item 4.3., foram preparadas para o transplante. Inicialmente, realizamos a retirada do excesso de meio de cultura e a adição de tripsina EDTA por 7 minutos a 37 °C graus, em seguida foi adicionado soro fetal bovino e as células foram mecanicamente dissociadas com a ajuda de micropipetas. Para a remoção dessa solução, as células foram lavadas com DMEM-F12, seguida de uma centrifugação a 1500rpm por 7 minutos e ressuspensas na densidade de aproximadamente 100.000 células/ $\mu$ L. Por outro lado, o preparo das células da região da EGM que não passaram pela cultura foi diferente, pois as células foram preparadas e transplantadas logo após a extração. O tecido retirado foi mecanicamente dissociado por repetidas pipetagens em 200 $\mu$ L de meio de cultura DMEM-F12. As células foram dissociadas novamente adicionando DNase no DMEM-F12, em seguida, foram centrifugadas a 1500rpm por 7 minutos e o *pellet* foi ressuspensão na densidade de aproximadamente 100.000 células/ $\mu$ L.

Para a contagem das células, utilizamos *Trian Blue*, a fim de avaliar a viabilidade celular (>90%). Para preservar a viabilidade das células, as mesmas foram mantidas em gelo durante a cirurgia.

Os animais que sobreviveram ao SE foram operados no período epileptogênico, entre 7 e 10 dias após o SE. Os mesmos foram profundamente anestesiados com Xilazina (10 mg/kg) e Cetamina (80 mg/kg) misturadas na mesma seringa (i.p.), e 400.000 células por animal foram injetadas no hipocampo, mais especificamente no giro denteado (GD), (Pilo CAR AR n= 12, Pilo FAT n=13 e Pilo EGM n=12), em ambos os hemisférios cerebrais, seguindo as seguintes coordenadas: - 4,0mm (AP), +/- 3,0 mm (mL), -3.5 mm (DV), por meio de uma agulha gengival acoplada a uma seringa Hamilton de 10 $\mu$ L presa ao estereotáxico. As células foram administradas em um volume total de 4  $\mu$ L, à velocidade de aproximadamente 1  $\mu$ L por minuto. Após a infusão das células, a agulha permaneceu no local por mais 2 minutos a fim de evitar o refluxo da solução. Animais epiléticos que formaram o grupo Sham (Pilo CTRL n=13) para observação das crises receberam somente DMEM-F12 no mesmo período e sítio de injeção.

Durante todo o processo cirúrgico tomou-se cuidado para evitar contaminação ou infecção, além disso, os ratos foram mantidos em local aquecido para recuperação pós-operatória e receberam antibiótico de ação prolongada (Pentabiótico pequeno porte; Fort Dodge) e analgésico (Ibuprofeno, 100 mg/mL; Medley Farmacêutica).

#### **4.11. Análise de frequência de crises epiléticas espontâneas e recorrentes.**

Aproximadamente 7 dias após a cirurgia, os animais foram colocados em gaiolas individuais e transparentes para a observação das CER por sistema de filmagem. Para as gravações, utilizamos um sistema de filmagem (Intelbras) composto por uma câmera, uma televisão e um HD, onde ficavam armazenadas as filmagens. O padrão e frequência das crises epiléticas foram avaliados e quantificados segundo a escala de Racine de classificação de crises (Racine et al., 1972), amplamente utilizada para classificar os estágios do SE e as crises crônicas do modelo de pilocarpina (Figura 8). Identificamos as crises generalizadas com manifestação comportamental que corresponde aos estágios 4 e 5. Os animais transplantados com células e seus respectivos controles foram monitorados por 90 dias, 9h/dia, totalizando 810h de observação.

**Figura 8. Escala de Racine**

<b>ESCALA DE RACINE</b>	
<b>Estágio 0</b>	<b>- Imobilidade</b>
<b>Estágio 1</b>	<b>- Automatismos Faciais</b>
<b>Estágio 2</b>	<b>- Mioclonias de cabeça e pescoço</b>
<b>Estágio 3</b>	<b>- Clonia das patas anteriores</b>
<b>Estágio 4</b>	<b>- Clonia das patas com levantamento e queda</b>
<b>Estágio 5</b>	<b>- Atividade tônico-clônica generalizada com perda do tônus postural.</b>

**Figura 8. Escala de Racine.** Classificação das crises segundo Racine. (Racine et al., 1972)

#### **4.12. Implantação de eletrodos**

Terminado o período de aproximadamente 90 dias após as filmagens, os animais pertencentes aos grupos: pilo CTRL (n= 7), pilo CAR AR (n= 6), pilo FAT (n=7) e pilo EGM (n=6), foram submetidos novamente a cirurgia estereotáxica e receberam implante de eletrodos para registro eletroencefalográfico.

Na cirurgia de implante, os ratos foram profundamente anestesiados com Xilazina (10 mg/Kg) e Cetamina (80 mg/Kg) misturadas na mesma seringa (i.p.). Para registrar EEG cortical foi implantado um par de eletrodos feitos de dois parafusos de aço inox, 1,4 mm de diâmetro. Um eletrodo foi implantado + 2,5 mm anterior do bregma e + 3,0 mm lateral da linha média. O outro foi implantado no lado contralateral, + 2,5 mm anterior do bregma e - 3,0 mm lateral da linha média. Para registro do hipocampo usamos dois fios de 76 µm de diâmetro (aço inoxidável 304, Califórnia Fine Wire), isolados por teflon exceto pelo 1 mm da extremidade. Os fios foram colados paralelamente com cola de cianoacrilato. O conjunto foi implantado - 3,3 mm anterior do bregma, + 2,5 mm lateral da linha média, e - 3,5 mm ventral do superfície do cérebro, e fixado novamente com cola de cianoacrilato. Os eletrodos foram implantados através de orifícios feitos na calota craniana com auxílio de equipo odontológico e os orifícios variaram de 1 a 1,5 mm.

Eletrodos corticais e hipocampais foram conectados ao soquete tipo latch, fêmea, e foram implantados dois parafusos adicionais para produzir um suporte mais firme para o soquete. O soquete foi fixado no crânio com cimento acrílico dentário. Durante todo o processo cirúrgico tomou-se cuidado para evitar contaminação ou infecção, além disso, os ratos foram mantidos em local aquecido para recuperação pós-operatória e receberam antibiótico de ação prolongada (Pentabiótico pequeno porte; Fort Dodge) e analgésico (Ibuprofeno, 100 mg/mL; Medley Farmacêutica). Os cuidados com os animais duraram por aproximadamente uma semana, após esse período de recuperação iniciamos os registros eletroencefalográficos por 24h durante 7 dias.

#### **4.13. Eletroencefalograma (EEG)**

Os ratos foram conectados aos amplificadores através de um conector elétrico rotatório, permitindo movimento livre. Os fios foram protegidos por uma mola. Amplificadores de EEG foram adaptados de Dobrev e colaboradores (Dobrev et al., 2008). Foi usada a faixa de frequências de 0,1 - 300 Hz. Para reduzir 60 Hz foi usado um filtro notch de um Cyber Amp 380. Os sinais foram digitalizados em 1000 Hz com um Power Lab. Para redução adicional de 60 Hz e harmônicos foi usado o filtro adaptativo do Power Lab. Para analisar os registros utilizamos o Labchart 7.

As crises foram identificadas no registro hipocampal por análise spectral utilizando os seguintes critérios: 1) a potência total na faixa de 5 – 20 Hz, 2) a potência total na faixa de 20 – 40 Hz, e 3) a frequência na faixa de 1 – 20 Hz com maior potência. Para isso usamos transformada de Fourier, com 1024 pontos (1,024 s), e uma janela Hann. Trechos do registro cumprindo os 3 critérios seguintes: 1) potência total entre 5 e 20 Hz acima de  $2.009^2 \mu\text{v}$  2) potência total na faixa de 20 - 40 Hz acima  $2.010^2 \mu\text{v}$ , e 3) frequências mais potentes maiores que 7 Hz foram marcados como crise potencial. Regiões com duração menor que 5s foram descartadas. As regiões definidas como crise potencial foram analisadas visualmente para confirmar se o evento identificado era de fato uma crise ou um artefato.

#### **4.14. Imunofluorescência**

Os animais foram eutanasiados 120 dias após o transplante, por anestesia profunda com tionembutal (50 mg/kg, i.p.), e os tecidos fixados por perfusão transcardíaca. Iniciou-se a perfusão com 150mL de solução salina (0,9% NaCl) e a seguir foram passados 300mL de paraformaldeído (4%). Os encéfalos foram removidos do interior do crânio, imersos em paraformaldeído por 1 dia e a seguir em solução hipertônica de sacarose (30%) para crioproteção. Secções coronais consecutivas do encéfalo (30  $\mu\text{m}$ ) foram obtidas em criostato e armazenadas em temperatura de -20 °C, imersas em solução anti-congelante (500mL PBS, 500mL H<sub>2</sub>O, 1,59g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5,47g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300g sacarose, 300mL etilenoglicol) até o processamento para imunofluorescência. As células transplantadas foram examinadas através da marcação do anticorpo anti-GFP (1:600), dos marcadores de interneurônios inibitórios anti-NPY (1:1000), anti-PV (1:1000) , anti-CR (1:200) e de

astrócitos anti-GFAP para verificarmos a diferenciação das células transplantadas nesses tipos celulares. Brevemente, os cortes foram lavados com PBS e incubados em anticorpo primário *overnight*. No dia seguinte, os cortes foram incubados em anticorpo secundário conjugado com fluorocromos (Alexa 488 e Alexa 546), seguido de lavagens. As lâminas foram fechadas com DPX e posteriormente foram analisadas por microscópio de fluorescência utilizando o software de captura *Neurolucida*.

Para a realização da contagem de células foram selecionadas 5 secções coronais da região do hipocampo, localizadas entre o bregma -3,0 até -4,8, de cada animal que recebeu transplante celular, apresentou pelo menos uma crise espontânea e sobreviveu as cirurgias de implante de eletrodos (Pilo CAR AR n=6, Pilo FAT n=6 e Pilo EGM n=4). Dessas 5 secções selecionadas, foram capturadas 10 imagens, bilateral, das regiões do CA1 e Giro Denteado. A partir das imagens contendo células duplamente marcadas (GFP<sup>+</sup>/PV<sup>+</sup>, GFP<sup>+</sup>/NPY<sup>+</sup>, GFP<sup>+</sup>/CR<sup>+</sup> e GFP<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup>) realizamos uma análise da porcentagem dos marcadores de PV, NPY, CR e GFAP em relação ao total de células GFP<sup>+</sup> contidas nos campos analisados. Além disso, por meio dessas imagens analisamos a quantidade de células GFP<sup>+</sup>.

#### **4.15. Análises estatísticas**

Para a análise estatística referente aos dados da parte *in vitro* utilizamos o teste Kruskal-Wallis com post hoc Games Howell feito no programa PASW Statistics 1.9. Para a análise dos resultados *in vivo* foi utilizado o teste ANOVA com post hoc Dunn, ANOVA de medidas repetidas, Kruskal-Wallis com post hoc Games Howell feito no programa Graphpad Prism e análises de porcentagens.

## **5. Resultados**

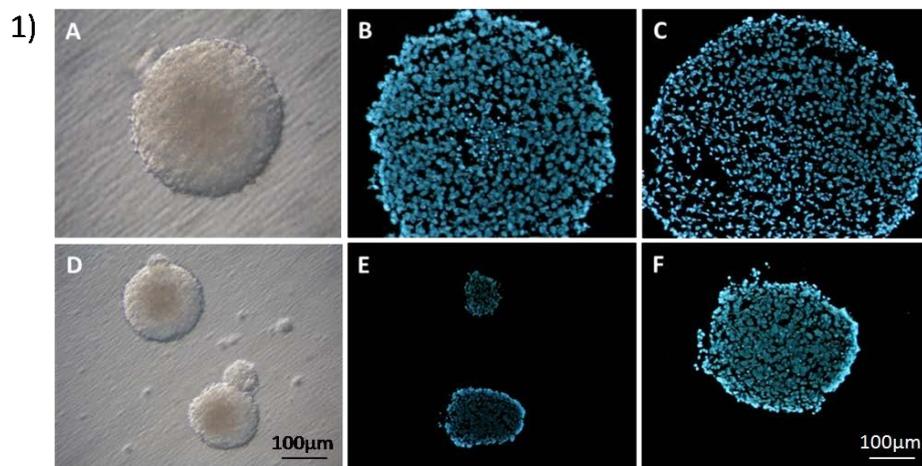
### **5.1. IN VITRO**

Os resultados descritos a seguir foram realizados com células oriundas da EGM de embriões de 14 dias cultivadas como neuroesferas, e visam responder se as modificações no meio de cultivo, como a presença ou a ausência de EGF/FGF2 e /ou AR, podem alterar a população de células neurais expandidas *in vitro*.

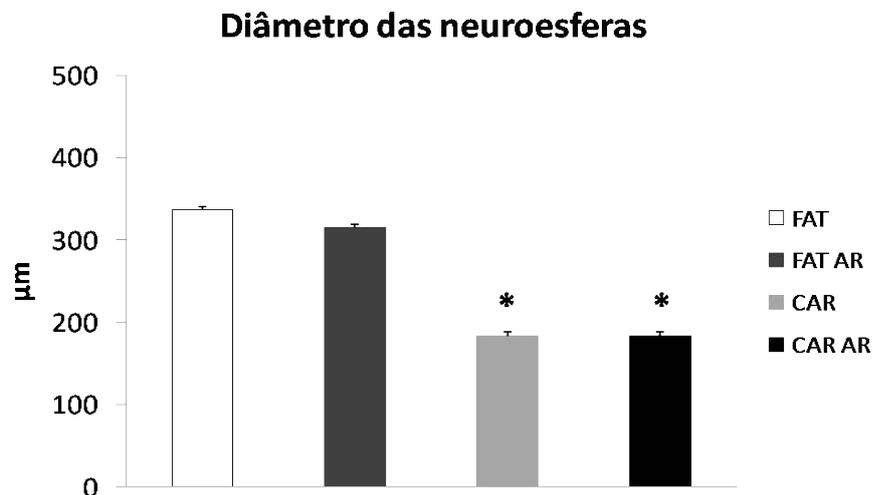
#### **5.1.1. Avaliação do tamanho das neuroesferas da EGM cultivadas nas quatro diferentes condições de cultura.**

As neuroesferas cultivadas em meios modificados pela remoção de EGF/FGF2 e/ou AR por sete dias apresentaram diferenças em relação ao tamanho. Ao mensurar o diâmetro de neuroesferas pertencentes às quatro diferentes condições experimentais, encontramos um tamanho médio de 33,68 µm de diâmetro para a condição FAT; 31,51 µm para a condição FAT AR; já as neuroesferas nas condições CAR e CAR AR apresentaram um tamanho médio de 18,35 µm e 18,40 µm, respectivamente. Sendo assim, os agregados celulares cultivados na presença de fatores de crescimento com ou sem AR (FAT e FAT AR) possuem tamanho maior comparado as neuroesferas que não foram cultivadas com os fatores de crescimento (CAR e CAR AR) ( $p < 0,05$ ). Isso sugere que a ausência de fatores de crescimento diminuiu significativamente o tamanho das neuroesferas. No entanto, a presença do AR na cultura não influenciou de maneira significativa o tamanho das mesmas (Figura 9).

**Figura 9. Tamanho das neuroesferas**



2)



**Figura 9. Tamanho das neuroesferas.** Comparação do tamanho das neuroesferas entre as condições experimentais. 1- Imagem ilustrando o tamanho de neuroesferas após os sete dias de cultivo na presença de diferentes condições experimentais. A, D) Imagens das neuroesferas em cultura (DIC), aumento 100X; A) condição FAT e D) condição CAR. Imagens de secções das neuroesferas coradas com DAPI (B, C, E, F), aumento 200X; B) condição FAT, C) condição FAT AR, E) condição CAR e F) condição CAR AR. Barra de escala 100µm. 2- Gráfico representando a média do diâmetro das neuroesferas nas 4 condições de cultivo. A condição CAR e a condição CAR AR apresentaram uma diferença estatística significativa com relação aos grupos FAT e FAT AR ( $p < 0,05$ ), representado pelo asterisco (\*). Dados representados por média e erro padrão. Kruskal Wallis com Post-Hoc Games Howell ( $n = 20$  esferas por grupo).

### **5.1.2. Avaliação dos tipos celulares presentes em neuroesferas da EGM cultivadas em diferentes condições de cultura.**

Os fatores tróficos EGF e FGF2 podem influenciar o destino das células progenitoras neurais. Conforme estudo prévio, a remoção desses fatores de crescimento da cultura de neuroesferas aumenta significativamente a diferenciação neuronal (Schwindt et al., 2009).

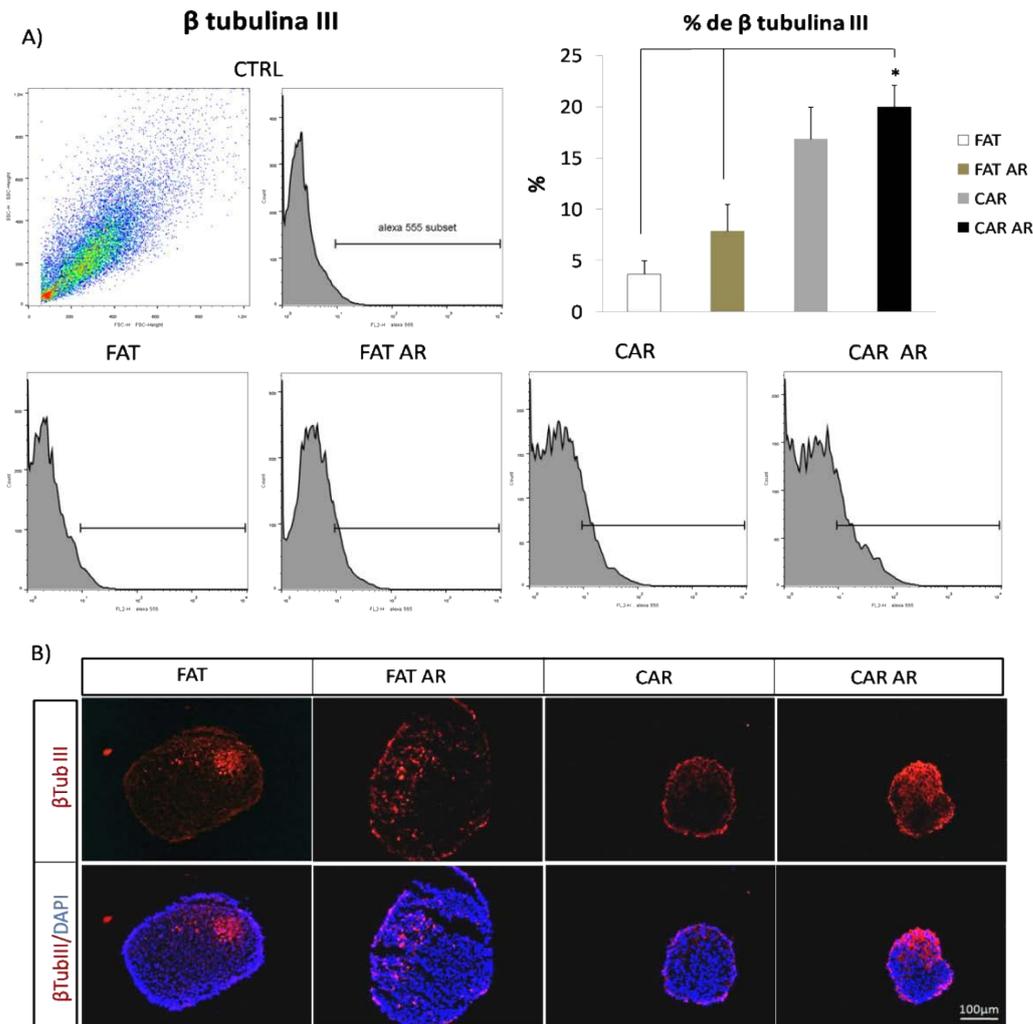
A fim de obter informações sobre a proporção das principais populações de células da linhagem neural presentes nas neuroesferas, como células gliais (GFAP-positivas), neurônios ( $\beta$ -tubulina III-positivos) e progenitores neurais (Nestina-positivos), o que permite identificar a condição mais favorável à diferenciação neuronal, foi realizada uma análise por citometria de fluxo com as células dos agregados celulares nas quatro diferentes condições de cultivo.

A citometria de fluxo avaliou a proporção de células que expressam  $\beta$ -tubulina III entre as neuroesferas nas quatro diferentes condições de cultivo, e indicou que a porcentagem de células positivas para  $\beta$ -tubulina III foi maior no grupo CAR AR (20%), sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) com relação as condições FAT (3,7%) e FAT AR (7,8%). A segunda condição que apresentou maior porcentagem de  $\beta$ -tubulina III foi a CAR (16%), no entanto, a variação não foi suficiente para apresentar significância estatística comparada às condições FAT e FAT AR (Figura 10). Quanto à presença de precursores neurais e de células gliais (Figura 11 e 12), não encontramos uma diferença estatística significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ). No entanto, detectamos uma maior porcentagem de células GFAP positivas na condição FAT (33,58%), e uma menor porcentagem no grupo CAR AR (14,04%) (Figura 11). Já com o marcador de Nestina, o grupo que apresentou uma porcentagem maior de células marcadas foi o grupo FAT AR (30,82%), e uma menor porcentagem o grupo CAR AR (11,3%) (Figura 12). Adicionalmente, realizou-se imunofluorescência para os mesmos marcadores ( $\beta$ -tubulina III, GFAP e Nestina) (Figuras 10B, 11B, 12B) nas neuroesferas cultivadas nos quatro diferentes tipos de cultura e, corroborando os dados encontrados na citometria de fluxo, após uma análise qualitativa, o grupo CAR AR apresentou uma proporção maior de células marcadas para  $\beta$ -tubulina III, seguido do grupo CAR. (Figura 10B).

A população neuronal presente nas neuroesferas foi a única que se modificou, pois a presença de AR combinada com a ausência de fatores de crescimento (CAR

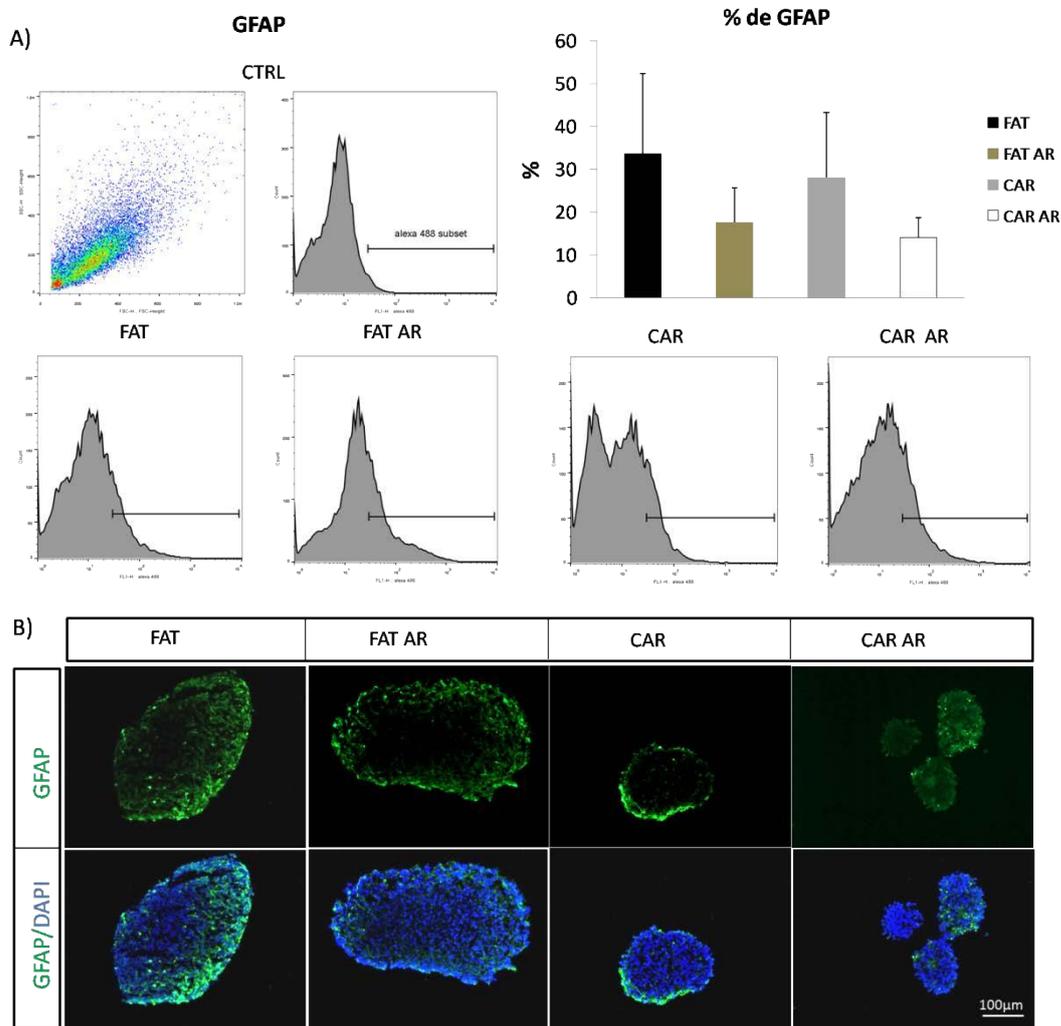
AR) gerou um aumento significativo da porcentagem de células positivas para  $\beta$ -tubulina III. As condições CAR e CAR AR se assemelham e, apesar da limitada capacidade de expansão celular, a ausência de fatores de crescimento determina uma preferência de diferenciação celular em neurônios, que pode ser potencializada pela ação do AR.

**Figura 10. Citometria e imunofluorescência para o marcador  $\beta$ -tubulina III**



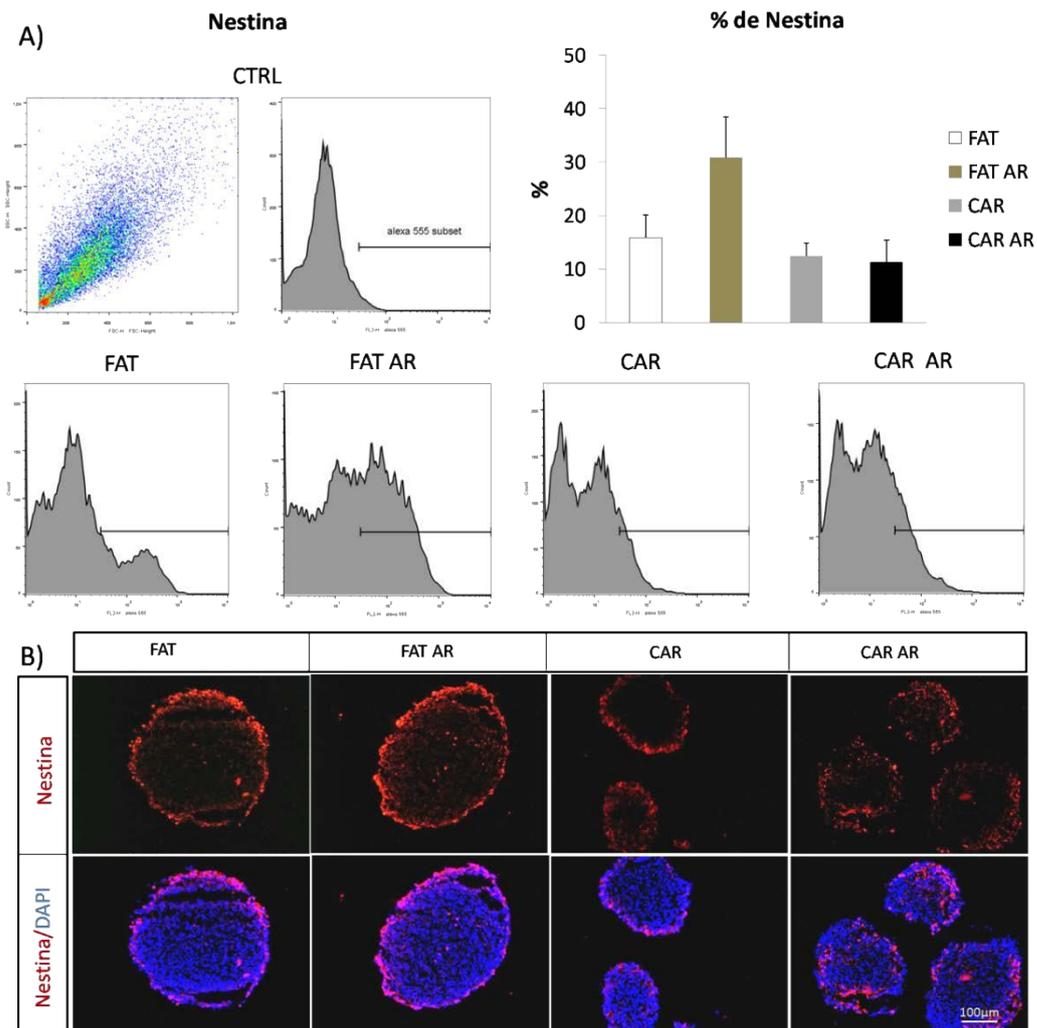
**Figura 10. Citometria e imunofluorescência para o marcador  $\beta$ -tubulina III.** A) Histograma e dot-plot controle do anticorpo secundário 555 utilizado na citometria. Logo abaixo estão os histogramas nas 4 condições de cultivo analisadas: FAT, FAT AR, CAR e CAR AR. Ao lado está o gráfico de barras indicando a porcentagem de células  $\beta$ -tubulina III<sup>+</sup> em cada grupo. A condição CAR AR apresentou uma diferença estatística significativa com relação aos grupos FAT e FAT AR (\*),  $p < 0,05$ . Kruskal Wallis com Post-Hoc Games Howell. Dados obtidos em 3 experimentos independentes utilizando *pool* de neuroesferas. B) Imunofluorescência de seções de neuroesferas marcadas para  $\beta$ -tubulina III (vermelho) e coradas com DAPI (azul) nas 4 condições de cultivo avaliadas. Objetiva (20X). Barra de escala = 100 $\mu$ m.

**Figura 11. Citometria e Imunofluorescência para o marcador GFAP**



**Figura 11. Citometria e imunofluorescência para o marcador GFAP.** A) Histograma e dot-plot controle do anticorpo secundário 488 utilizado na citometria. Logo abaixo estão os histogramas nas 4 condições de cultivo analisadas: FAT, FAT AR, CAR e CAR AR. Ao lado está o gráfico de barras indicando a porcentagem de células GFAP<sup>+</sup> em cada grupo. Não houve diferença estatística significativa. Kruskal Wallis com Post-Hoc Games Howell. Dados obtidos em 3 experimentos independentes utilizando *pool* de neuroesferas. B) Imunofluorescência de neuroesferas para a marcação de GFAP (verde) e coradas com DAPI (azul) nas 4 condições de cultivo avaliadas. Objetiva (20X). Barra de escala = 100µm.

**Figura 12. Citometria e Imunofluorescência para o marcador Nestina**



**Figura 12. Citometria e imunofluorescência para o marcador Nestina.** A) Histograma e dot-plot controle do anticorpo secundário 555 utilizado na citometria. Logo abaixo estão os histogramas nas 4 condições de cultivo analisadas: FAT, FAT AR, CAR e CAR AR. Ao lado está o gráfico de barras indicando a porcentagem de células Nestina<sup>+</sup> em cada grupo. Não houve diferença estatística significativa. Kruskal Wallis com Post-Hoc Games Howell. Dados obtidos em 3 experimentos independentes utilizando *pool* de neuroesferas. B) Imunofluorescência de neuroesferas para a marcação de Nestina (vermelho) e coradas com DAPI (azul) nas 4 condições de cultivo avaliadas. Objetiva (20X). Barra de escala = 100µm.

### **5.1.3. Análise da expressão relativa dos genes Dlx1, Lhx6 e Nkx2.1 em neuroesferas oriundas da EGM cultivadas nas quatro diferentes condições de cultura.**

Como já descrito na introdução, fatores de transcrição específicos como, Dlx1, Nkx2.1 e Lhx6, expressos no telencéfalo durante o desenvolvimento embrionário, são essenciais para a especificação de interneurônios inibitórios na região da EGM (Wonders & Anderson, 2006). Além de investigar a composição da população neural presente nas neuroesferas por citometria, verificamos se esses genes se mantêm expressos após expansão *in vitro* de células oriundas da EGM como neuroesferas e se as modificações realizadas nas condições de cultura modulam a expressão dos mesmos. Para tal, foi realizado PCR em tempo real a fim de quantificar a expressão relativa dos transcritos dos genes Dlx1, Nkx2.1 e Lhx6 entre as neuroesferas em condições distintas, utilizando a condição FAT como referência. Para cumprir o objetivo deste experimento, foram utilizadas amostras recém extraídas da EGM como um padrão de expressão fisiológica positiva de expressão gênica e, no outro extremo, foi utilizado um fragmento do corpo do embrião como um controle negativo (CORPO).

Dentre as diferentes condições em que cultivamos as células da EGM como neuroesferas, a condição CAR AR (*fold change* = 39) apresentou maiores níveis de expressão de Dlx1, chegando a ser 2 vezes mais expresso quando comparado ao grupo CAR (*fold change* = 19) , 19 vezes mais expresso quando comparado ao grupo FAT AR (*fold change* = 2) e 39 vezes quando comparado ao grupo FAT (*fold change* = 1). Em resumo, a condição CAR AR, dentre as condições de cultivo, apresentou maiores níveis de expressão de Dlx1, enquanto as condições FAT e FAT AR apresentam uma perda pronunciada desse gene na população celular.

Ao analisar a expressão de Lhx6, nota-se que todos os grupos que tiveram as células da EGM cultivadas como neuroesferas mostraram uma redução significativa da expressão, sendo as condições FAT AR e FAT, as que apresentaram as diferenças mais discrepantes. As condições CAR (*fold change* = 37) e CAR AR (*fold change* = 32) apresentaram um padrão de expressão bastante similar, sem diferença significativa entre eles, e apesar de apresentar baixa expressão em relação ao grupo EGM, quando comparados ao grupo FAT AR (*fold change* = 2) podemos dizer que para ambos os grupos houve um aumento significativo da expressão, sendo ela de

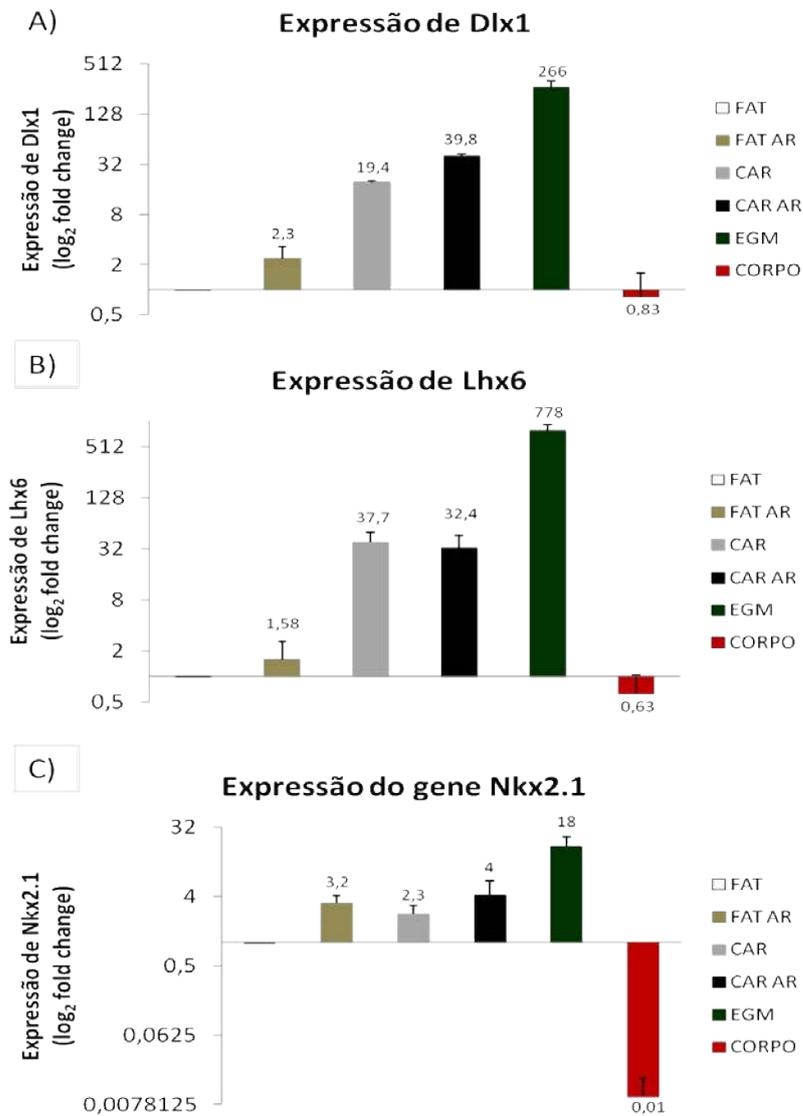
24 vezes para o grupo CAR e 21 vezes para o grupo CAR AR. Quando os grupos CAR e CAR AR são comparados ao grupo FAT esse aumento se torna ainda mais significativo chegando a ser 37 e 32 vezes mais expresso, respectivamente.

Os dados da expressão relativa de Nkx2.1, indicaram que houve um aumento da expressão desse gene nas diferentes condições de cultura quando comparados a condição padrão FAT, porém o maior aumento de expressão foi encontrado na condição CAR AR que se mostrou 4 vezes mais expresso (*fold change* = 4).

Como o esperado, observamos níveis de expressão bastante reduzidos dos três genes analisados no grupo CORPO, utilizado como controle negativo, quando comparado as demais condições. Por outro lado, as células recém extraídas da EGM apresentaram alto nível de expressão para todos os transcritos investigados. Como visto, ocorreu uma redução significativa da expressão quando as células foram colocadas em cultura para proliferar como neuroesferas. A condição FAT foi a que apresentou as reduções mais proeminentes de expressão quando comparado com as células da EGM. Os dados analisados indicam que as células da EGM expressam 266 vezes mais Dlx1, 788 vezes mais Lhx6 e 18 vezes mais Nkx2.1, quando comparados com as células da condição FAT. Diferente da condição FAT, a condição CAR AR não teve uma redução expressiva quando comparadas às células da EGM, sendo esta, a condição que apresentou a maior expressão dos genes avaliados. As células da EGM expressaram apenas 6 vezes mais Dlx1, 24 vezes mais Lhx6 e 4 vezes mais Nkx2.1.

De acordo com os resultados obtidos através da técnica de PCR em tempo real, podemos dizer que as células da EGM cultivadas como neuroesferas apresentam uma redução significativa na expressão desse conjunto de três genes que são importantes na determinação fenotípica dos interneurônios inibitórios. Apesar da significativa redução de expressão dos genes, as modificações realizadas no meio de cultivo foram suficientes para aumentar a expressão de Dlx1, Lhx6 e Nkx2.1 no grupo onde as neuroesferas foram cultivadas com AR e sem os fatores de crescimento (CAR AR) quando comparado aos grupos que tiveram a presença dos mesmos (FAT e FAT AR).

**Figura 13. Expressão relativa dos genes Dlx1, Nkx2.1 e Lhx6**



**Figura 13. Expressão relativa dos genes Dlx1, Lhx6 e Nkx2.1.**A-C) Expressão relativa dos transcritos que codificam para Dlx1(A), Lhx6 (B) e Nkx2.1(C) extraídos de células de neuroesferas mantidas nas 4 diferentes condições de cultivo por 7 dias. Como controles utilizamos a EGM recém-extraída (controle positivo de expressão) e partes do corpo de embriões de 14 dias (controle negativo). GAPDH e HPRT foram utilizados como controles endógenos e a condição FAT foi utilizada como referência pelo método de limiar comparativo ( $e^{-\Delta\Delta C_t}$ ). Dados expressos em escala log de base 2. Foram considerados resultados significantes diferenças com *fold change* de pelo menos 2. (n=2, em experimentos independentes).

#### **5.1.4. Investigação da população neuronal de células de neuroesferas após diferenciação.**

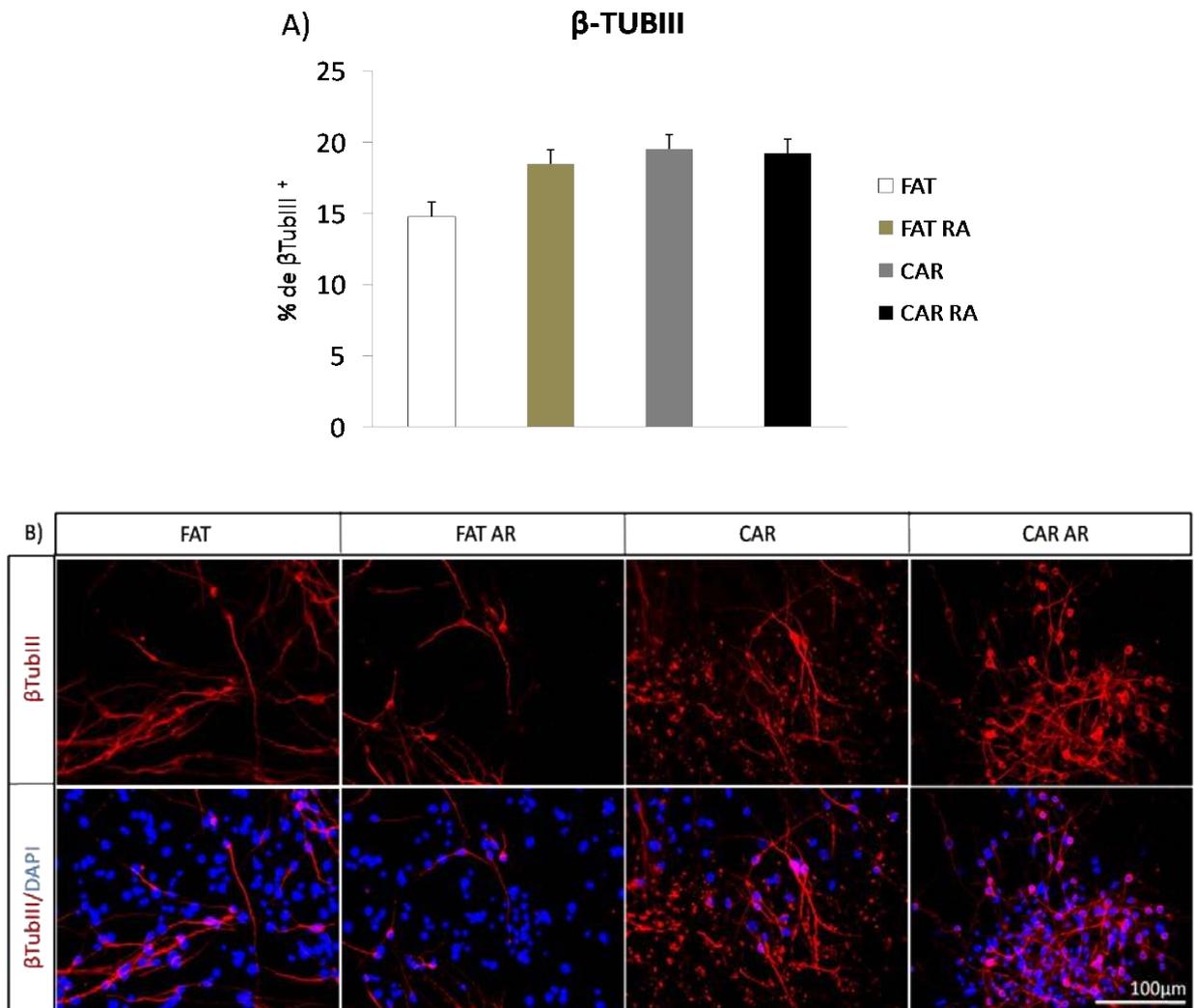
Resumidamente, o protocolo de diferenciação espontânea de progenitores neurais *in vitro* consistiu na adesão das células a uma matriz extracelular de poli-L-lisina e laminina, em meio de cultivo ausente de fatores de crescimento. Com a diferenciação das células das neuroesferas, verificamos se as modificações do meio de cultivo realizadas na fase proliferativa foram preservadas e se influenciam a fase de diferenciação das células regulando positivamente a diferenciação neuronal.

Após aproximadamente 10 dias em processo de diferenciação, as células das neuroesferas dos quatro diferentes tipos de cultura (FAT, FAT AR, CAR e CAR AR) foram processadas para imunofluorescência e realizou-se uma análise da porcentagem das células positivas para  $\beta$ -tubulina III em relação ao total de células contidas nos campos analisados (coradas com DAPI). A análise estatística não revelou qualquer diferença significativa no número de neurônios nas quatro diferentes condições de cultura. No entanto, a condição FAT foi a que apresentou a menor porcentagem de neurônios com 14,8% de células  $\beta$ -tubulina III<sup>+</sup>, seguida das condições FAT AR com 18,4%, CAR com 19,5% e CAR AR com 19,2% (Figura 14). Após a diferenciação *in vitro*, diferente dos resultados no qual as células se encontravam em agregados celulares, o efeito enriquecedor de diferenciação neuronal atribuído ao carenciamento e à adição de AR não apareceu de forma evidente como visto na fase de proliferação.

De um modo geral, a ausência de fatores de crescimento diminuiu a quantidade de células presentes nas neuroesferas. Além disso, não houve um aumento na proporção de neurônios após diferenciação nas diferentes condições de cultura avaliadas. Apesar disso, durante a fase de proliferação, em que as células são utilizadas para o transplante, a presença do AR, somado a ausência dos fatores de crescimento, favoreceu o aumento do número de neurônios nas neuroesferas, assim como, aumentou a expressão dos genes *Dlx1*, *Lhx6* e *Nkx2.1* de forma significativa. Dessa forma, esses dados sugerem que o grupo CAR AR possui as células com maior capacidade de manter características importantes das células da EGM em cultura, com um potencial promissor quando o objetivo é a obtenção de interneurônios inibitórios.

Com base nesses achados utilizamos as células cultivadas na condição CAR AR para o transplante em animais epiléticos. Alternativamente, utilizamos as células cultivadas na condição FAT (com fatores de crescimento e sem AR) como prova de conceito, pois esta condição produziu efeitos opostos à condição CAR AR, apresentando baixa expressão dos genes presentes em células da EGM e uma subpopulação neuronal reduzida nas neuroesferas. Comparando esses dois grupos que apresentaram comportamentos extremos investigamos se, após o transplante em animais, as mudanças ocorridas *in vitro* se mantiveram *in vivo*.

**Figura 14. Porcentagem de neurônios após diferenciação**



**Figura 14. Porcentagem de neurônios após diferenciação.** A) Gráfico indicando a porcentagem de neurônios baseado no número de células  $\beta$ -tubulina III<sup>+</sup> em relação ao número total (100%) de núcleos celulares (DAPI) nas 4 condições de cultivo. Dados representados por média e erro padrão. Kruskal Wallis  $p=0,8$ . B) Imunofluorescência das células diferenciadas nas condições FAT; FAT AR; CAR e CAR AR. As marcações para DAPI e  $\beta$ -tubulina III estão representadas em azul e vermelho, respectivamente. Objetiva (40x). Barra de escala = 100 $\mu$ m.

## 5.2. IN VIVO

Baseado nos dados obtidos *in vitro*, vimos que as modificações no meio de cultivo influenciam a população neural de neuroesferas derivadas da EGM. Selecionamos as células cultivadas como neuroesferas nas seguintes condições para serem transplantadas em animais epiléticos: CAR AR, com maior potencial de gerar interneurônios inibitórios, e FAT, com um menor potencial neurogênico. Além de utilizar células de neuroesferas derivadas da EGM, realizamos o transplante de células "frescas" também da EGM, que foram transplantadas imediatamente após a extração do embrião. Com isso, pretendemos elucidar nossos objetivos verificando se, após transplante *in vivo*, células da EGM cultivadas como neuroesferas reproduzem os resultados relacionados à diferenciação celular obtidos *in vitro*, além de investigar a eficiência de células da EGM submetidas a diferentes formas de tratamento (modificações no meio de cultivo - neuroesferas x células frescas) quanto à capacidade de reduzir a frequência de CER, indicando assim, a melhor alternativa como proposta de terapia para ELT.

### 5.2.1. Avaliação das crises epiléticas crônicas após transplante.

O modelo de epilepsia induzido por pilocarpina é um dos mais utilizados para se estudar a fase crônica da doença, permitindo avaliar a eficácia de um tratamento experimental de acordo com a frequência de CER. O objetivo dessa etapa foi verificar se as células utilizadas no transplante em animais epiléticos foram capazes de diminuir a frequência de crises.

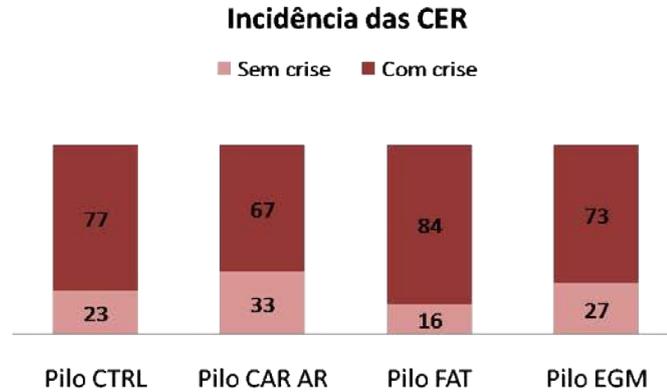
A indução do SE é uma das premissas para o desenvolvimento da epilepsia nesse modelo. Nossos dados indicaram que aproximadamente 80% dos animais desenvolveram SE após a administração de pilocarpina. No entanto, no intervalo de dois dias após SE, período em que os animais se encontram em um coma pós-ictal, tivemos uma mortalidade de 40%. Os animais sobreviventes foram transplantados com DMEM ou com células da EGM, previamente preparadas sob as condições pré-determinadas, formando os grupos Pilo CTRL, Pilo CAR AR, Pilo FAT e Pilo EGM.

A incidência, parâmetro que indica a presença/ausência de crises, mostrou que apenas 33% (4 de 12) dos animais do grupo Pilo CAR AR, 16% (2 de 12) dos animais do grupo Pilo FAT, 27% (3 de 11) dos animais do grupo Pilo EGM e 23% (3

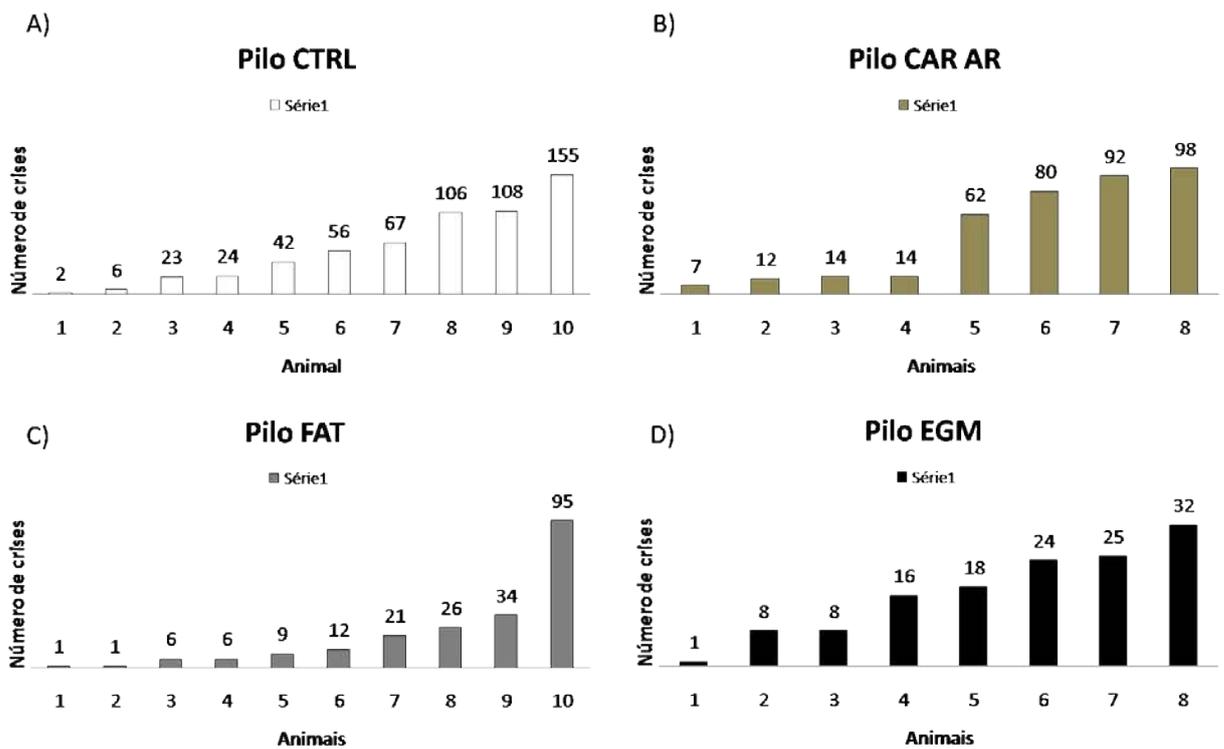
de 13) dos animais do grupo Pilo CTRL não apresentaram crises motoras espontâneas e recorrentes no período de avaliação das crises, apesar de terem vivenciado o SE no início da indução do modelo. O transplante de células tronco neurais, independente do método utilizado para o preparo das células, não foi capaz de zerar ou impedir o desenvolvimento das CER do tipo IV e V, pois o número de animais que não apresentaram esses tipos de crises foi semelhante nos quatro grupos analisados, e nenhuma diferença significativa em relação a incidência foi observada (Figura 15-1). Desta forma, a ausência de crises nesses animais não está relacionada ao tratamento experimental, e sim a uma irregularidade do modelo da pilocarpina. É sabido que, mesmo vivenciado o SE, alguns animais não apresentam CER. Nessa situação, alguns pesquisadores realizam uma observação prévia ao tratamento e selecionam somente os animais que apresentam crises comportamentais como candidatos ao estudo (Clasadonte et al., 2013; Leite & Cavalheiro, 1995; Salami et al., 2015; Ventura-Mejia & Medina-Ceja, 2014; Waldau et al., 2010). Diante disso, temos como critério de inclusão, para a análise da frequência de crises, animais que apresentaram pelo menos uma crise comportamental do tipo IV e/ou V detectada por vídeo no período de observação. Além disso, optamos por retirar os animais que não manifestaram CER do tipo IV e V, pois o parâmetro frequência não existe neste grupo, e tais animais não expressariam uma redução ou um aumento de crises. Optamos por ilustrar o número total de crises de cada rato para que possa ser visto a grande variabilidade na frequência das crises, um dos aspectos críticos do modelo da pilocarpina. Enquanto alguns animais apresentaram mais de cem crises comportamentais, outros do mesmo grupo experimental apresentaram apenas uma crise comportamental (Figura 15-2).

**Figura 15. Incidência e variabilidade das CER**

1) Incidência das Crises



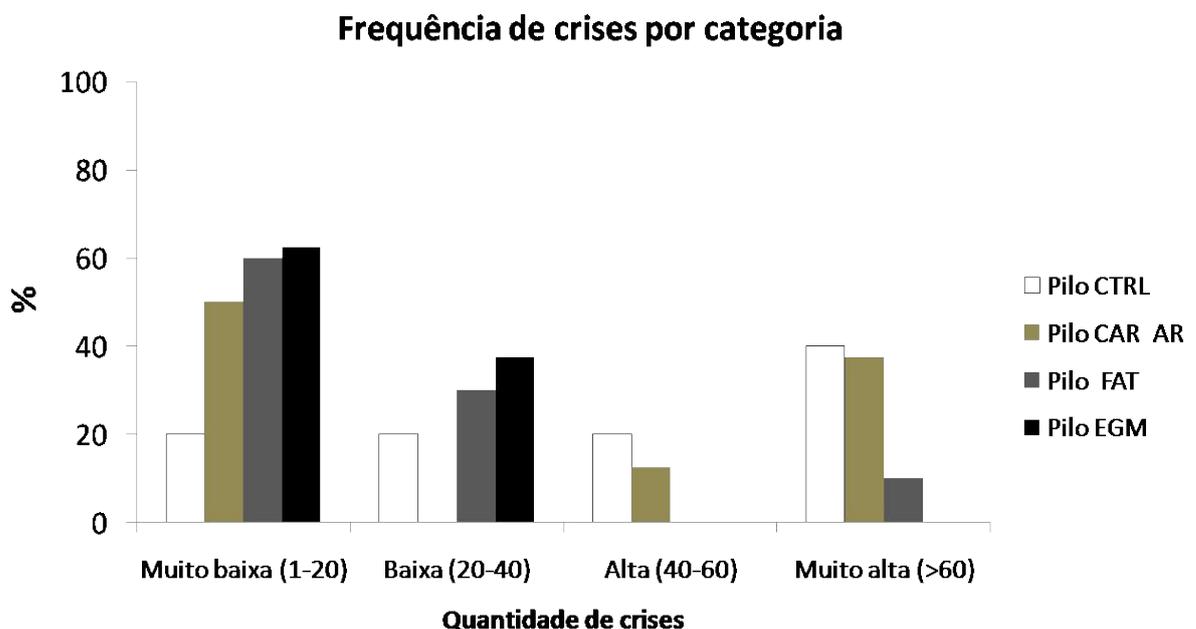
2) Variabilidade de frequência de crises



**Figura 15. Incidência e variabilidade de frequência das CER.** 1) Porcentagem de animais que apresentaram ou não CER para cada um dos grupos avaliados. 2) Número total de CER de cada rato durante o período de três meses de observação para os grupos Pilo CTRL (n=10) (A), Pilo CAR AR (n=8) (B), Pilo FAT (n=10) (C) e Pilo EGM (n=8) (D).

Diante da variabilidade da frequência de crises que os animais apresentaram, decidimos classificá-las de acordo com as seguintes categorias: muito baixa (1-20 crises), baixa (20-40 crises), alta (40-60 crises) e muito alta (>60 crises). Os animais foram distribuídos dentro dessas categorias de acordo com o número de crises observadas. Após a distribuição, identificamos que 60 % dos animais pertencentes ao grupo Pilo CTRL possuem alta (20%) ou muito alta (40%) frequência de crises. Por outro lado, 50% dos animais pertencentes ao grupo Pilo CAR AR possuem uma frequência de crises muito baixa e a outra metade uma frequência de crises alta (12,5%) ou muito alta (37,5%). Os animais pertencentes aos grupos Pilo FAT e Pilo EGM apresentaram, respectivamente, uma frequência de crise classificada como muito baixa (90%) e baixa (100%). Além disso, nenhum animal do grupo Pilo EGM apresentou uma frequência alta ou muito alta de crises (Figura 16).

**Figura 16. Categorização das CER**



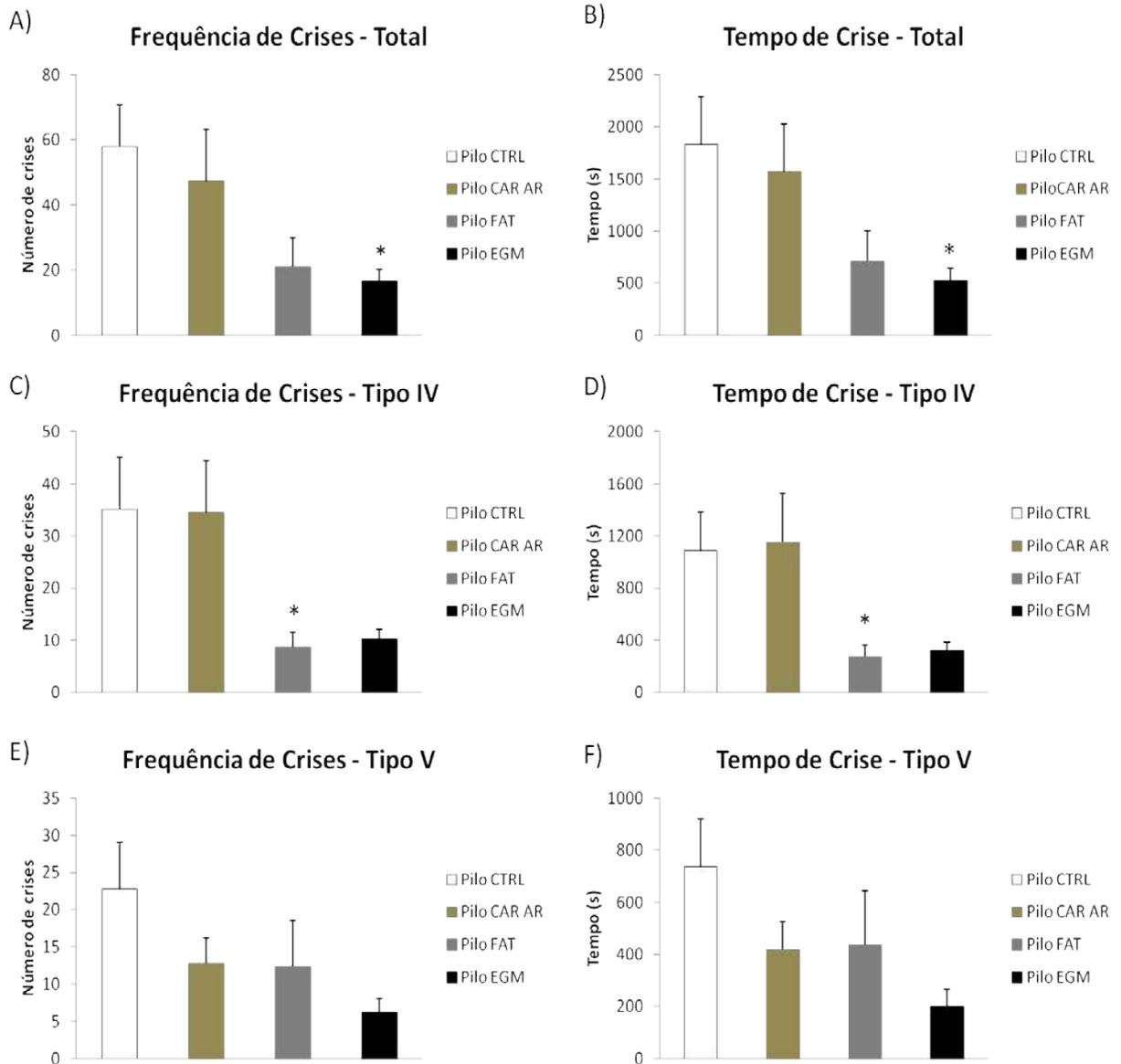
**Figura 16. Categorização das CER.** Representação da frequência de crises por categoria e porcentagem de animais pertencentes a cada categoria: muito baixa (1-20 crises), baixa (20-40 crises), alta (40-60 crises) e muito alta (>60 crises).

Os resultados da análise da frequência de crises por meio de categorização corroboram os dados estatísticos obtidos. Ao longo de 90 dias de observação, a

frequência total das crises foi maior no grupo Pilo CTRL, que apresentou uma média de 57,9 crises, o grupo Pilo CAR AR apresentou a segunda maior média, com 47,37 crises, seguido pelo grupo Pilo FAT com 21,1 e pelo grupo Pilo EGM que apresentou a menor média de crises, com 16,5 (Figura 17A). Os grupos Pilo CAR AR e Pilo FAT não diferiram de forma significativa do grupo controle, porém, o grupo Pilo EGM apresentou uma diminuição significativa na quantidade ( $p < 0,05$ ) e na duração das crises ( $p < 0,04$ ) quando comparado ao grupo Pilo CTRL (Figura 17A e 17 B). Apesar do grupo Pilo CAR AR apresentar uma alta frequência de crises, dentre os tratamentos avaliados, não observamos diferenças significantes na frequência e na duração das crises quando os três tratamentos foram comparados (Pilo CAR AR x Pilo FAT x Pilo EGM).

Além da frequência total, realizamos as análises de frequência de crises de acordo com a intensidade das mesmas, dividindo-as em crises do tipo IV e tipo V classificadas pela escala de Racine (Racine et al., 1972). Observamos uma diminuição significativa na frequência e duração de crises do tipo IV no grupo Pilo FAT quando comparado ao grupo Pilo CTRL ( $p < 0,05$ ) (Figura 17C e 17D), no entanto, não houve diferenças significantes quando esse grupo (Pilo FAT) foi comparado aos grupos Pilo CAR AR e Pilo EGM. O grupo Pilo CAR AR (34,5) teve uma média de crises do tipo IV (34,5) bastante similar as do grupo Pilo CTRL (35,1). Por outro lado, o grupo Pilo EGM apresentou uma redução das crises tipo IV (10,25), porém não foi o suficiente para ser significativa quando comparada aos demais grupos (Figura 17C). Quando analisamos as crises do tipo V, não encontramos diminuição significativa na frequência e duração das crises em todos os grupos, porém podemos dizer que o grupo Pilo EGM foi o grupo com menos crises do tipo V com uma média de 6,25 comparado ao grupo Pilo CTRL com 22,8. Os grupos Pilo CAR AR e Pilo FAT apresentaram praticamente as mesmas médias de crises do tipo V, sendo elas 12,8 e 12,4 respectivamente (Figura 17E e 17F).

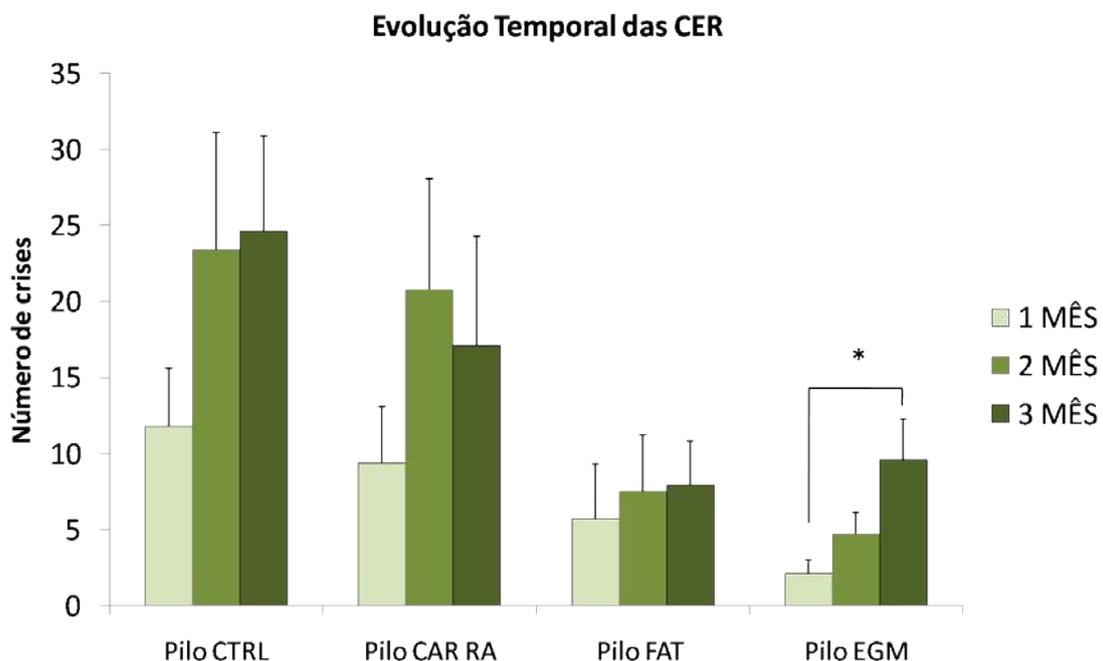
**Figura 17. Frequência e duração das crises**



**Figura 17. Frequência e duração das crises.** Frequência e duração das CER observadas por 90 dias dos grupo Pilo CAR AR (n=8), Pilo FAT (n=10), Pilo EGM (n=8) e Pilo grupo CTRL (n=10). A) frequência total das crises; B) duração total das crises; C) frequência das crises do tipo IV; D) duração das crises do tipo IV; E) frequência das crises do tipo V e F) duração das crises do tipo V. Dados representados por média e erro padrão. ANOVA com post-hoc de Dunn. O asterisco (\*) representa um  $p < 0,05$  em relação ao grupo Pilo CTRL.

A fim de investigar como as crises evoluíram ao longo do tempo nos diferentes grupos, realizamos a média de crises ocorridas mês a mês. O grupo Pilo EGM teve um aumento significativo da frequência de crises no terceiro mês quando comparado ao primeiro mês ( $p < 0,05$ ). Apesar disso, a média de crises ocorridas no terceiro mês para este grupo (Pilo EGM) foi semelhante as médias das crises encontradas no primeiro mês dos grupos Pilo CAR AR (9,37) e Pilo CTRL (11,8) (Figura 18). Esses dados sugerem que as células da EGM quando não cultivadas como neuroesferas atuam de forma mais efetiva na contenção das crises no período subsequente ao transplante. Os demais grupos avaliados, Pilo CAR AR, Pilo CTRL, Pilo FAT, não apresentaram diferenças estatísticas na frequência de crises ocorridas mês a mês, indicando que a frequência de crises observada nesses grupos se mantiveram estáveis ao longo do tempo (Figura 18).

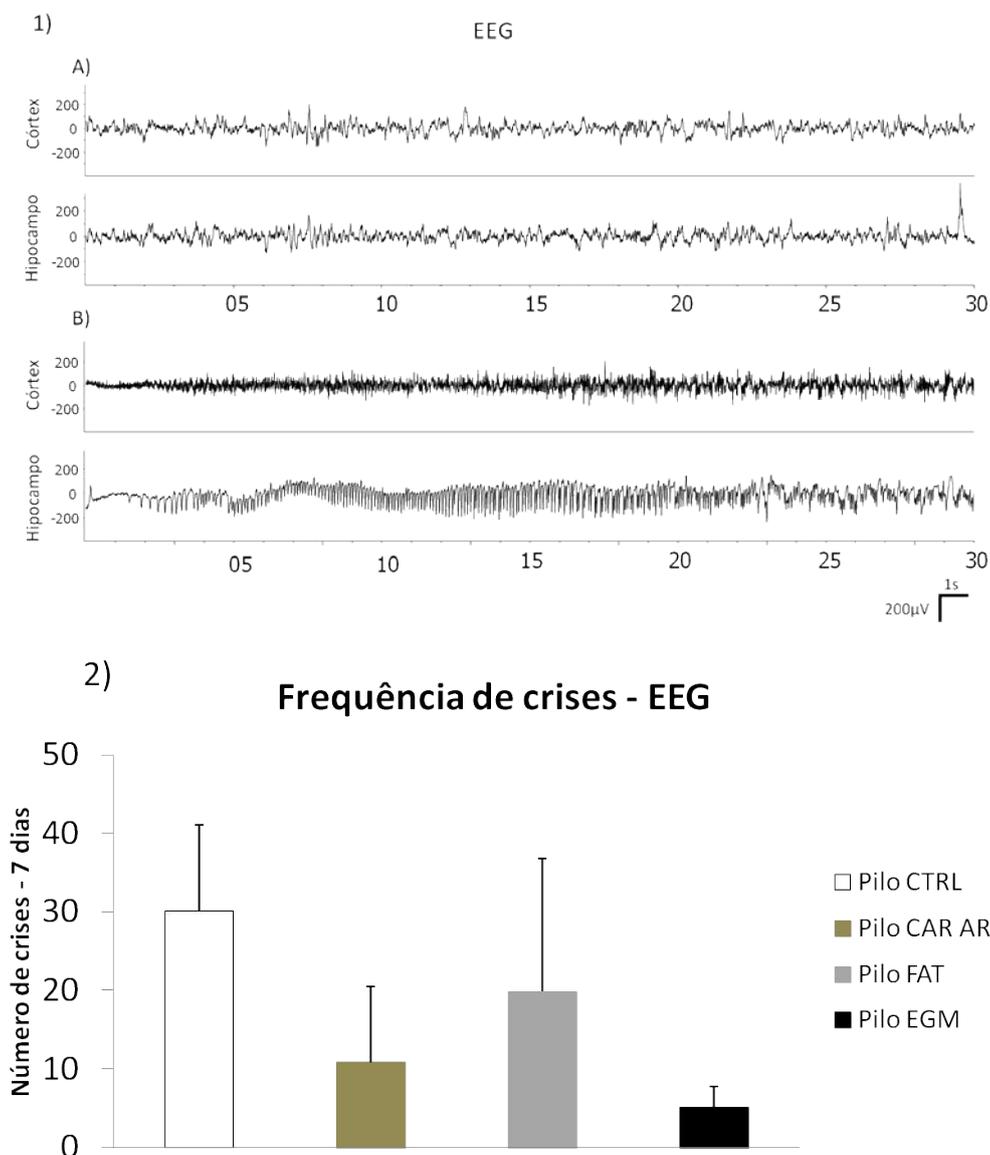
**Figura 18. Evolução Temporal da Frequência de CER.**



**Figura 18. Evolução Temporal das CER.** Evolução da frequência das CERs, representadas por média e erro padrão, observadas a cada mês nos grupos Pilo CAR AR (n=8), Pilo FAT (n=10), Pilo EGM (n=8) e grupo Pilo CTRL (n=10). ANOVA de medidas repetidas. O asterisco (\*) representa um  $p < 0,05$ .

Após finalizado o período de observação das crises por vídeo, foram realizados registros de EEG. As crises identificadas e contabilizadas nos quatro grupos analisados apresentaram um padrão bastante similar, com presença de ponta-onda ou onda-aguda e atividade rítmica e sincrônica de alta frequência com duração maior que 10 segundos (Figura 19- 1). De acordo com as análises eletroencefalográficas, não houve diferenças estatísticas significativas na frequência de crises entre os grupos avaliados (Figura 19- 2). No entanto, o grupo Pilo CTRL foi o grupo com a maior frequência de crises, com uma média de 30,14 e novamente os animais do grupo Pilo EGM apresentaram a frequência mais baixa, com uma média de 5,14. Apesar de não encontrarmos diferenças estatísticas significantes, somando todas as crises identificadas no EEG 42,8% correspondem ao grupo CTRL, 32,8% ao grupo Pilo FAT, 17,3% ao grupo Pilo CAR AR e apenas 7,1% ao grupo Pilo EGM.

**Figura 19. Padrão dos registros e frequência de crises registradas por EEG.**



**Figura 19. Padrão dos registros e frequência de crises registradas por EEG.** 1) Traçado de registro de EEG das regiões do córtex e do hipocampo indicando em A) um padrão de um animal não epilético e em B) o registro de uma CER de um animal epilético. 2) Frequência das CER detectadas por EEG observadas por 7 dias dos grupo Pilo CAR AR (n=6), Pilo FAT (n=7), Pilo EGM (n=6) e Pilo grupo CTRL (n=7). Dados representados por média e EP. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos. Kruskal Wallis  $p=0,28$ .

Conjuntamente, os dados mostram que dentre os três grupos transplantados com células da EGM, o grupo Pilo CAR AR foi o mais parecido com o grupo Pilo CTRL, diferente dos grupos Pilo FAT e Pilo EGM que mostraram uma diminuição na frequência e na duração das crises. Inclusive, o tratamento com células "frescas" da EGM (não cultivadas como neuroesferas) (grupo Pilo EGM) mostrou-se mais eficaz na atenuação das crises epiléticas, por apresentar diminuição da quantidade e duração das crises em relação ao total de crises (crises do tipo IV + crises do tipo V) e as análises do EEG sugerem que este grupo possui a menor porcentagem do total das crises observadas. Já o grupo Pilo FAT, apesar de apresentar uma evolução estável das crises, teve uma redução apenas nas crises do tipo IV, devido a alta frequência de crises do tipo V.

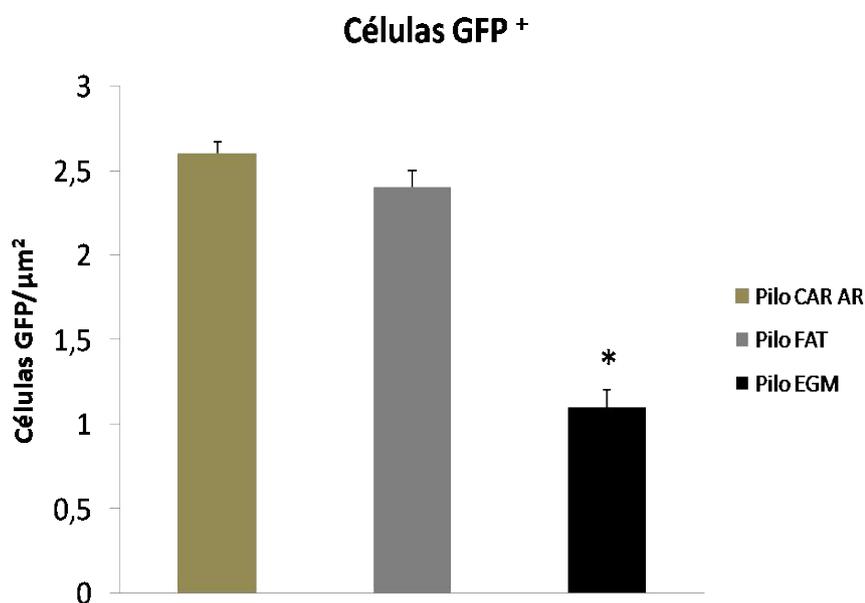
Como visto, as células transplantadas imediatamente após a extração (células frescas, grupo Pilo EGM) exercem um efeito protetor mais eficaz nas crises epiléticas quando comparado às células da EGM cultivadas como neuroesferas (com ou sem prévia modificação do meio de cultivo). Surpreendentemente, as células da EGM cultivadas como neuroesferas na presença de fatores de crescimento têm um efeito protetor mais promissor na redução das crises epiléticas do que as células de neuroesferas cultivadas com AR e sem os fatores de crescimento.

### **5.2.2 Análise fenotípica das células transplantadas no hipocampo de animais epiléticos.**

Sabemos que os precursores neurais são capazes de se diferenciar após o transplante e podem ser identificados através do uso de marcadores específicos, o que contribui para o entendimento do padrão de diferenciação. Nesse tópico identificamos as células transplantadas utilizando marcadores de interneurônios inibitórios (NPY, PV, CR) e glia/astrocitos (GFAP), a fim de investigar o padrão de diferenciação das células da EGM transplantadas logo após a extração (“frescas”) ou cultivadas como neuroesferas, com e sem modificações do meio de cultivo, quando transplantadas no hipocampo de animais epiléticos.

Terminado o período de observação das crises epiléticas, os animais dos grupos Pilo CAR AR, Pilo FAT e Pilo EGM foram eutanasiados e as imunofluorescências foram realizadas para as células GFP, NPY, PV, CR e GFAP. As células GFP<sup>+</sup> transplantadas no período epileptogênico foram encontradas no cérebro dos animais na fase crônica do modelo, ou seja, mais de 120 dias após o transplante. Observamos que as células transplantadas permaneceram no local da injeção ficando restritas ao hipocampo e as regiões próximas a ele e, portanto, não apresentaram um bom potencial de migração. Além disso, o grupo Pilo EGM apresentou o menor número de células GFP<sup>+</sup> quando comparado com demais grupos Pilo CAR AR e Pilo FAT ( $p < 0,05$ ) (Figura 20).

**Figura 20. Número de Células GFP<sup>+</sup>**



**Figura 20. Número de Células GFP<sup>+</sup>.** Número de células GFP<sup>+</sup> por  $\mu\text{m}^2$  encontradas no hipocampo de animais epiléticos dos grupos Pilo EGM, Pilo FAT e Pilo CAR AR. Dados representados por média e erro padrão. Kruskal Wallis com Post-Hoc Games Howell,  $p=0,02$ . O asterisco (\*) representa um  $p < 0,05$  em relação aos grupos Pilo FAT e Pilo CAR AR.

Em seguida, identificamos dupla marcação de GFP com células positivas para NPY, CR, PV e GFAP em todos os grupos, indicando que parte das células transplantadas se diferenciam em interneurônios inibitórios e glia ou astrócitos (GFAP+), quando transplantadas no cérebro de animais epiléticos. Apesar do grupo Pilo EGM apresentar o menor número de células GFP este grupo possui o maior número absoluto de interneurônios inibitórios (16) e o menor número de astrócitos (1,75) comparado aos grupos Pilo FAT (7,5 de interneurônios inibitórios e 27 de astrócitos) e Pilo CAR AR (9 de interneurônios inibitórios e 18 de astrócitos).

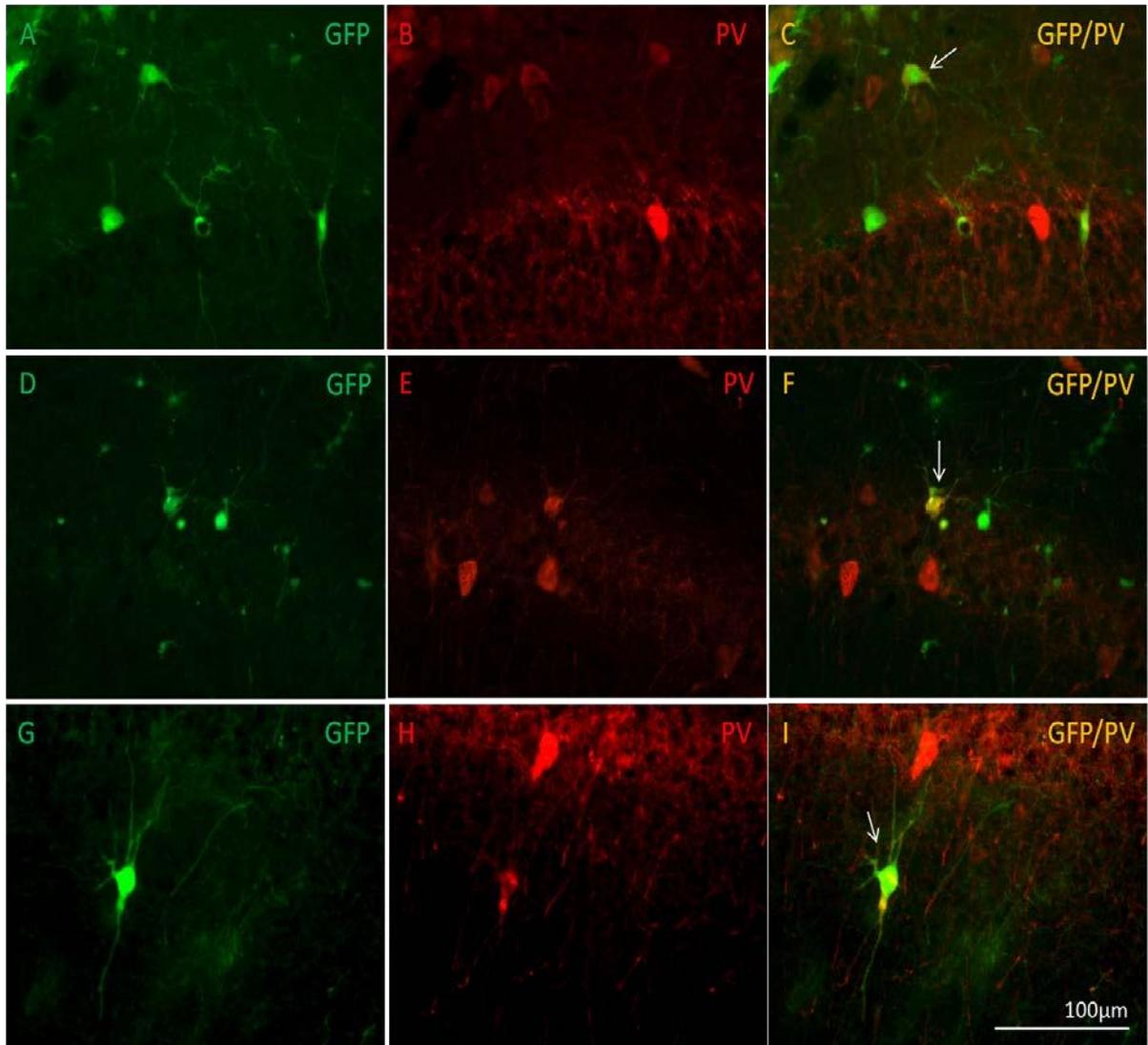
Optamos mostrar as diferenças na quantidade de células duplo-marcadas nos três grupos por análise da porcentagem de cada marcador. O grupo Pilo EGM grupo apresentou a maior proporção de interneurônios inibitórios (25,28%), especificamente com porcentagens de células NPY<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> (12,38%), PV<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup>

(6,96%) e CR<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> (5,94%). Uma proporção de interneurônios inibitórios bem reduzida com relação ao grupo Pilo EGM foi obtida pelo grupo Pilo CAR AR, com um total de 6,81%, distribuídos em 3,4% de células CR<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup>, 1,89% de células PV<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> e 1,52% de células NPY<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup>. Com a menor proporção de interneurônios inibitórios temos o grupo Pilo FAT que possui 2,43% de células GFP<sup>+</sup>/PV<sup>+</sup>, 1,87% de células GFP<sup>+</sup>/NPY<sup>+</sup> e 0,69% de células GFP<sup>+</sup>/CR<sup>+</sup>, totalizando 4,99% (Figura 21 A-D). Ao contrário da expressiva porcentagem de interneurônios inibitórios encontrada no grupo Pilo EGM, a porcentagem de astrócitos foi muito baixa para este grupo, que apresentou 0,72% de células GFAP<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup>. Por outro lado, detectamos uma quantidade maior de células GFAP<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> nos grupos Pilo FAT e Pilo CAR AR, respectivamente, 5,65% e 3% (Figura 21 E).

Apesar do grupo Pilo EGM possuir a menor quantidade de células GFP<sup>+</sup> localizadas no hipocampo, a maioria dessas células são interneurônios inibitórios, indicando que as células da EGM transplantadas imediatamente após a extração têm uma capacidade maior de se diferenciar e originar interneurônios inibitórios do que as células da EGM cultivadas como neuroesferas *in vivo*.

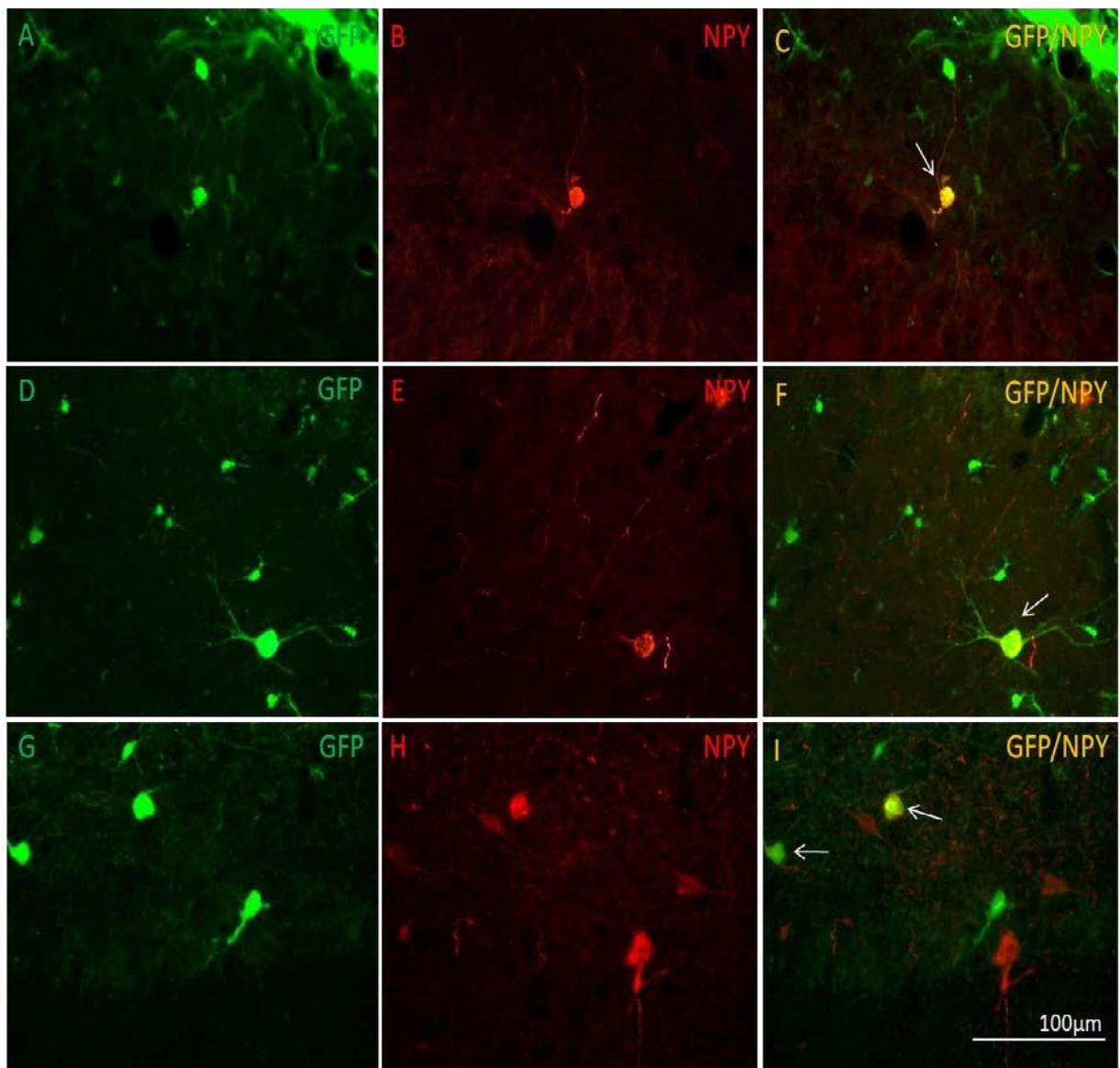
**Figura 21. Imunofluorescência das células transplantadas.**

1)



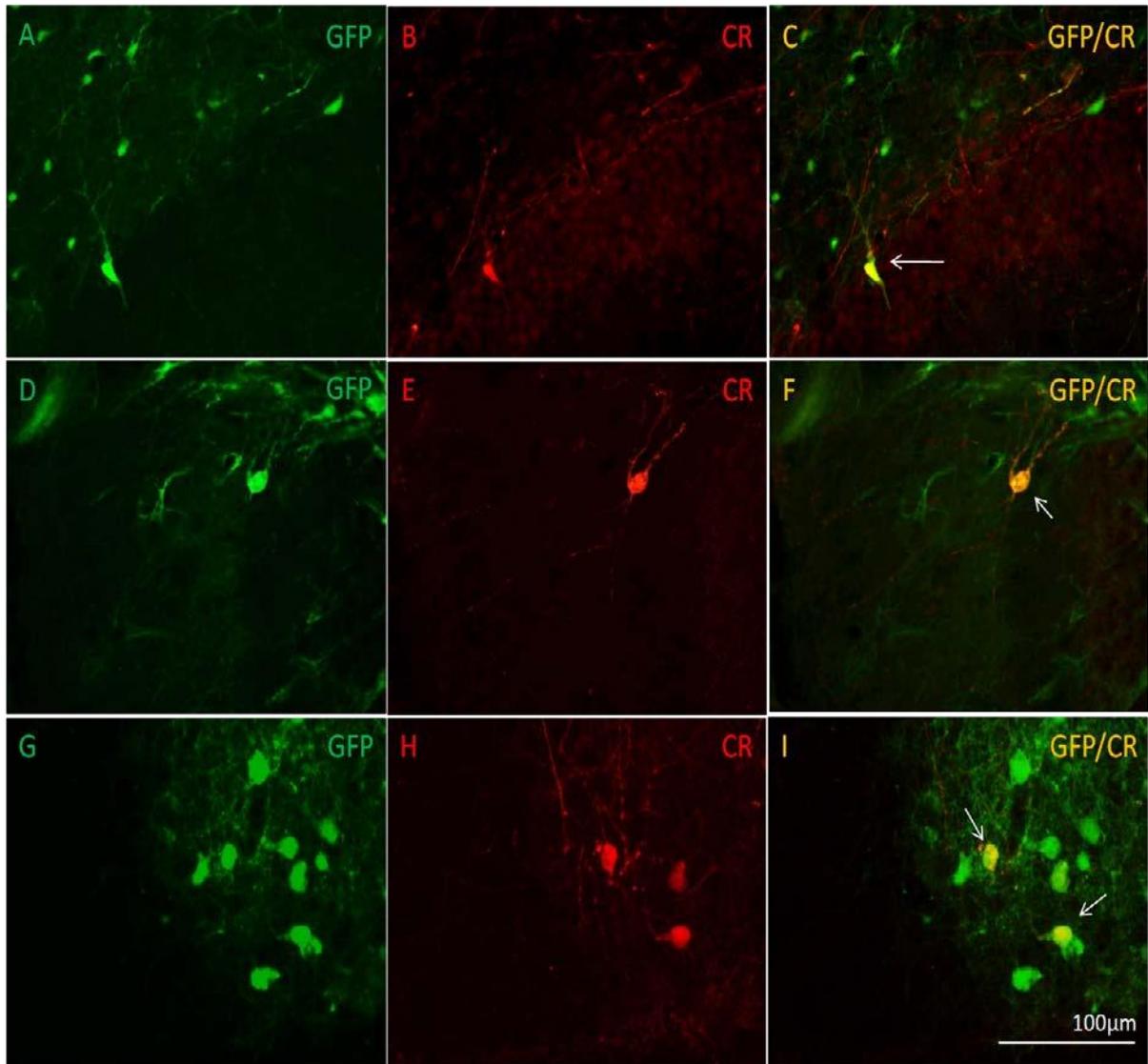
**Figura 21. Imunofluorescência das células transplantadas.** Imunofluorescência de células GFP<sup>+</sup> transplantadas no hipocampo de animais epiléticos duplamente marcada para interneurônios inibitórios do tipo PV<sup>+</sup> (B,E e H), GFP<sup>+</sup> (A,D e G) e GFP<sup>+</sup>/PV<sup>+</sup> (C,F e I). Os grupos estão representados pelas letras: (A-C) Pilo CAR AR; (D-F) Pilo FAT e (G-I) Pilo EGM. Imagens da região de CA1 (A-F) e do giro denteado (G-I) no hipocampo. Barra de escala = 100μm

2)



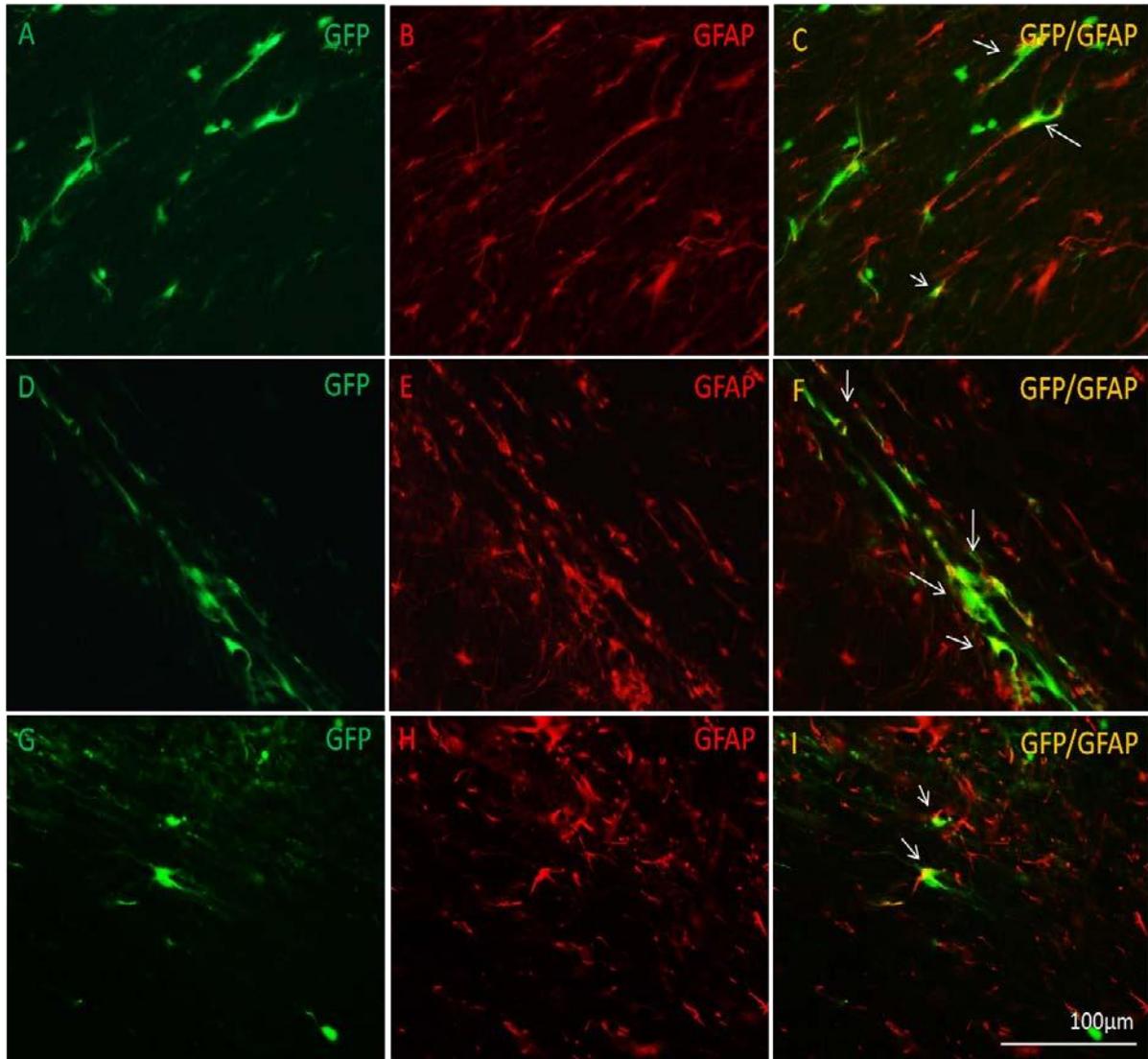
**Figura 21. Imunofluorescência das células transplantadas.** Imunofluorescência de células  $GFP^+$  transplantadas no hipocampo de animais epiléticos duplamente marcada para interneurônios inibitórios do tipo  $NPY^+$  (B,E e H),  $GFP^+$  (A,D e G) e  $GFP^+/NPY^+$  (C,F e I). Os grupos estão representados pelas letras: (A-C) Pilo CAR AR; (D-F) Pilo FAT e (G-I) Pilo EGM. Imagens da região de CA1 (A-C) e do giro denteado (D-I) no hipocampo. Barra de escala =  $100\mu m$ .

3)



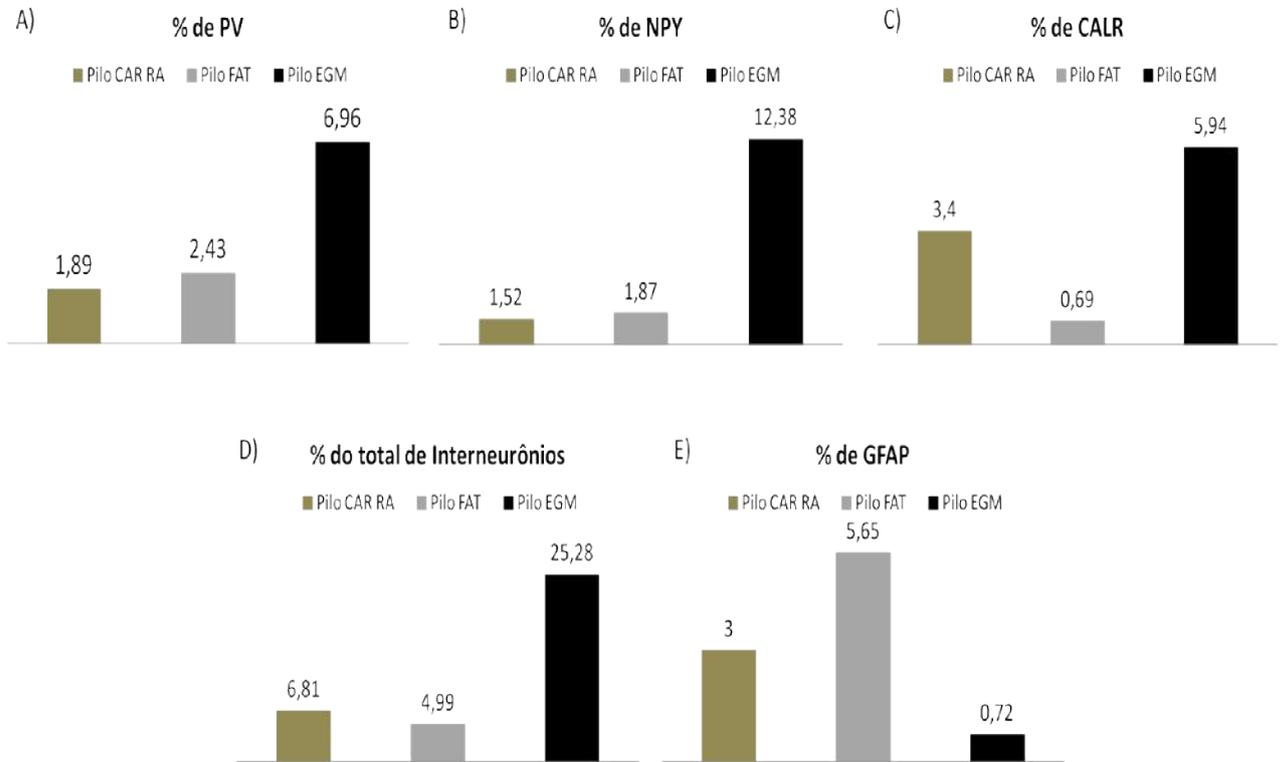
**Figura 21. Imunofluorescência das células transplantadas.** Imunofluorescência de células GFP<sup>+</sup> transplantadas no hipocampo de animais epiléticos duplamente marcada para interneurônios inibitórios do tipo CR<sup>+</sup> (B,E e H), GFP<sup>+</sup> (A,D e G) e GFP<sup>+</sup>/CR<sup>+</sup> (C,F e I). Os grupos estão representados pelas letras: (A-C) Pilo CAR AR; (D-F) Pilo FAT e (G-I) Pilo EGM. Imagens da região de CA1 (D-F) e do giro dentado (A-C e G-I) no hipocampo. Barra de escala = 100µm.

4)



**Figura 21. Imunofluorescência das células transplantadas.** Imunofluorescência de células GFP<sup>+</sup> transplantadas no hipocampo de animais epiléticos duplamente marcada para GFAP<sup>+</sup> (B,E e H), GFP<sup>+</sup> (A,D e G) e GFP<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> (C,F e I). Os grupos estão representados pelas letras: (A-C) Pilo CAR AR; (D-F) Pilo FAT e (G-I) Pilo EGM. Imagens da região de CA1 (A-F) e do giro denteado (G-I) no hipocampo. Barra de escala = 100µm.

**Figura 22. Porcentagens de interneurônios inibitórios e astrócitos**



**Figura 22. Porcentagens de interneurônios inibitórios e astrócitos.** A porcentagem de PV, NPY, CR e GFAP em relação ao número total (100%) de células GFP foi plotada nos gráficos para cada marcador. Gráfico A) PV<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup>; gráfico B) NPY<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup>; gráfico C) CR<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup>; gráfico D) soma das porcentagens dos subtipos de interneurônios inibitórios: PV, NPY e CR; gráfico E) GFAP<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup>.

## 6. Discussão

### ***In vitro* - Diferentes modificações no meio de cultivo alteram a população neural de neuroesferas derivadas da EGM.**

Estudos que realizaram a remoção transitória de EGF e FGF2 em células neurais cultivadas como neuroesferas observaram que a privação desses fatores faz com que as células parem de proliferar e iniciem o processo de diferenciação. No trabalho de Nieto-Estevez e colaboradores, os autores realizaram cultura de neuroesferas de progenitores neurais oriundos do bulbo olfatório com baixas concentrações de EGF e FGF2, e observaram uma redução no tamanho das neuroesferas além de um aumento significativo da morte celular (Nieto-Estevez et al., 2013; Schwindt et al., 2009). Nossos resultados indicaram que as células da EGM cultivadas na presença de fatores de crescimento formaram neuroesferas maiores comparadas às neuroesferas cultivadas sem os fatores de crescimento. A diminuição do tamanho das neuroesferas nas condições CAR e CAR AR está relacionada à ausência transiente de fatores de crescimento que pode ter causado morte celular e/ou diminuição da proliferação (Kelly et al., 2005; Reynolds & Weiss, 1992; Supeno et al., 2013). Conjuntamente, esses dados indicam que progenitores neurais cultivados como neuroesferas são bastante influenciados pelos fatores de crescimento e que a remoção ou a utilização de baixas concentrações são capazes de modificar o padrão de proliferação e morte celular independente da região de origem das células.

Evidências indicam que o uso de EGF e FGF2 é essencial para expandir os progenitores neurais e formar neuroesferas, pois esses fatores de crescimento promovem a proliferação e ao mesmo tempo mantêm as células em um estado indiferenciado (De Alvaro et al., 2005; Vaccarino et al., 2001). Seguindo essa premissa, é natural conceber dados de outros estudos revelando que a retirada ou redução das concentrações dos fatores de crescimento utilizados na cultura de neuroesferas promove o enriquecimento da população neuronal por desencadear, ainda em suspensão, o processo de diferenciação em neurônios (Schwindt et al., 2009; Schwindt et al., 2009) e também por deixar de estimular a proliferação de precursores gliais (Hou et al., 1995; Kelly et al., 2005; Kilpatrick & Bartlett, 1995). De acordo com Einstein e colaboradores, a ausência dos fatores de crescimento

modifica o padrão de diferenciação celular, afetando a plasticidade e destino dessas células e tornando-as uma população mais específica, sem alterar de forma extrema o padrão de sobrevivência (Einstein et al., 2006). Assim, nas condições em que foram removidos os fatores de crescimento do meio de cultivo (condições CAR e CAR AR) houve favorecimento da diferenciação das células ainda em suspensão, uma vez que apresentaram as menores porcentagens de precursores neurais (Nestina<sup>+</sup>), acompanhado de um aumento na proporção de células neuronais ( $\beta$ -tubulinaIII<sup>+</sup>).

A importância do AR para o processo de diferenciação neuronal durante o desenvolvimento já está bem descrita na literatura (Rhinn & Dolle, 2012). Na região da eminência gangliônica lateral (EGL), o AR endógeno é requerido para que ocorra a especificação de neurônios GABAérgicos, estabelecendo um papel importante no desenvolvimento do prosencéfalo (Chatzi et al., 2011). O papel do AR como um indutor de diferenciação neuronal *in vitro* vem sendo investigado. A adição deste ácido na cultura parece induzir uma diferenciação específica para neurônios (Soprano et al., 2007), além de diminuir a diferenciação em astrócitos (Christie et al., 2010; Takahashi et al., 1999) e facilitar a sobrevivência de neurônios e o crescimento de seus prolongamentos (Erceg et al., 2008; Quinn & De Boni, 1991; Wuarin & Sidell, 1991). Nossos dados vão ao encontro dos efeitos já descritos para o AR, visto que a adição de AR potencializou o efeito indutor de diferenciação neuronal produzido pelo carenciamento dos fatores de crescimento no meio de cultivo, demonstrado por uma maior quantidade de neurônios no grupo CAR AR quando comparado à condição FAT. Tal efeito indutor de células neuronais pelo AR estende-se a culturas de neuroesferas de progenitores neurais de outras regiões do encéfalo e a células-tronco embrionárias humanas (Bibel et al., 2004; Christie et al., 2010; Rochette-Egly, 2015; Xu et al., 2012).

Apesar de o AR induzir a diferenciação neuronal, a quantidade de neurônios não aumentou quando os fatores de crescimento foram adicionados ao meio de cultivo no grupo FAT AR. Isso pode ser explicado pelo fato de o AR e o FGF2 possuírem uma relação regulatória antagônica na morfogênese, o AR cessa a proliferação e estimula a diferenciação neuronal e o FGF2 estimula proliferação e a manutenção das células em um estado indiferenciado (Horschitz et al., 2015). Portanto, como a remoção de FGF2 pode aumentar a sinalização do AR, o uso de

AR na ausência de fatores de crescimento desempenha de forma mais efetiva seu papel como indutor neuronal.

Como visto, as modificações no meio de cultivo realizadas com as neuroesferas ainda em suspensão, foram capazes de aumentar a diferenciação neuronal. Por outro lado, o aumento na quantidade de neurônios provocado pela ação do AR, observado durante a fase de proliferação, não se mostrou muito evidente após indução da diferenciação. Estudos que observaram um aumento significativo do número de neurônios adicionaram o AR no meio de cultivo durante o período de diferenciação (Christie et al., 2010; Xu et al., 2012). Isso indica que a adição de AR apenas na fase em que as neuroesferas são cultivadas em suspensão, não é o suficiente para manter o aumento da indução neuronal, e para que isso perdure, é importante a presença do AR no meio de cultura.

***In vitro* - Células da EGM cultivadas como neuroesferas apresentam uma redução significativa da expressão dos genes Dlx1, Nkx2.1 e Lhx6.**

A determinação de um tipo celular a partir de células-tronco ou de progenitores é um evento complexo regulado regionalmente (depende do ambiente e de seus fatores/morfógenos locais) e temporalmente (determina a ordem e duração dos estímulos). Os fatores de transcrição são elementos chave no processo de programação celular. Para que ocorra de forma adequada o desenvolvimento de interneurônios inibitórios na região da EGM, é essencial a presença de fatores de transcrição específicos como, Dlx1, Nkx2.1 e Lhx6 (Butt et al., 2008; Wonders & Anderson, 2006).

Diante da importância dos fatores de transcrição, analisamos a expressão relativa dos mesmos nas diferentes condições de cultivo. Nossos dados mostraram uma significativa modulação da expressão de Dlx1, Nkx2.1 e Lhx6 dependente da presença de EGF e FGF2 e de AR no cultivo de neuroesferas derivadas da EGM. Mesmo não tendo atingido os altos níveis de expressão encontrados nas células "frescas" da EGM, as células cultivadas na ausência de fatores de crescimento mostraram um aumento significativo da expressão dos genes Dlx1, Lhx6 e Nkx2.1 quando comparado às células cultivadas na presença de fatores de crescimento. Isso indica que, além da reconhecida atuação como mitógenos na formação de

neuroesferas, os fatores de crescimento EGF e FGF2 podem ser responsáveis por alterar a identidade celular, prejudicando, assim, a manutenção de características regionais da EGM (Santa-Olalla et al., 2003; Tucker et al., 2008). Com base na literatura, identificamos pelo menos dois mecanismos pelos quais a sinalização mediada por EGF, FGF2 e AR podem alterar as propriedades regionais das células da EGM cultivadas como neuroesferas: o balanço entre estímulo pró-diferenciação *versus* manutenção do estado indiferenciado e o favorecimento da proliferação de progenitores gliais.

A alteração da expressão de alguns genes cruciais para a manutenção da especificação regional de progenitores neurais da EGM respondeu claramente à sinalização induzida por EGF e FGF2, em sincronia com a proporção de neurônios  $\beta$ -tubulina III presentes em cada condição de cultivo. Observamos que as condições carenciadas para EGF e FGF2 (CAR e CAR RA), que continham mais neurônios em sua composição também expressavam mais Dlx1, Lhx6 e Nkx2.1, indicando uma relação direta entre grau de diferenciação neuronal e níveis de expressão gênica. De acordo com Parmar e colaboradores, células indiferenciadas de neuroesferas da EGM expressam baixos níveis de Dlx1 quando comparado com a mesma região *in vivo*, porém a expressão desse gene aumenta após diferenciação *in vitro* das células de neuroesferas (Parmar et al., 2002).

Sendo o FGF2 um importante fator para a manutenção do estado indiferenciado das células-tronco neurais (Vallier et al., 2005), sua sinalização pode ser capaz de reprimir a expressão desse conjunto de genes específicos que determinam o fenótipo maduro de interneurônios inibitórios da EGM na cultura de neuroesferas. Por exemplo, a presença de FGF pode atrasar a expressão de genes que participam da especificação de células da região ventral do tubo neural e que respondem a baixas concentrações de Shh, incluindo o Nkx2.1, que promove a diferenciação em interneurônios inibitórios do tipo PV durante o desenvolvimento da medula espinal (Xu et al., 2005). Diversos outros estudos corroboram os nossos dados de que os progenitores neurais mais comprometidos, específicos de uma região, perdem algumas de suas características moleculares quando cultivados para expansão *in vitro*, onde permanecem por longos períodos sob a influência de EGF e FGF2 (Gabay et al., 2003; Hack et al., 2004; Santa-Olalla et al., 2003; Tucker et al., 2008).

De importância para a diferenciação neuronal, o AR também é requerido para que ocorra expressão de genes chaves envolvidos na especificação de interneurônios inibitórios (Diez Del Corral et al., 2003). De fato, a presença de AR pode ter induzido um aumento na expressão de Dlx1 e Nkx2.1, pois, conseqüentemente, aumentou a quantidade de células diferenciadas em neurônios.

Outra vertente para explicar os efeitos moleculares da expansão dos progenitores da EGM em neuroesferas baseia-se na proliferação de precursores gliais e células da glia radial (que apresentam características de células-tronco neurais durante o desenvolvimento) em resposta ao fator de crescimento EGF. A sinalização de EGF está fortemente envolvida na diferenciação de astrócitos, pois animais *knockout* para receptores de EGF apresentam déficits na gliogênese (Sibilia et al., 1998). De acordo, nas neuroesferas que são mantidas com EGF e FGF2 é relatado um aumento na proporção de progenitores comprometidos com a linhagem glial ou identidades mais genéricas, com uma pequena população de progenitores neurais mais comprometidos com características da EGM (Hack et al., 2004; Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009; Tucker et al., 2008).

Progenitores neurais do telencéfalo cultivados como neuroesferas são capazes de manter alguns aspectos da sua identidade regional, originando o fenótipo neuronal apropriado (Hitoshi et al., 2002; Ostenfeld et al., 2002; Parmar et al., 2002). Sabemos que as células oriundas da EGM possuem informações específicas da sua região de origem, porém quando retiradas de seu nicho se deparam com outras sinalizações, sugerindo que o micro-ambiente desempenha um papel importante na indução desses precursores neurais em interneurônios inibitórios. Como visto, o ambiente pode ser determinante para o padrão de proliferação, o fenótipo celular e a expressão de determinados genes. Assim, a estratégia de expansão a curto prazo, seguido pelo carenciamento para os fatores EGF e FGF2 e a adição de AR foi capaz de reduzir o impacto negativo do cultivo na especificação regional dos progenitores da EGM.

### ***In vitro* - FAT versus CAR AR, as condições mais antagônicas.**

Com base nos dados obtidos nos experimentos *in vitro*, as condições CAR AR e FAT foram as mais discrepantes. O grupo FAT, condição de cultivo padrão,

utilizada por diversos estudos para proliferação de células-tronco neurais como neuroesferas (Ciccolini & Svendsen, 1998; Reynolds & Weiss, 1992), apresentou a menor porcentagem de neurônios quando comparado com os outros grupos, tanto na fase de proliferação como após diferenciação *in vitro*, além de apresentar a menor expressão dos genes que codificam para os fatores de transcrição relacionados ao desenvolvimento de interneurônios inibitórios na EGM. Por outro lado, a condição CAR AR apresentou resultados relevantes para o uso de suas células no transplante de animais epiléticos, pois nas neuroesferas em suspensão, fase na qual usamos as células para o transplante, esse grupo apresentou uma taxa de diferenciação celular favorável para neurônios, com um aumento da expressão de Dlx1, Lhx6 e Nkx2.1. Diante disso, as células cultivadas nessas duas condições, juntamente com células obtidas da EGM que não foram cultivadas como neuroesferas, foram utilizadas para transplante hipocampal em animais epiléticos, investigando assim o seu potencial anticonvulsivo e a diferenciação em interneurônios inibitórios *in vivo*, em um ambiente hostil onde as sinalizações se encontram modificadas.

***In vivo* – As células da EGM cultivadas como neuroesferas originam poucos interneurônios inibitórios após transplante em animais epiléticos.**

Apesar de o transplante ter sido realizado no período epileptogênico, logo após o SE, observamos que as células transplantadas no hipocampo se diferenciaram em interneurônios inibitórios e puderam ser identificadas por marcadores do tipo PV, CR e NPY mesmo após um longo período (4 meses) pós-transplante, nos três grupos transplantados analisados. Esses dados são corroborados por estudos de transplante *in vivo* que demonstraram a diferenciação de células oriundas da EGM em interneurônios inibitórios mesmo depois de expandidas em cultura como neuroesferas (Anderson et al., 2001; Eriksson et al., 2003).

No entanto, ao realizarmos a contagem das células transplantadas observamos que as células cultivadas como neuroesferas (com ou sem fatores ou AR) apresentaram uma porcentagem menor de interneurônios inibitórios, enquanto as células da EGM que não foram submetidas à cultura tiveram a maioria de suas células diferenciadas em interneurônios inibitórios.

Através de uma variedade de técnicas, entre elas mapeamento fetal e modelos genéticos, foi comprovado que a região da EGM é uma fonte primária de interneurônios inibitórios (Cobos et al., 2001; Lavdas et al., 1999; Sussel et al., 1999; Wichterle et al., 2001). Além disso, foram identificados genes fundamentais para o desenvolvimento e manutenção dos mesmos, dentre eles o Dlx1, Nkx2.1 e Lhx6. A inativação do fator de transcrição Dlx1 resulta na perda de interneurônios inibitórios dos tipos CR, SST e NPY levando a uma redução na inibição cortical e hipocampal e conseqüentemente ao surgimento de crises epiléticas (Cobos et al., 2005). Há evidências de que a ausência ou redução de Nkx2.1 e Lhx6 diminui significativamente o número de neurônios GABAérgicos, além de gerar uma atrofia da região da EGM (Flandin et al., 2011; Sussel et al., 1999). A baixa porcentagem de diferenciação em interneurônios inibitórios encontrada nas células cultivadas como neuroesferas após o transplante hipocampal pode ter ocorrido em função da diminuição da expressão dos genes presentes na região da EGM, como evidenciado pelos nossos resultados *in vitro*.

Apesar das células cultivadas como neuroesferas sem fatores de crescimento e adição de AR apresentar um aumento significativo da expressão desses genes *in vitro*, esse não foi suficiente para aumentar a diferenciação em interneurônios inibitórios *in vivo*, pois essas células apresentaram um padrão de diferenciação semelhante às células cultivadas na presença de fatores de crescimento, que como o esperado apresentou a porcentagem mais baixa de interneurônios inibitórios, sugerindo que as modificações do meio de cultivo não favorecem o aumento de interneurônios inibitórios *in vivo*.

Evidências sugerem que algumas células retêm uma memória molecular de onde vieram baseadas na expressão de genes da sua região de origem (Na et al., 1998; Ostenfeld et al., 2002). Em outro estudo, células progenitoras de oligodendrócitos quando transplantadas no hipocampo ou no foco da lesão, se diferenciam em oligodendrócitos, indicando que as pistas extrínsecas de um ambiente neurogênico ou lesado não interferem na diferenciação dessas células (Webber et al., 2007). De acordo com os nossos resultados, o mesmo aconteceu com as células da EGM que não foram expandidas em culturas de neuroesferas. No entanto, em um estudo onde realizaram o transplante de progenitores neurais, os autores observaram que grande parte das células é influenciada pelo ambiente local

na hora de sua diferenciação (Gage, 2000). Acreditamos que as células da EGM são progenitores mais comprometidos com a presença de sinais intrínsecos, que diminuem a influência do meio.

Além da marcação para interneurônios inibitórios, contabilizamos as células que se diferenciaram em astrócitos. As células cultivadas como neuroesferas, independente da condição de cultivo, foram as que mais se diferenciaram nesse fenótipo celular. As células que compõe as neuroesferas são em sua maioria progenitores gliais, e mesmo utilizando células-tronco neurais oriundas de diferentes regiões é observada uma diferenciação preferencial em astrócitos (Reynolds & Weiss, 1996; Waldau et al., 2010). Além disso, quando o destino celular é examinado, as células oriundas das neuroesferas parecem conter uma população celular mais heterogênea com uma mistura de neurônios excitatórios, interneurônios inibitórios, células gliais e células imaturas (Carpentino et al., 2008; Chu et al., 2004).

De fato, estudos anteriores já haviam demonstrado que células-tronco neurais endógenas se diferenciam em células gliais após lesão no cérebro e na medula, sugerindo que a presença de sinais locais induz a gliogênese em condições adversas (Frisen et al., 1995; Holmin et al., 1997). A hipótese de que o ambiente influencia o padrão de diferenciação é válida, porém quando as células estão mais comprometidas a um determinado fenótipo celular essa hipótese não se sustenta. Em nosso experimento, as células da EGM que não foram cultivadas como neuroesferas encontraram o mesmo ambiente hostil que as células cultivadas como neuroesferas, porém, o padrão de diferenciação foi bastante diferente onde apenas uma pequena porcentagem se diferenciou em astrócitos, corroborando outros estudos que apresentaram poucas células positivas para marcadores gliais (Calcagnotto et al., 2010; Martinez-Cerdeno et al., 2010; Wichterle et al., 1999).

O distinto padrão de diferenciação das células da EGM cultivadas e não cultivadas como neuroesferas pode ter influenciado o total de células GFP<sup>+</sup>, pois o transplante de células frescas da EGM originou mais interneurônios inibitórios, que em uma condição epiléptica são mais vulneráveis do que as células gliais e outros tipos celulares oriundos de células de neuroesferas da EGM, o que pode explicar, em partes, o maior número de células GFP<sup>+</sup> nos grupos Pilo FAT e Pilo CAR AR (Chen et al., 2010; Parent et al., 2006).

A preservação dos programas intrínsecos que determinam o comprometimento a uma determinada linhagem neural após expansão em cultura ainda é controversa (Liu et al., 1999; Park et al., 2006). No entanto, as alterações nos progenitores neurais da EGM provocadas pelas condições presentes na cultura de neuroesferas, antes de serem transplantados na estrutura lesada, podem ser cruciais para a definição do destino, sobrevivência e integração dessas células (Park et al., 2006; Silva et al., 2009).

***In vivo* - Diferentes condições de células da EGM pré-transplante hipocampal resultaram em diferentes respostas no padrão de crises epiléticas.**

Os primeiros estudos que realizaram o transplante de células da EGM mostraram que essas células possuem a capacidade de migrar por longas distâncias e se diferenciar em interneurônios inibitórios que expressam marcadores do tipo PV, CR, NPY e SST. Além disso, registros eletrofisiológicos demonstraram que essas células se integram no circuito do hospedeiro e aumentam o tônus inibitório (Alvarez-Dolado et al., 2006; Baraban et al., 2009; Zipancic et al., 2010). Sabemos que a ocorrência de crises na ELT está relacionada com a perda de inibição funcional devido a redução do número de interneurônios GABAérgicos hipocampais (Cornish & Wheal, 1989; De Lanerolle et al., 1989). Diante disso, as células da EGM tem se mostrado eficazes na restauração de circuitos inibitórios em modelos animais de ELT (Tyson & Anderson, 2014). Conforme nossos dados, o transplante de precursores neurais da EGM que não foram cultivados como neuroesferas apresentaram os resultados mais promissores quando avaliamos seu efeito anticonvulsivo. Nesse grupo encontramos uma diminuição da frequência total de crises e a maioria das células transplantadas se diferenciou em interneurônios inibitórios comparado aos demais grupos.

O efeito protetor gerado pelo transplante de células oriundas da EGM nas crises epiléticas não é observado apenas em modelos experimentais de ELT. Em um estudo realizado com eletrochoque convulsivo máximo em camundongos, utilizando as mesmas células da EGM, foi observado um efeito protetor nas crises tônicas (Calcagnotto et al., 2010a). Essas células quando transplantadas também

reduziram as crises espontâneas em um modelo animal associado com a ausência de canais de potássio (Baraban et al., 2009). Ainda nessa linha, células da EGM transplantadas após lesão causada por uma substância específica para lesar interneurônios inibitórios no hipocampo (saporina) foram capazes de gerar interneurônios em quantidade suficiente para recuperar a lesão e ainda diminuir a intensidade e a mortalidade das crises induzidas pelo modelo de PTZ (Zipancic et al., 2010). Visando um contexto terapêutico, Anderson e Baraban pré-administraram três drogas antiepiléticas convencionais, fenitoína, carbamazepina e fenobarbital em animais induzidos ao modelo de pilocarpina, e novamente os animais transplantados com células da EGM apresentaram uma redução de crises semelhante à encontrada quando utilizadas as drogas antiepiléticas (Anderson & Baraban, 2012). Esses estudos sustentam o uso de células da EGM como uma opção terapêutica para o tratamento da epilepsia.

Dentre os estudos que investigaram o potencial anticonvulsivo das células da EGM, poucos cultivaram essas células como neuroesferas antes do transplante. Um deles realizado por Waldau e colaboradores utilizou ácido caínico para indução do modelo de ELT, e observou redução na frequência, duração e severidade das crises. De forma similar, nosso trabalho mostrou que o transplante de células oriundas da EGM cultivadas como neuroesferas na presença de fatores de crescimento (grupo FAT) resultou em diminuição da frequência de crises do tipo IV, apesar de apresentar uma baixa porcentagem de diferenciação em interneurônios inibitórios.

Nos últimos anos, as terapias celulares baseadas na reposição de interneurônios GABAérgicos apresentaram resultados promissores, sustentados por estudos que mostram que o transplante de células progenitoras da EGM no córtex cerebral ou hipocampo resulta na supressão de crises epiléticas em vários modelos experimentais de epilepsia (Tyson & Anderson, 2014). O mecanismo de supressão das crises mais provável que está por trás do transplante de interneurônios inibitórios é o de restringir a atividade neuronal durante as crises através da formação de novas sinapses inibitórias.

De acordo com os resultados obtidos em nosso estudo, os animais do grupo Pilo EGM apresentaram redução na frequência total de CER em relação ao grupo controle. O efeito anticonvulsivo das células "frescas" da EGM em nosso trabalho pode ser atribuído à sua capacidade de se diferenciar em interneurônios inibitórios

que se integram à circuitaria do hospedeiro, aumentando, assim, o tônus inibitório (Anderson & Baraban, 2012; Baraban et al., 2009; Tyson & Anderson, 2014). De fato, vários subgrupos de interneurônios são associados com a diminuição de crises epiléticas, incluindo células em candelabro que expressam PV e as células em cesto que expressam NPY (Baraban, 1998; Defelipe, 1999). Além disso, interneurônios do tipo PV estão associados à limitação da propagação das crises (Freund et al., 1992). Os animais que receberam o transplante de células da EGM que não foram cultivadas como neuroesferas apresentaram as maiores porcentagens para esses subtipos de interneurônios inibitórios (cerca de 25%) e, conseqüentemente, uma redução do total de crises comportamentais generalizadas do tipo IV e V.

Por outro lado, ao expandir progenitores neurais como neuroesferas, obtém-se uma população celular mais heterogênea, sendo em sua maioria células gliais (Hattiangady & Shetty, 2011; Waldau et al., 2010). As células gliais desempenham importantes funções no cérebro, como a modulação da transmissão sináptica, o controle homeostático de íons e a integridade da barreira hematoencefálica.

A maioria dos estudos que buscam novas abordagens anticonvulsivantes tem como foco investigar componentes que afetam funções neuronais, pois a disfunção neuronal é apontada como a principal causa da epilepsia. De acordo com Bedner e colaboradores, alterações no acoplamento dos astrócitos ocorre poucas horas após o SE, provavelmente devido ao aumento da liberação de citocinas pró inflamatórias. Essas alterações contribuem para o aumento dos níveis de  $K^+$  e glutamato extracelular levando a uma redução do limiar excitatório. Além disso, essas alterações precedem a morte neuronal por apoptose e o desenvolvimento das CER, sugerindo que a ELT pode ser considerada uma desordem com base em disfunções gliais e não apenas neuronais (Bedner et al., 2015).

Como visto em nosso estudo, poucas células derivadas de neuroesfera se diferenciaram em interneurônios inibitórios, porém essas células originam uma maior proporção de células gliais. Provavelmente, as células da EGM cultivadas como neuroesferas na presença de fatores de crescimento reduziram a frequência de crises do tipo IV no grupo Pilo FAT por meio de outros mecanismos, que não a reposição de interneurônios inibitórios, tais como rearranjos estruturais da circuitaria do hospedeiro, secreção de neuropeptídeos ou fatores tróficos e até mesmo a

modulação da inflamação (Waldau et al., 2010). Essa proteção pode estar associada à secreção de fatores neurotróficos, como por exemplo o GDNF, que possui propriedades antiepilépticas (Hattiangady et al., 2007). Já foi descrito que o aumento da expressão de GDNF pode ser promovido por meio da adição de novas células que sintetizam GDNF (astrócitos, progenitores gliais ou células-tronco) ou pela restauração da expressão de GDNF por astrócitos já presentes no hipocampo (Kanter-Schlifke et al., 2009; Kanter-Schlifke et al., 2007; Waldau et al., 2010).

Conforme discutido no item anterior, o padrão de diferenciação *in vivo* das células da EGM cultivadas como neuroesferas foi bastante semelhante em ambas as condições (CAR AR e FAT), gerando menos de 7% de interneurônios inibitórios e contrariando a potencial diferença neurogênica observada nos resultados *in vitro*. Quando analisado o efeito anticonvulsivante em animais que receberam transplante de células da EGM cultivadas na condição CAR AR não detectamos redução da frequência de crises, apresentando médias semelhantes às encontradas no grupo controle que não receberam células. As células cultivadas na condição CAR AR apresentaram apenas 2% a menos de células GFAP positivas comparado ao grupo FAT, sendo que essa pequena diferença não explica a anulação do modesto efeito protetor obtido com o grupo FAT. Mais provavelmente, a ausência do efeito protetor está associada ao carenciamento realizado *in vitro*. Sabemos que a presença de fatores de crescimento é necessária para a sobrevivência e proliferação das células-tronco neurais cultivadas como neuroesferas (Ciccolini & Svendsen, 1998). As análises *in vitro* demonstraram resultados promissores, no entanto a ausência dos fatores de crescimento pode ter fragilizado e modificado as características de auto renovação e função dessas células que, ao se depararem com um ambiente hostil no hipocampo epiléptico, diferente das condições favoráveis *in vitro*, não conseguiram desempenhar seu papel de forma correta.

Portanto, pensando na reposição de interneurônios inibitórios, o uso de células da EGM que não foram expandidas como neuroesferas é o mais indicado. Essa estratégia pode ser promissora não apenas para ELT, mas também para desordens neurológicas em que o aumento da inibição é necessário. Além de atenuar as crises epilépticas, as células da EGM promovem diminuição significativa na ansiedade (Valente et al., 2013). Um estudo realizado por Romariz e colaboradores comparou o potencial ansiolítico de células oriundas da EGM que não passaram por cultura com

as células da mesma região cultivadas como neuroesferas. Ao analisar os resultados, apenas os animais transplantados com as células que não foram submetidas à formação de neuroesferas apresentaram uma diminuição significativa dos níveis de ansiedade. O comportamento ansiolítico observado está relacionado ao aumento da inibição. As células cultivadas como neuroesferas originaram poucos interneurônios inibitórios, e estes não foram capazes de modificar a circuitaria inibitória (Romariz et al., 2014).

Uma das críticas sobre o uso de células dissociadas de neuroesferas em transplante é a diminuição do seu potencial migratório, comparado ao alto potencial migratório observado em transplantes de células frescas (transplantadas imediatamente após a extração) da mesma região (Wichterle et al., 1999). Baseado no grande potencial de migração que as células frescas da EGM possuem, alguns estudos avaliaram o efeito do transplante dessas células no córtex de recém nascidos (Baraban et al., 2009) e na amígdala de animais adultos (Gallego et al., 2010), e apesar do transplante ser em regiões diferentes, foi observada migração e atenuação das crises. Por outro lado, os trabalhos em que foram realizados transplantes com células da EGM cultivadas como neuroesferas transplantaram essas células apenas na região do hipocampo e não mostraram dados sobre a migração (Hattiangady & Shetty, 2011; Waldau et al., 2010).

Aparentemente, essa diferença do potencial migratório não foi observada em nossos experimentos. Independente do grupo analisado, as células GFP<sup>+</sup> permaneceram no local da injeção e não apresentaram um grande potencial de migração ficando restritas à região do hipocampo, onde foram injetadas. No entanto, trata-se de uma estrutura tridimensional, e o fato dos neurônios inibitórios derivados de células da EGM transplantadas imediatamente após a extração (não cultivadas) possuírem alto potencial migratório (segundo a literatura) aumenta a chance dessas células se dispersarem pelo hipocampo de forma efetiva. Isso provavelmente resultou em uma maior integração na circuitaria hipocampal, gerando o aumento da inibição, e talvez por isso apresentaram uma proteção mais efetiva.

Além do potencial migratório, devemos considerar que o micro-ambiente encontrado pode ter influenciado na permanência das células no local, e até mesmo no seu fenótipo celular. O transplante foi realizado durante a epileptogênese, ou seja, poucos dias após o SE. Já é bem estabelecido que durante o SE gerado pelo

modelo da pilocarpina, ocorre morte de interneurônios inibitórios, gliose e aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, entre outras alterações (Covolan & Mello, 2000; Sloviter et al., 2003). Essas alterações que ocorrem no hipocampo epiléptico desencadeiam uma resposta inflamatória, aumentando a presença de citocinas e fatores quimioatrativos, como por exemplo IL-1beta, TNF-alpha e CXCL-12 (Marchi et al., 2007). Uma possível hipótese que explica a baixa taxa de migração é a influência dos fatores quimioatrativos, como CXCL-12, presentes no microambiente que as células encontraram após o transplante hipocampal em um cérebro já danificado pela crise (Gage, 2000; Hartman et al., 2010; Sypecka et al., 2009).

No presente estudo, as células foram transplantadas no hipocampo, mais especificamente no hilo, região onde a perda de interneurônios inibitórios é mais intensa na ELT (Magloczky et al., 2000; Toth et al., 2010). Henderson e colaboradores realizaram o transplante de células da EGM no mesmo local, e através de estudos eletrofisiológicos constataram que essas células estabeleceram fortes correntes inibitórias pós-sinápticas com as células granulares do giro denteado, sugerindo que a redução das crises ocorreu devido a uma alteração na circuitaria hipocampal. No entanto, os autores propõem que diferentes locais de injeção dentro do hipocampo devem resultar em diferentes padrões de sinapses com diferentes neurônios do hipocampo, que por sua vez pode resultar em uma proteção mais completa (Henderson et al., 2014; Hunt et al., 2013). Os trabalhos que realizaram transplante de células da EGM, assim como o nosso, selecionam apenas um local para o transplante dessas células. Ainda assim, outra possibilidade pouco explorada que pode contribuir para uma proteção mais efetiva, é a realização do transplante em diversos sítios de injeções, por exemplo, ao longo do hipocampo ou em locais estratégicos que estejam envolvidos com a propagação das crises epiléticas. Diante disso, o local de injeção do transplante pode ser fundamental para se obter um bom resultado.

Outra questão importante é o período de observação das crises. Em um estudo onde as crises foram observadas por aproximadamente 100 dias, a proteção significativa das crises só ocorreu por um período de aproximadamente um mês, e quando a análise do período de 80 dias após o SE foi feita o efeito protetor não apareceu (Henderson et al., 2014). Diante disso, estudos que avaliaram a frequência das crises por um curto período de observação ou por períodos intermitentes podem

ter superestimado a eficácia dos transplantes da EGM (Baraban et al., 2009; Hunt et al., 2013). Além disso, a grande variabilidade na frequência de crises dentro do mesmo grupo experimental, ou até de um mesmo animal, e a presença de um período latente (ou silencioso) em que as crises demoram a aparecer, pode influenciar de forma significativa as análises. Mesmo assim, conseguimos identificar uma redução significativa das crises nos animais pertencentes aos grupos EGM e FAT que foram observados por 90 dias. Os registros de EEG obtidos por 7 dias tiveram o intuito de uma análise qualitativa (e não quantitativa), e portanto não observamos redução significativa neste parâmetro de análise de frequência de crises, talvez devido ao curto período de observação. Porém, os animais que receberam células da EGM que não foram cultivadas como neuroesferas apresentaram a menor porcentagem do total de crises registradas por EEG, em torno de 7,1%, já as células cultivadas como neuroesferas na presença de fatores de crescimento apresentaram 32,8%. Os dados relativos à filmagem das crises e registros eletronecefalográficos são concordantes e sugerem que as células da EGM transplantadas após a extração produzam um efeito protetor mais eficaz.

Apesar dos dados indicarem um resultado mais promissor com as células não cultivadas, o cultivo de neuroesferas tem algumas vantagens. O uso de neuroesferas permite a utilização de poucos embriões para conseguir uma grande quantidade de células e possibilita o armazenamento das mesmas. Além dos pontos positivos citados, diversos estudos utilizam cultura de neuroesferas como uma ferramenta para obtenção de células para transplantes em diversas patologias (Darsalia et al., 2011; Kumagai et al., 2009; Lu et al., 2002; Zhu et al., 2009).

Recentemente, além do uso de células fetais, como os progenitores neurais oriundas da EGM, a produção de células GABérgicas *in vitro* pode acontecer por meio de células-tronco embrionárias humanas e células pluripotentes induzidas (iPSCs). Com base na compreensão de combinações de sequências de fatores de crescimento e moléculas de sinalização necessárias para a especificação de interneurônios inibitórios, a produção dessas células de uma forma mais homogênea e em grande escala parece possível (Germain et al., 2013; Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009; Maroof et al., 2013). No entanto, torna-se necessário compreender as modificações que podem ou não ocorrer nas células em cultivo, a fim de se encontrar a condição ideal de cultura, que permite selecionar o tipo celular que será

utilizado em determinada patologia, propondo um sistema mais robusto, homogêneo e estável.

## 7. Conclusões

Nossos dados *in vitro* indicam que o cultivo de progenitores neurais extraídos da EGM na presença de AR, combinado com a ausência de fatores de crescimento (grupo CAR AR), é a condição que produz neuroesferas com maior enriquecimento em neurônio expressão dos genes *Dlx1*, *Lhx6* e *Nkx2.1*, na fase em que as células ainda se encontram como agregados celulares. Além disso, há uma diminuição significativa dos genes *Dlx1*, *Nkx2.1* e *Lhx6* presentes nas células da EGM quando essas são cultivadas como neuroesferas. Diante disso, as condições de cultura que as células da EGM são expostas após retirada de seu nicho influenciam o seu fenótipo celular sendo, a integração de mecanismos de sinalização intrínsecos e extrínsecos essencial para a manutenção das características de progenitores da EGM.

Após transplante em animais epiléticos, mais precisamente durante a fase epileptogênica, as células oriundas da EGM se diferenciam em interneurônios inibitórios e astrócitos, independente da condição previamente utilizada (CAR AR, FAT e EGM). No entanto, as células da EGM que não foram cultivadas como neuroesferas são as que mais se diferenciam em interneurônios inibitórios, o que gerou a redução da frequência e duração das crises de forma mais efetiva devido ao aumento da inibição. Apesar das modificações da condição de cultivo e dos bons resultados obtidos *in vitro*, poucas células da condição CAR AR se diferenciam em interneurônios inibitórios e as mesmas não diminuem a frequência e duração das crises epiléticas. As células cultivadas como neuroesferas na condição FAT apresentam uma baixa porcentagem de interneurônios inibitórios, assim como baixa porcentagem de neurônios (*in vitro*). No entanto, essas células reduzem a frequência e duração de crises do tipo IV, descartando a hipótese de reposição de interneurônios inibitórios como único mecanismo modulador das CER e trazendo à tona a possibilidade de uma proteção neuronal promovida pela secreção de fatores neurotróficos por células-tronco ou células da glia transplantadas.

Nosso trabalho contribuiu para uma melhor compreensão sobre o uso de células progenitoras neurais da EGM como uma possível forma de terapia celular para epilepsia. Sabemos que para propor uma terapia mais estudos são necessários, porém pudemos evidenciar o efeito anticonvulsivo de progenitores neurais da EGM na ELT e a sua capacidade de se diferenciar em interneurônios

inibitórios. Outra contribuição importante é que as modificações na cultura (retirada dos fatores de crescimento e adição de AR) durante a fase de proliferação como neuroesferas não foram eficientes para o aumento da diferenciação de neurônios GABAérgicos nem para a proteção das crises. A técnica de neuroesferas não é a ideal para viabilizar o uso de progenitores da EGM como fonte de reposição de interneurônios inibitórios. No entanto, essas células possuem um grande potencial anticonvulsivo que merece ser melhor investigado, a fim de encontrar uma forma de obtenção em larga escala que seja capaz de gerar uma população mais homogênea de interneurônios inibitórios, para que essas células possam ser utilizadas em doenças onde há déficits da inibição. Transposto este obstáculo, o uso de células da EGM com a finalidade do transplante ficará mais próximo de pesquisas translacionais.

## 9. Referências Bibliográficas

Acharya, M. M., Hattiangady, B., Shetty, A. K. Progress in neuroprotective strategies for preventing epilepsy. **Prog Neurobiol**, v. 84, n. 4, p. 363-404, Apr 2008.

Aguirre, A., Gallo, V. Reduced EGFR signaling in progenitor cells of the adult subventricular zone attenuates oligodendrogenesis after demyelination. **Neuron Glia Biol**, v. 3, n. 3, p. 209-20, Aug 2007.

Ahmed, S. The culture of neural stem cells. **J Cell Biochem**, v. 106, n. 1, p. 1-6, Jan 1 2009.

Altman, J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. **J Comp Neurol**, v. 137, n. 4, p. 433-57, Dec 1969.

Altman, J., Das, G. D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **J Comp Neurol**, v. 124, n. 3, p. 319-35, Jun 1965.

Alvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J. M. Neurogenesis in adult subventricular zone. **J Neurosci**, v. 22, n. 3, p. 629-34, Feb 1 2002.

Alvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J. M., Tramontin, A. D. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, n. 4, p. 287-93, Apr 2001.

Alvarez-Dolado, M., Calcagnotto, M. E., Karkar, K. M., Southwell, D. G., Jones-Davis, D. M., Estrada, R. C., Rubenstein, J. L., Alvarez-Buylla, A., Baraban, S. C. Cortical inhibition modified by embryonic neural precursors grafted into the postnatal brain. **J Neurosci**, v. 26, n. 28, p. 7380-9, Jul 12 2006.

Andersen, Per, Morris, Richard, Amaral, David, Bliss, Tim, O'Keefe, John. **The hippocampus book**. Oxford: Oxford University Press., 2007.

Anderson, S. A., Baraban, S. C. Cell Therapy Using GABAergic Neural Progenitors. In: NOEBELS, J. L.;AVOLI, M., *et al* (Ed.). **Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies**. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US) Michael A Rogawski, Antonio V Delgado-Escueta, Jeffrey L Noebels, Massimo Avoli and Richard W Olsen., 2012.

Anderson, S. A., Marin, O., Horn, C., Jennings, K., Rubenstein, J. L. Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. **Development**, v. 128, n. 3, p. 353-63, Feb 2001.

Andrade-Valenca, L. P., Valenca, M. M., Velasco, T. R., Carlotti, C. G., Jr., Assirati, J. A., Galvis-Alonso, O. Y., Neder, L., Cendes, F., Leite, J. P. Mesial temporal lobe epilepsy: clinical and neuropathologic findings of familial and sporadic forms. **Epilepsia**, v. 49, n. 6, p. 1046-54, Jun 2008.

Andre, V., Marescaux, C., Nehlig, A., Fritschy, J. M. Alterations of hippocampal GABAergic system contribute to development of spontaneous recurrent seizures in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Hippocampus**, v. 11, n. 4, p. 452-68, 2001.

Babb, T. L., Kupfer, W. R., Pretorius, J. K., Crandall, P. H., Levesque, M. F. Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. **Neuroscience**, v. 42, n. 2, p. 351-63, 1991.

Baharvand, H., Mehrjardi, N. Z., Hatami, M., Kiani, S., Rao, M., Haghghi, M. M. Neural differentiation from human embryonic stem cells in a defined adherent culture condition. **Int J Dev Biol**, v. 51, n. 5, p. 371-8, 2007.

Baraban, S. C. Neuropeptide Y and limbic seizures. **Rev Neurosci**, v. 9, n. 2, p. 117-28, 1998.

Baraban, S. C., Southwell, D. G., Estrada, R. C., Jones, D. L., Sebe, J. Y., Alfaro-Cervello, C., Garcia-Verdugo, J. M., Rubenstein, J. L., Alvarez-Buylla, A. Reduction of seizures by transplantation of cortical GABAergic interneuron precursors into Kv1.1 mutant mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 36, p. 15472-7, Sep 8 2009.

Barry, D. I., Kikvadze, I., Brundin, P., Bolwig, T. G., Bjorklund, A., Lindvall, O. Grafted noradrenergic neurons suppress seizure development in kindling-induced epilepsy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 23, p. 8712-5, Dec 1987.

Bedner, P., Dupper, A., Huttmann, K., Muller, J., Herde, M. K., Dublin, P., Deshpande, T., Schramm, J., Haussler, U., Haas, C. A., Henneberger, C., Theis, M., Steinhauser, C. Astrocyte uncoupling as a cause of human temporal lobe epilepsy. **Brain**, v. 138, n. Pt 5, p. 1208-22, May 2015.

Ben-Ari, Y., Tremblay, E., Riche, D., Ghilini, G., Naquet, R. Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline or pentetrazole: metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. **Neuroscience**, v. 6, n. 7, p. 1361-91, 1981.

Bengzon, J., Kokaia, Z., Lindvall, O. Specific functions of grafted locus coeruleus neurons in the kindling model of epilepsy. **Exp Neurol**, v. 122, n. 1, p. 143-54, Jul 1993.

Berg, A. T., Scheffer, I. E. New concepts in classification of the epilepsies: entering the 21st century. **Epilepsia**, v. 52, n. 6, p. 1058-62, Jun 2011.

Berg, A. T., Vickrey, B. G., Langfitt, J. T., Sperling, M. R., Walczak, T. S., Shinnar, S., Bazil, C. W., Pacia, S. V., Spencer, S. S. The multicenter study of epilepsy surgery: recruitment and selection for surgery. **Epilepsia**, v. 44, n. 11, p. 1425-33, Nov 2003.

Bibel, M., Richter, J., Schrenk, K., Tucker, K. L., Staiger, V., Korte, M., Goetz, M., Barde, Y. A. Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage. **Nat Neurosci**, v. 7, n. 9, p. 1003-9, Sep 2004.

Bortolotto, Z. A., Calderazzo, L., Cavalheiro, E. A. Some evidence that intrahippocampal grafting of noradrenergic neurons suppresses spontaneous seizures in epileptic rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 23, n. 12, p. 1267-9, 1990.

Brenneke, F., Schachner, M., Elger, C. E., Lie, A. A. Up-regulation of the extracellular matrix glycoprotein tenascin-R during axonal reorganization and astrogliosis in the adult rat hippocampus. **Epilepsy Res**, v. 58, n. 2-3, p. 133-43, Feb 2004.

Butt, S. J., Fuccillo, M., Nery, S., Noctor, S., Kriegstein, A., Corbin, J. G., Fishell, G. The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype. **Neuron**, v. 48, n. 4, p. 591-604, Nov 23 2005.

Butt, S. J., Sousa, V. H., Fuccillo, M. V., Hjerling-Leffler, J., Miyoshi, G., Kimura, S., Fishell, G. The requirement of Nkx2-1 in the temporal specification of cortical interneuron subtypes. **Neuron**, v. 59, n. 5, p. 722-32, Sep 11 2008.

Caboclo, L. O., Neves, R. S., Jardim, A. P., Hamad, A. P., Centeno, R. S., Lancellotti, C. L., Scorza, C. A., Cavalheiro, E. A., Yacubian, E. M., Sakamoto, A. C. Surgical and postmortem pathology studies: contribution for the investigation of temporal lobe epilepsy. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 70, n. 12, p. 945-52, Dec 2012.

Cajal, Santiago Ramon y. **Degeneration and regeneration of the nervous system**. Oxford University Press, 1928.

Calcagnotto, M. E., Zipancic, I., Piquer-Gil, M., Mello, L. E., Alvarez-Dolado, M. Grafting of GABAergic precursors rescues deficits in hippocampal inhibition. **Epilepsia**, v. 51 Suppl 3, p. 66-70, Jul 2010.

Cardoso, T. A., Coan, A. C., Kobayashi, E., Guerreiro, C. A., Li, L. M., Cendes, F. Hippocampal abnormalities and seizure recurrence after antiepileptic drug withdrawal. **Neurology**, v. 67, n. 1, p. 134-6, Jul 11 2006.

Carpentino, J. E., Hartman, N. W., Grabel, L. B., Naegele, J. R. Region-specific differentiation of embryonic stem cell-derived neural progenitor transplants into the adult mouse hippocampus following seizures. **J Neurosci Res**, v. 86, n. 3, p. 512-24, Feb 15 2008.

Cavalheiro, E. A. The pilocarpine model of epilepsy. **Ital J Neurol Sci**, v. 16, n. 1-2, p. 33-7, Feb-Mar 1995.

Cavalheiro, E. A., Leite, J. P., Bortolotto, Z. A., Turski, W. A., Ikonomidou, C., Turski, L. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. **Epilepsia**, v. 32, n. 6, p. 778-82, Nov-Dec 1991.

Chakir, A., Fabene, P. F., Ouazzani, R., Bentivoglio, M. Drug resistance and hippocampal damage after delayed treatment of pilocarpine-induced epilepsy in the rat. **Brain Res Bull**, v. 71, n. 1-3, p. 127-38, Dec 11 2006.

Chang, B. S., Lowenstein, D. H. Epilepsy. **N Engl J Med**, v. 349, n. 13, p. 1257-66, Sep 25 2003.

Chatzi, C., Brade, T., Duester, G. Retinoic acid functions as a key GABAergic differentiation signal in the basal ganglia. **PLoS Biol**, v. 9, n. 4, p. e1000609, Apr 2011.

Chen, S., Fujita, S., Koshikawa, N., Kobayashi, M. Pilocarpine-induced status epilepticus causes acute interneuron loss and hyper-excitatory propagation in rat insular cortex. **Neuroscience**, v. 166, n. 1, p. 341-53, Mar 10 2010.

Cherian, A., Thomas, S. V. Status epilepticus. **Ann Indian Acad Neurol**, v. 12, n. 3, p. 140-53, Jul 2009.

Chow, S. Y., Moul, J., Tobias, C. A., Himes, B. T., Liu, Y., Obrocka, M., Hodge, L., Tessler, A., Fischer, I. Characterization and intraspinal grafting of EGF/bFGF-dependent neurospheres derived from embryonic rat spinal cord. **Brain Res**, v. 874, n. 2, p. 87-106, Aug 25 2000.

Christie, V. B., Maltman, D. J., Henderson, A. P., Whiting, A., Marder, T. B., Lako, M., Przyborski, S. A. Retinoid supplementation of differentiating human neural progenitors and embryonic stem cells leads to enhanced neurogenesis in vitro. **J Neurosci Methods**, v. 193, n. 2, p. 239-45, Nov 30 2010.

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., Roh, J. K. Human neural stem cell transplantation reduces spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus in adult rats. **Brain Res**, v. 1023, n. 2, p. 213-21, Oct 15 2004.

Ciccolini, F., Mandl, C., Holz-Wenig, G., Kehlenbach, A., Hellwig, A. Prospective isolation of late development multipotent precursors whose migration is promoted by EGFR. **Dev Biol**, v. 284, n. 1, p. 112-25, Aug 1 2005.

Ciccolini, F., Svendsen, C. N. Fibroblast growth factor 2 (FGF-2) promotes acquisition of epidermal growth factor (EGF) responsiveness in mouse striatal precursor cells: identification of neural precursors responding to both EGF and FGF-2. **J Neurosci**, v. 18, n. 19, p. 7869-80, Oct 1 1998.

Clasadonte, J., Dong, J., Hines, D. J., Haydon, P. G. Astrocyte control of synaptic NMDA receptors contributes to the progressive development of temporal lobe epilepsy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 43, p. 17540-5, Oct 22 2013.

Clevers, H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. **Nat Med**, v. 17, n. 3, p. 313-9, Mar 2011.

Cobos, I., Calcagnotto, M. E., Vilaythong, A. J., Thwin, M. T., Noebels, J. L., Baraban, S. C., Rubenstein, J. L. Mice lacking Dlx1 show subtype-specific loss of interneurons, reduced inhibition and epilepsy. **Nat Neurosci**, v. 8, n. 8, p. 1059-68, Aug 2005.

Cobos, I., Puelles, L., Martinez, S. The avian telencephalic subpallium originates inhibitory neurons that invade tangentially the pallium (dorsal ventricular ridge and cortical areas). **Dev Biol**, v. 239, n. 1, p. 30-45, Nov 1 2001.

Colombo, E., Collombat, P., Colasante, G., Bianchi, M., Long, J., Mansouri, A., Rubenstein, J. L., Broccoli, V. Inactivation of Arx, the murine ortholog of the X-linked lissencephaly with ambiguous genitalia gene, leads to severe disorganization of the ventral telencephalon with impaired neuronal migration and differentiation. **J Neurosci**, v. 27, n. 17, p. 4786-98, Apr 25 2007.

Conti, L., Pollard, S. M., Gorba, T., Reitano, E., Toselli, M., Biella, G., Sun, Y., Sanzone, S., Ying, Q. L., Cattaneo, E., Smith, A. Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. **PLoS Biol**, v. 3, n. 9, p. e283, Sep 2005.

Corbin, J. G., Butt, S. J. Developmental mechanisms for the generation of telencephalic interneurons. **Dev Neurobiol**, v. 71, n. 8, p. 710-32, Aug 2011.

Cornish, S. M., Wheal, H. V. Long-term loss of paired pulse inhibition in the kainic acid-lesioned hippocampus of the rat. **Neuroscience**, v. 28, n. 3, p. 563-71, 1989.

Covolán, L., Mello, L. E. Temporal profile of neuronal injury following pilocarpine or kainic acid-induced status epilepticus. **Epilepsy Res**, v. 39, n. 2, p. 133-52, Apr 2000.

Danglot, L., Triller, A., Marty, S. The development of hippocampal interneurons in rodents. **Hippocampus**, v. 16, n. 12, p. 1032-60, 2006.

Darsalia, V., Allison, S. J., Cusulin, C., Monni, E., Kuzdas, D., Kallur, T., Lindvall, O., Kokaia, Z. Cell number and timing of transplantation determine survival of human neural stem cell grafts in stroke-damaged rat brain. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 31, n. 1, p. 235-42, Jan 2011.

de Alvaro, C., Martinez, N., Rojas, J. M., Lorenzo, M. Sprouty-2 overexpression in C2C12 cells confers myogenic differentiation properties in the presence of FGF2. **Mol Biol Cell**, v. 16, n. 9, p. 4454-61, Sep 2005.

de Araujo Filho, G. M., Gomes, F. L., Mazetto, L., Marinho, M. M., Tavares, I. M., Caboclo, L. O., Yacubian, E. M., Centeno, R. S. Major depressive disorder as a predictor of a worse seizure outcome one year after surgery in patients with temporal lobe epilepsy and mesial temporal sclerosis. **Seizure**, v. 21, n. 8, p. 619-23, Oct 2012.

de Lanerolle, N. C., Kim, J. H., Robbins, R. J., Spencer, D. D. Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy. **Brain Res**, v. 495, n. 2, p. 387-95, Aug 28 1989.

DeFelipe, J. Chandelier cells and epilepsy. **Brain**, v. 122 ( Pt 10), p. 1807-22, Oct 1999.

Delgado-Escueta, A. V., Ward, A. A., Jr., Woodbury, D. M., Porter, R. J. New wave of research in the epilepsies. **Adv Neurol**, v. 44, p. 3-55, 1986.

DeToledo, J. C., Ramsay, R. E., Lowe, M. R. Epilepsy: disease, illness, or disorder? **Epilepsy Behav**, v. 4, n. 5, p. 455-6, Oct 2003.

Dichter, M. A., Ayala, G. F. Cellular mechanisms of epilepsy: a status report. **Science**, v. 237, n. 4811, p. 157-64, Jul 10 1987.

Diez del Corral, R., Olivera-Martinez, I., Goriely, A., Gale, E., Maden, M., Storey, K. Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern, neuronal differentiation, and segmentation during body axis extension. **Neuron**, v. 40, n. 1, p. 65-79, Sep 25 2003.

Dobrev, D. P., Neycheva, T., Mudrov, N. Bootstrapped two-electrode biosignal amplifier. **Med Biol Eng Comput**, v. 46, n. 6, p. 613-9, Jun 2008.

Dono, R., Texido, G., Dussel, R., Ehmke, H., Zeller, R. Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF-2-deficient mice. **Embo j**, v. 17, n. 15, p. 4213-25, Aug 3 1998.

Du, T., Xu, Q., Ocbina, P. J., Anderson, S. A. NKX2.1 specifies cortical interneuron fate by activating Lhx6. **Development**, v. 135, n. 8, p. 1559-67, Apr 2008.

Duncan, J. S., Sander, J. W., Sisodiya, S. M., Walker, M. C. Adult epilepsy. **Lancet**, v. 367, n. 9516, p. 1087-100, Apr 1 2006.

Duong, V., Rochette-Egly, C. The molecular physiology of nuclear retinoic acid receptors. From health to disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1812, n. 8, p. 1023-31, Aug 2011.

Einstein, O., Ben-Menachem-Tzidon, O., Mizrachi-Kol, R., Reinhartz, E., Grigoriadis, N., Ben-Hur, T. Survival of neural precursor cells in growth factor-poor environment: implications for transplantation in chronic disease. **Glia**, v. 53, n. 4, p. 449-55, Mar 2006.

Engel. Intractable epilepsy: definition and neurobiology. **Epilepsia**, v. 42 Suppl 6, p. 3, 2001.

Engel, McDermott, M. P., Wiebe, S., Langfitt, J. T., Stern, J. M., Dewar, S., Sperling, M. R., Gardiner, I., Erba, G., Fried, I., Jacobs, M., Vinters, H. V., Mintzer, S., Kieburz, K. Early surgical therapy for drug-resistant temporal lobe epilepsy: a randomized trial. **Jama**, v. 307, n. 9, p. 922-30, Mar 7 2012.

Engel, Pedley. **Epilepsy: A comprehensive textbook**. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997.

Erceg, S., Lainez, S., Ronaghi, M., Stojkovic, P., Perez-Arago, M. A., Moreno-Manzano, V., Moreno-Palanques, R., Planells-Cases, R., Stojkovic, M. Differentiation of human embryonic stem cells to regional specific neural precursors in chemically defined medium conditions. **PLoS One**, v. 3, n. 5, p. e2122, 2008.

Eriksson, C., Bjorklund, A., Wictorin, K. Neuronal differentiation following transplantation of expanded mouse neurosphere cultures derived from different embryonic forebrain regions. **Exp Neurol**, v. 184, n. 2, p. 615-35, Dec 2003.

Fisher, R. S. Redefining epilepsy. **Curr Opin Neurol**, v. 28, n. 2, p. 130-5, Apr 2015.

Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., Engel, J., Jr., Forsgren, L., French, J. A., Glynn, M., Hesdorffer, D. C., Lee, B. I., Mathern, G. W., Moshe, S. L., Perucca, E., Scheffer, I. E., Tomson, T., Watanabe, M., Wiebe, S. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p. 475-82, Apr 2014.

Fisher, R. S., van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., Engel, J., Jr. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, v. 46, n. 4, p. 470-2, Apr 2005.

Flandin, P., Zhao, Y., Vogt, D., Jeong, J., Long, J., Potter, G., Westphal, H., Rubenstein, J. L. Lhx6 and Lhx8 coordinately induce neuronal expression of Shh that controls the generation of interneuron progenitors. **Neuron**, v. 70, n. 5, p. 939-50, Jun 9 2011.

Flax, J. D., Aurora, S., Yang, C., Simonin, C., Wills, A. M., Billingham, L. L., Jendoubi, M., Sidman, R. L., Wolfe, J. H., Kim, S. U., Snyder, E. Y. Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes. **Nat Biotechnol**, v. 16, n. 11, p. 1033-9, Nov 1998.

French, J. A., Williamson, P. D., Thadani, V. M., Darcey, T. M., Mattson, R. H., Spencer, S. S., Spencer, D. D. Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. **Ann Neurol**, v. 34, n. 6, p. 774-80, Dec 1993.

Freund, T. F., Buzsaki, G. Interneurons of the hippocampus. **Hippocampus**, v. 6, n. 4, p. 347-470, 1996.

Freund, T. F., Ylinen, A., Miettinen, R., Pitkanen, A., Lahtinen, H., Baimbridge, K. G., Riekkinen, P. J. Pattern of neuronal death in the rat hippocampus after status epilepticus. Relationship to calcium binding protein content and ischemic vulnerability. **Brain Res Bull**, v. 28, n. 1, p. 27-38, Jan 1992.

Frisen, J., Haegerstrand, A., Risling, M., Fried, K., Johansson, C. B., Hammarberg, H., Elde, R., Hokfelt, T., Cullheim, S. Spinal axons in central nervous system scar

tissue are closely related to laminin-immunoreactive astrocytes. **Neuroscience**, v. 65, n. 1, p. 293-304, Mar 1995.

Fritschy, J. M., Kiener, T., Boullieret, V., Loup, F. GABAergic neurons and GABA(A)-receptors in temporal lobe epilepsy. **Neurochem Int**, v. 34, n. 5, p. 435-45, May 1999.

Gabay, L., Lowell, S., Rubin, L. L., Anderson, D. J. Deregulation of dorsoventral patterning by FGF confers trilineage differentiation capacity on CNS stem cells in vitro. **Neuron**, v. 40, n. 3, p. 485-99, Oct 30 2003.

Gage, F. H. Mammalian neural stem cells. **Science**, v. 287, n. 5457, p. 1433-8, Feb 25 2000.

\_\_\_\_\_. Neurogenesis in the adult brain. **J Neurosci**, v. 22, n. 3, p. 612-3, Feb 1 2002.

Gage, F. H., Ray, J., Fisher, L. J. Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. **Annu Rev Neurosci**, v. 18, p. 159-92, 1995.

Gallego, J. M., Sancho, F. J., Vidueira, S., Ortiz, L., Gomez-Pinedo, U., Barcia, J. A. Injection of embryonic median ganglionic eminence cells or fibroblasts within the amygdala in rats kindled from the piriform cortex. **Seizure**, v. 19, n. 8, p. 461-6, Oct 2010.

Gastaut, H., Gastaut, J. L., Goncalves e Silva, G. E., Fernandez Sanchez, G. R. Relative frequency of different types of epilepsy: a study employing the classification of the International League Against Epilepsy. **Epilepsia**, v. 16, n. 3, p. 457-61, Sep 1975.

Germain, N. D., Banda, E. C., Becker, S., Naegele, J. R., Grabel, L. B. Derivation and isolation of NKX2.1-positive basal forebrain progenitors from human embryonic stem cells. **Stem Cells Dev**, v. 22, n. 10, p. 1477-89, May 15 2013.

Giardino, L., Bettelli, C., Calza, L. In vivo regulation of precursor cells in the subventricular zone of adult rat brain by thyroid hormone and retinoids. **Neurosci Lett**, v. 295, n. 1-2, p. 17-20, Dec 1 2000.

Giblin, K. A., Blumenfeld, H. Is epilepsy a preventable disorder? New evidence from animal models. **Neuroscientist**, v. 16, n. 3, p. 253-75, Jun 2010.

Goffin, K., Nissinen, J., Van Laere, K., Pitkanen, A. Cyclicality of spontaneous recurrent seizures in pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in rat. **Exp Neurol**, v. 205, n. 2, p. 501-5, Jun 2007.

Gudas, L. J., Wagner, J. A. Retinoids regulate stem cell differentiation. **J Cell Physiol**, v. 226, n. 2, p. 322-30, Feb 2011.

Guerreiro, C. A. Surgery for refractory mesial temporal lobe epilepsy: prognostic factors and early, rather than late, intervention. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 70, n. 5, p. 315, May 2012.

Guilhoto, Laura Maria de Figueiredo Ferreira. Revisão Terminológica e Conceitual para Organização de Crises e Epilepsias: Relato da Comissão da ILAE de Classificação e Terminologia, 2005-2009. Novos Paradigmas? **J Epilepsy Clin Neurophysiol**, v. 7, n. 3, p. 100-05, 2011.

Guillemot, F., Zimmer, C. From cradle to grave: the multiple roles of fibroblast growth factors in neural development. **Neuron**, v. 71, n. 4, p. 574-88, Aug 25 2011.

Hack, M. A., Sugimori, M., Lundberg, C., Nakafuku, M., Gotz, M. Regionalization and fate specification in neurospheres: the role of Olig2 and Pax6. **Mol Cell Neurosci**, v. 25, n. 4, p. 664-78, Apr 2004.

Hahn, M., Timmer, M., Nikkhah, G. Survival and early functional integration of dopaminergic progenitor cells following transplantation in a rat model of Parkinson's disease. **J Neurosci Res**, v. 87, n. 9, p. 2006-19, Jul 2009.

Hamilton, S. E., Loose, M. D., Qi, M., Levey, A. I., Hille, B., McKnight, G. S., Idzerda, R. L., Nathanson, N. M. Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 24, p. 13311-6, Nov 25 1997.

Hanaya, R., Sasa, M., Sugata, S., Tokudome, M., Serikawa, T., Kurisu, K., Arita, K. Hippocampal cell loss and propagation of abnormal discharges accompanied with the expression of tonic convulsion in the spontaneously epileptic rat. **Brain Res**, v. 1328, p. 171-80, Apr 30 2010.

Hartman, N. W., Carpentino, J. E., LaMonica, K., Mor, D. E., Naegele, J. R., Grabel, L. CXCL12-mediated guidance of migrating embryonic stem cell-derived neural progenitors transplanted into the hippocampus. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e15856, 2010.

Haskell, G. T., LaMantia, A. S. Retinoic acid signaling identifies a distinct precursor population in the developing and adult forebrain. **J Neurosci**, v. 25, n. 33, p. 7636-47, Aug 17 2005.

Hattiangady, B., Rao, M. S., Shetty, A. K. Grafting of striatal precursor cells into hippocampus shortly after status epilepticus restrains chronic temporal lobe epilepsy. **Exp Neurol**, v. 212, n. 2, p. 468-81, Aug 2008.

Hattiangady, B., Shetty, A. K. Neural stem cell grafting in an animal model of chronic temporal lobe epilepsy. **Curr Protoc Stem Cell Biol**, v. Chapter 2, p. Unit2D.7, Sep 2011.

Hattiangady, B., Shuai, B., Cai, J., Coksaygan, T., Rao, M. S., Shetty, A. K. Increased dentate neurogenesis after grafting of glial restricted progenitors or neural stem cells in the aging hippocampus. **Stem Cells**, v. 25, n. 8, p. 2104-17, Aug 2007.

Hedlund, E., Hefferan, M. P., Marsala, M., Isacson, O. Cell therapy and stem cells in animal models of motor neuron disorders. **Eur J Neurosci**, v. 26, n. 7, p. 1721-37, Oct 2007.

Henderson, K. W., Gupta, J., Tagliatela, S., Litvina, E., Zheng, X., Van Zandt, M. A., Woods, N., Grund, E., Lin, D., Royston, S., Yanagawa, Y., Aaron, G. B., Naegele, J. R. Long-term seizure suppression and optogenetic analyses of synaptic connectivity in epileptic mice with hippocampal grafts of GABAergic interneurons **J Neurosci**, v. 34, n. 40, p. 13492-504, Oct 1 2014.

Henning, Ulrich. **Perspectives of Stem Cells**. Springer, 2010.

Hirami, Y., Osakada, F., Takahashi, K., Okita, K., Yamanaka, S., Ikeda, H., Yoshimura, N., Takahashi, M. Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells. **Neurosci Lett**, v. 458, n. 3, p. 126-31, Jul 24 2009.

Hirschhaeuser, F., Menne, H., Dittfeld, C., West, J., Mueller-Klieser, W., Kunz-Schughart, L. A. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. **J Biotechnol**, v. 148, n. 1, p. 3-15, Jul 1 2010.

Hitoshi, S., Tropepe, V., Ekker, M., van der Kooy, D. Neural stem cell lineages are regionally specified, but not committed, within distinct compartments of the developing brain. **Development**, v. 129, n. 1, p. 233-44, Jan 2002.

Holmin, S., Almqvist, P., Lendahl, U., Mathiesen, T. Adult nestin-expressing subependymal cells differentiate to astrocytes in response to brain injury. **Eur J Neurosci**, v. 9, n. 1, p. 65-75, Jan 1997.

Horschitz, S., Matthaus, F., Gross, A., Rosner, J., Galach, M., Greffrath, W., Treede, R. D., Utikal, J., Schloss, P., Meyer-Lindenberg, A. Impact of preconditioning with retinoic acid during early development on morphological and functional characteristics of human induced pluripotent stem cell-derived neurons. **Stem Cell Res**, v. 15, n. 1, p. 30-41, Jul 2015.

Hou, Y. J., Yu, A. C., Garcia, J. M., Aotaki-Keen, A., Lee, Y. L., Eng, L. F., Hjelmeland, L. J., Menon, V. K. Astroglial growth in culture. IV. Effects of basic fibroblast growth factor. **J Neurosci Res**, v. 40, n. 3, p. 359-70, Feb 15 1995.

Houser, C. R. Do structural changes in GABA neurons give rise to the epileptic state? **Adv Exp Med Biol**, v. 813, p. 151-60, 2014.

Hunt, R. F., Girskis, K. M., Rubenstein, J. L., Alvarez-Buylla, A., Baraban, S. C. GABA progenitors grafted into the adult epileptic brain control seizures and abnormal behavior. **Nat Neurosci**, v. 16, n. 6, p. 692-7, Jun 2013.

Inan, M., Welagen, J., Anderson, S. A. Spatial and temporal bias in the mitotic origins of somatostatin- and parvalbumin-expressing interneuron subgroups and the chandelier subtype in the medial ganglionic eminence. **Cereb Cortex**, v. 22, n. 4, p. 820-7, Apr 2012.

Isokawa-Akesson, M., Wilson, C. L., Babb, T. L. Inhibition in synchronously firing human hippocampal neurons. **Epilepsy Res**, v. 3, n. 3, p. 236-47, May-Jun 1989.

Jacobs, S., Lie, D. C., DeCicco, K. L., Shi, Y., DeLuca, L. M., Gage, F. H., Evans, R. M. Retinoic acid is required early during adult neurogenesis in the dentate gyrus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 10, p. 3902-7, Mar 7 2006.

Jardim, A. P., Neves, R. S., Caboclo, L. O., Lancellotti, C. L., Marinho, M. M., Centeno, R. S., Cavalheiro, E. A., Scorza, C. A., Yacubian, E. M. Temporal lobe epilepsy with mesial temporal sclerosis: hippocampal neuronal loss as a predictor of surgical outcome. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 70, n. 5, p. 319-24, May 2012.

Jiao, Y., Nadler, J. V. Stereological analysis of GluR2-immunoreactive hilar neurons in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy: correlation of cell loss with mossy fiber sprouting. **Exp Neurol**, v. 205, n. 2, p. 569-82, Jun 2007.

Jinde, S., Zsiros, V., Nakazawa, K. Hilar mossy cell circuitry controlling dentate granule cell excitability. **Front Neural Circuits**, v. 7, p. 14, 2013.

Kandel, Eric R., Schwartz, James H., Jessell, Thomas M. **Princípios da Neurociência** Manole Saúde 2003.

Kandratavicius, L., Balista, P. A., Lopes-Aguiar, C., Ruggiero, R. N., Umeoka, E. H., Garcia-Cairasco, N., Bueno-Junior, L. S., Leite, J. P. Animal models of epilepsy: use and limitations. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 10, p. 1693-705, 2014.

Kanter-Schlifke, I., Fjord-Larsen, L., Kusk, P., Angehagen, M., Wahlberg, L., Kokaia, M. GDNF released from encapsulated cells suppresses seizure activity in the epileptic hippocampus. **Exp Neurol**, v. 216, n. 2, p. 413-9, Apr 2009.

Kanter-Schlifke, I., Georgievska, B., Kirik, D., Kokaia, M. Seizure suppression by GDNF gene therapy in animal models of epilepsy. **Mol Ther**, v. 15, n. 6, p. 1106-13, Jun 2007.

Kaplan, M. S., Hinds, J. W. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. **Science**, v. 197, n. 4308, p. 1092-4, Sep 9 1977.

Kato, M., Dobyns, W. B. X-linked lissencephaly with abnormal genitalia as a tangential migration disorder causing intractable epilepsy: proposal for a new term, "interneuronopathy". **J Child Neurol**, v. 20, n. 4, p. 392-7, Apr 2005.

Kelly, C. M., Tyers, P., Borg, M. T., Svendsen, C. N., Dunnett, S. B., Rosser, A. E. EGF and FGF-2 responsiveness of rat and mouse neural precursors derived from the embryonic CNS. **Brain Res Bull**, v. 68, n. 1-2, p. 83-94, Dec 15 2005.

Kilpatrick, T. J., Bartlett, P. F. Cloned multipotential precursors from the mouse cerebrum require FGF-2, whereas glial restricted precursors are stimulated with either FGF-2 or EGF. **J Neurosci**, v. 15, n. 5 Pt 1, p. 3653-61, May 1995.

Kim, M., Habiba, A., Doherty, J. M., Mills, J. C., Mercer, R. W., Huettner, J. E. Regulation of mouse embryonic stem cell neural differentiation by retinoic acid. **Dev Biol**, v. 328, n. 2, p. 456-71, Apr 15 2009.

Klitgaard, H., Matagne, A., Vanneste-Goemaere, J., Margineanu, D. G. Pilocarpine-induced epileptogenesis in the rat: impact of initial duration of status epilepticus on electrophysiological and neuropathological alterations. **Epilepsy Res**, v. 51, n. 1-2, p. 93-107, Sep 2002.

Kobayashi, M., Buckmaster, P. S. Reduced inhibition of dentate granule cells in a model of temporal lobe epilepsy. **J Neurosci**, v. 23, n. 6, p. 2440-52, Mar 15 2003.

Kokaia, M. Seizure-induced neurogenesis in the adult brain. **Eur J Neurosci**, v. 33, n. 6, p. 1133-8, Mar 2011.

Kornblum, H. I., Hussain, R. J., Bronstein, J. M., Gall, C. M., Lee, D. C., Seroogy, K. B. Prenatal ontogeny of the epidermal growth factor receptor and its ligand, transforming growth factor alpha, in the rat brain. **J Comp Neurol**, v. 380, n. 2, p. 243-61, Apr 7 1997.

Kosaka, N., Kodama, M., Sasaki, H., Yamamoto, Y., Takeshita, F., Takahama, Y., Sakamoto, H., Kato, T., Terada, M., Ochiya, T. FGF-4 regulates neural progenitor cell proliferation and neuronal differentiation. **Faseb j**, v. 20, n. 9, p. 1484-5, Jul 2006.

Kriegstein, A., Alvarez-Buylla, A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. **Annu Rev Neurosci**, v. 32, p. 149-84, 2009.

Kukekov, V. G., Laywell, E. D., Suslov, O., Davies, K., Scheffler, B., Thomas, L. B., O'Brien, T. F., Kusakabe, M., Steindler, D. A. Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. **Exp Neurol**, v. 156, n. 2, p. 333-44, Apr 1999.

Kumagai, G., Okada, Y., Yamane, J., Nagoshi, N., Kitamura, K., Mukaino, M., Tsuji, O., Fujiyoshi, K., Katoh, H., Okada, S., Shibata, S., Matsuzaki, Y., Toh, S., Toyama, Y., Nakamura, M., Okano, H. Roles of ES cell-derived gliogenic neural stem/progenitor cells in functional recovery after spinal cord injury. **PLoS One**, v. 4, n. 11, p. e7706, 2009.

Kwan, P., Arzimanoglou, A., Berg, A. T., Brodie, M. J., Allen Hauser, W., Mathern, G., Moshe, S. L., Perucca, E., Wiebe, S., French, J. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. **Epilepsia**, v. 51, n. 6, p. 1069-77, Jun 2010.

Lavdas, A. A., Grigoriou, M., Pachnis, V., Parnavelas, J. G. The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. **J Neurosci**, v. 19, n. 18, p. 7881-8, Sep 15 1999.

Leite, J. P., Bortolotto, Z. A., Cavalheiro, E. A. Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 14, n. 4, p. 511-7, Winter 1990.

- Leite, J. P., Cavalheiro, E. A. Effects of conventional antiepileptic drugs in a model of spontaneous recurrent seizures in rats. **Epilepsy Res**, v. 20, n. 2, p. 93-104, Feb 1995.
- Lemos, T., Cavalheiro, E. A. Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats. **Exp Brain Res**, v. 102, n. 3, p. 423-8, 1995.
- Lewis, D. A., Hashimoto, T., Volk, D. W. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, n. 4, p. 312-24, Apr 2005.
- Lie, D. C., Song, H., Colamarino, S. A., Ming, G. L., Gage, F. H. Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 44, p. 399-421, 2004.
- Liodis, P., Denaxa, M., Grigoriou, M., Akufo-Addo, C., Yanagawa, Y., Pachnis, V. Lhx6 activity is required for the normal migration and specification of cortical interneuron subtypes. **J Neurosci**, v. 27, n. 12, p. 3078-89, Mar 21 2007.
- Liu, Yu, F., Liu, W. H., He, X. H., Peng, B. W. Dysfunction of hippocampal interneurons in epilepsy. **Neurosci Bull**, v. 30, n. 6, p. 985-98, Dec 2014.
- Liu, ., Jiang, R., Yuan, S., Wang, N., Feng, Y., Hu, G., Zhu, X., Huang, K., Ma, J., Xu, G., Liu, Q., Xue, Z., Fan, G. Integrated analysis of DNA methylation and RNA transcriptome during in vitro differentiation of human pluripotent stem cells into retinal pigment epithelial cells. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e91416, 2014.
- Liu, Y., Himes, B. T., Solowska, J., Moul, J., Chow, S. Y., Park, K. I., Tessler, A., Murray, M., Snyder, E. Y., Fischer, I. Intraspinal delivery of neurotrophin-3 using neural stem cells genetically modified by recombinant retrovirus. **Exp Neurol**, v. 158, n. 1, p. 9-26, Jul 1999.
- Long, J. E., Cobos, I., Potter, G. B., Rubenstein, J. L. Dlx1&2 and Mash1 transcription factors control MGE and CGE patterning and differentiation through parallel and overlapping pathways. **Cereb Cortex**, v. 19 Suppl 1, p. i96-106, Jul 2009.
- Loscher, W., Schmidt, D. Experimental and clinical evidence for loss of effect (tolerance) during prolonged treatment with antiepileptic drugs. **Epilepsia**, v. 47, n. 8, p. 1253-84, Aug 2006.
- Lothman, E. W., Stringer, J. L., Bertram, E. H. The dentate gyrus as a control point for seizures in the hippocampus and beyond. **Epilepsy Res Suppl**, v. 7, p. 301-13, 1992.
- Lu, D., Li, Y., Mahmood, A., Wang, L., Rafiq, T., Chopp, M. Neural and marrow-derived stromal cell sphere transplantation in a rat model of traumatic brain injury. **J Neurosurg**, v. 97, n. 4, p. 935-40, Oct 2002.

Maden, M., Gale, E., Kostetskii, I., Zile, M. Vitamin A-deficient quail embryos have half a hindbrain and other neural defects. **Curr Biol**, v. 6, n. 4, p. 417-26, Apr 1 1996.

Magloczky, Z., Wittner, L., Borhegyi, Z., Halasz, P., Vajda, J., Czirjak, S., Freund, T. F. Changes in the distribution and connectivity of interneurons in the epileptic human dentate gyrus. **Neuroscience**, v. 96, n. 1, p. 7-25, 2000.

Marchetto, M. C., Carromeu, C., Acab, A., Yu, D., Yeo, G. W., Mu, Y., Chen, G., Gage, F. H., Muotri, A. R. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. **Cell**, v. 143, n. 4, p. 527-39, Nov 12 2010.

Marchi, N., Oby, E., Batra, A., Uva, L., De Curtis, M., Hernandez, N., Van Boxel-Dezaire, A., Najm, I., Janigro, D. In vivo and in vitro effects of pilocarpine: relevance to ictogenesis. **Epilepsia**, v. 48, n. 10, p. 1934-46, Oct 2007.

Mark, M., Ghyselinck, N. B., Chambon, P. Function of retinoic acid receptors during embryonic development. **Nucl Recept Signal**, v. 7, p. e002, 2009.

Maroof, A. M., Keros, S., Tyson, J. A., Ying, S. W., Ganat, Y. M., Merkle, F. T., Liu, B., Goulburn, A., Stanley, E. G., Elefanty, A. G., Widmer, H. R., Eggan, K., Goldstein, P. A., Anderson, S. A., Studer, L. Directed differentiation and functional maturation of cortical interneurons from human embryonic stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 12, n. 5, p. 559-72, May 2 2013.

Martinez-Cerdeno, V., Noctor, S. C., Espinosa, A., Ariza, J., Parker, P., Orasji, S., Daadi, M. M., Bankiewicz, K., Alvarez-Buylla, A., Kriegstein, A. R. Embryonic MGE precursor cells grafted into adult rat striatum integrate and ameliorate motor symptoms in 6-OHDA-lesioned rats. **Cell Stem Cell**, v. 6, n. 3, p. 238-50, Mar 5 2010.

Masia, S. L., Devinsky, O. Epilepsy and behavior: a brief history. **Epilepsy Behav**, v. 1, n. 1, p. 27-36, Feb 2000.

Mathern, G. W., Babb, T. L., Pretorius, J. K., Leite, J. P. Reactive synaptogenesis and neuron densities for neuropeptide Y, somatostatin, and glutamate decarboxylase immunoreactivity in the epileptogenic human fascia dentata. **J Neurosci**, v. 15, n. 5 Pt 2, p. 3990-4004, May 1995.

Mazzini, L., Mareschi, K., Ferrero, I., Vassallo, E., Oliveri, G., Nasuelli, N., Oggioni, G. D., Testa, L., Fagioli, F. Stem cell treatment in Amyotrophic Lateral Sclerosis. **J Neurol Sci**, v. 265, n. 1-2, p. 78-83, Feb 15 2008.

Mello, L. E., Cavalheiro, E. A., Tan, A. M., Kupfer, W. R., Pretorius, J. K., Babb, T. L., Finch, D. M. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. **Epilepsia**, v. 34, n. 6, p. 985-95, Nov-Dec 1993.

Miller, J. W., Ferrendelli, J. A. Characterization of GABAergic seizure regulation in the midline thalamus. **Neuropharmacology**, v. 29, n. 7, p. 649-55, Jul 1990.

Na, E., McCarthy, M., Neyt, C., Lai, E., Fishell, G. Telencephalic progenitors maintain anteroposterior identities cell autonomously. **Curr Biol**, v. 8, n. 17, p. 987-90, Aug 27 1998.

Naegele, J. R., Maisano, X., Yang, J., Royston, S., Ribeiro, E. Recent advancements in stem cell and gene therapies for neurological disorders and intractable epilepsy. **Neuropharmacology**, v. 58, n. 6, p. 855-64, May 2010.

Nagao, T., Alonso, A., Avoli, M. Epileptiform activity induced by pilocarpine in the rat hippocampal-entorhinal slice preparation. **Neuroscience**, v. 72, n. 2, p. 399-408, May 1996.

Nageshappa, S., Carromeu, C., Trujillo, C. A., Mesci, P., Espuny-Camacho, I., Pasciuto, E., Vanderhaeghen, P., Verfaillie, C. M., Raitano, S., Kumar, A., Carvalho, C. M., Bagni, C., Ramocki, M. B., Araujo, B. H., Torres, L. B., Lupski, J. R., Van Esch, H., Muotri, A. R. Altered neuronal network and rescue in a human MECP2 duplication model. **Mol Psychiatry**, Sep 8 2015.

Niedermeyer, E. Alpha-like rhythmical activity of the temporal lobe. **Clin Electroencephalogr**, v. 21, n. 4, p. 210-24, Oct 1990.

Nieto-Estevez, V., Pignatelli, J., Arauzo-Bravo, M. J., Hurtado-Chong, A., Vicario-Abejon, C. A global transcriptome analysis reveals molecular hallmarks of neural stem cell death, survival, and differentiation in response to partial FGF-2 and EGF deprivation. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e53594, 2013.

Nishimori, M., Yakushiji, H., Mori, M., Miyamoto, T., Yaguchi, T., Ohno, S., Miyake, Y., Sakaguchi, T., Ueda, M., Ohno, E. Tumorigenesis in cells derived from induced pluripotent stem cells. **Hum Cell**, v. 27, n. 1, p. 29-35, Jan 2014.

Nobili, P., Colciaghi, F., Finardi, A., Zambon, S., Locatelli, D., Battaglia, G. S. Continuous neurodegeneration and death pathway activation in neurons and glia in an experimental model of severe chronic epilepsy. **Neurobiol Dis**, v. 83, p. 54-66, Aug 8 2015.

O'Dell, C. M., Das, A., Wallace, G. th, Ray, S. K., Banik, N. L. Understanding the basic mechanisms underlying seizures in mesial temporal lobe epilepsy and possible therapeutic targets: a review. **J Neurosci Res**, v. 90, n. 5, p. 913-24, May 2012.

Oliveira, S. L., Pillat, M. M., Cheffer, A., Lameu, C., Schwindt, T. T., Ulrich, H. Functions of neurotrophins and growth factors in neurogenesis and brain repair. **Cytometry A**, v. 83, n. 1, p. 76-89, Jan 2013.

Ostenfeld, T., Joly, E., Tai, Y. T., Peters, A., Caldwell, M., Jauniaux, E., Svendsen, C. N. Regional specification of rodent and human neurospheres. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 134, n. 1-2, p. 43-55, Mar 31 2002.

Otis, T. S., Trussell, L. O. Inhibition of transmitter release shortens the duration of the excitatory synaptic current at a calyceal synapse. **J Neurophysiol**, v. 76, n. 5, p. 3584-8, Nov 1996.

Palmer, T. D., Markakis, E. A., Willhoite, A. R., Safar, F., Gage, F. H. Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. **J Neurosci**, v. 19, n. 19, p. 8487-97, Oct 1 1999.

Panganiban, G., Rubenstein, J. L. Developmental functions of the Distal-less/Dlx homeobox genes. **Development**, v. 129, n. 19, p. 4371-86, Oct 2002.

Parent, J. M., von dem Bussche, N., Lowenstein, D. H. Prolonged seizures recruit caudal subventricular zone glial progenitors into the injured hippocampus. **Hippocampus**, v. 16, n. 3, p. 321-8, 2006.

Park, K. I., Himes, B. T., Stieg, P. E., Tessler, A., Fischer, I., Snyder, E. Y. Neural stem cells may be uniquely suited for combined gene therapy and cell replacement: Evidence from engraftment of Neurotrophin-3-expressing stem cells in hypoxic-ischemic brain injury. **Exp Neurol**, v. 199, n. 1, p. 179-90, May 2006.

Parmar, M., Skogh, C., Bjorklund, A., Campbell, K. Regional specification of neurosphere cultures derived from subregions of the embryonic telencephalon. **Mol Cell Neurosci**, v. 21, n. 4, p. 645-56, Dec 2002.

Paschaki, M., Lin, S. C., Wong, R. L., Finnell, R. H., Dolle, P., Niederreither, K. Retinoic acid-dependent signaling pathways and lineage events in the developing mouse spinal cord. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e32447, 2012.

Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., Dempfle, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 30, n. 9, p. e36, May 1 2002.

Pitkanen, A. New pharmacotherapy for epilepsy. **IDrugs**, v. 7, n. 5, p. 471-7, May 2004.

Plachta, N., Bibel, M., Tucker, K. L., Barde, Y. A. Developmental potential of defined neural progenitors derived from mouse embryonic stem cells. **Development**, v. 131, n. 21, p. 5449-56, Nov 2004.

Pleasure, S. J., Anderson, S., Hevner, R., Bagri, A., Marin, O., Lowenstein, D. H., Rubenstein, J. L. Cell migration from the ganglionic eminences is required for the development of hippocampal GABAergic interneurons. **Neuron**, v. 28, n. 3, p. 727-40, Dec 2000.

Quinn, S. D., De Boni, U. Enhanced neuronal regeneration by retinoic acid of murine dorsal root ganglia and of fetal murine and human spinal cord in vitro. **In Vitro Cell Dev Biol**, v. 27, n. 1, p. 55-62, Jan 1991.

Racine, R. J., Gartner, J. G., Burnham, W. M. Epileptiform activity and neural plasticity in limbic structures. **Brain Res**, v. 47, n. 1, p. 262-8, Nov 27 1972.

Rajaii, F., Bitzer, Z. T., Xu, Q., Sockanathan, S. Expression of the dominant negative retinoid receptor, RAR403, alters telencephalic progenitor proliferation, survival, and cell fate specification. **Dev Biol**, v. 316, n. 2, p. 371-82, Apr 15 2008.

Rakhade, S. N., Jensen, F. E. Epileptogenesis in the immature brain: emerging mechanisms. **Nat Rev Neurol**, v. 5, n. 7, p. 380-91, Jul 2009.

Rakic, P. Neurogenesis in adult primates. **Prog Brain Res**, v. 138, p. 3-14, 2002.

Revilla, A., Gonzalez, C., Iriondo, A., Fernandez, B., Prieto, C., Marin, C., Liste, I. Current advances in the generation of human iPS cells: implications in cell-based regenerative medicine. **J Tissue Eng Regen Med**, Mar 11 2015.

Reynolds, B. A., Weiss, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. **Science**, v. 255, n. 5052, p. 1707-10, Mar 27 1992.

\_\_\_\_\_. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. **Dev Biol**, v. 175, n. 1, p. 1-13, Apr 10 1996.

Rhinn, M., Dolle, P. Retinoic acid signalling during development. **Development**, v. 139, n. 5, p. 843-58, Mar 2012.

Ribes, V., Wang, Z., Dolle, P., Niederreither, K. Retinaldehyde dehydrogenase 2 (RALDH2)-mediated retinoic acid synthesis regulates early mouse embryonic forebrain development by controlling FGF and sonic hedgehog signaling. **Development**, v. 133, n. 2, p. 351-61, Jan 2006.

Rochette-Egly, C. Retinoic acid signaling and mouse embryonic stem cell differentiation: Cross talk between genomic and non-genomic effects of RA. **Biochim Biophys Acta**, v. 1851, n. 1, p. 66-75, Jan 2015.

Romariz, S. A., Paiva Dde, S., Valente, M. F., Barnabe, G. F., Frussa-Filho, R., Barbosa-Silva, R. C., Calcagnotto, M. E., Longo, B. M. Long-lasting anxiolytic effect of neural precursor cells freshly prepared but not neurosphere-derived cell transplantation in newborn rats. **BMC Neurosci**, v. 15, p. 94, 2014.

Rossignol, E. Genetics and function of neocortical GABAergic interneurons in neurodevelopmental disorders. **Neural Plast**, v. 2011, p. 649325, 2011.

Salami, P., Levesque, M., Gotman, J., Avoli, M. Distinct EEG seizure patterns reflect different seizure generation mechanisms. **J Neurophysiol**, v. 113, n. 7, p. 2840-4, Apr 1 2015.

Santa-Olalla, J., Baizabal, J. M., Fregoso, M., del Carmen Cardenas, M., Covarrubias, L. The in vivo positional identity gene expression code is not preserved in neural stem cells grown in culture. **Eur J Neurosci**, v. 18, n. 5, p. 1073-84, Sep 2003.

Santhakumar, V., Bender, R., Frotscher, M., Ross, S. T., Hollrigel, G. S., Toth, Z., Soltesz, I. Granule cell hyperexcitability in the early post-traumatic rat dentate gyrus: the 'irritable mossy cell' hypothesis. **J Physiol**, v. 524 Pt 1, p. 117-34, Apr 1 2000.

Schwindt, Motta, F. L., Barnabe, G. F., Massant, C. G., Guimaraes Ade, O., Calcagnotto, M. E., Conceicao, F. S., Pesquero, J. B., Rehen, S., Mello, L. E. Short-term withdrawal of mitogens prior to plating increases neuronal differentiation of human neural precursor cells

**PLoS One**

v. 4, n. 2, p. e4642, 2009.

Scorza, F. A., Arida, R. M., Naffah-Mazzacoratti Mda, G., Scerni, D. A., Calderazzo, L., Cavalheiro, E. A. The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? **An Acad Bras Cienc**, v. 81, n. 3, p. 345-65, Sep 2009.

Sharma, A. K., Reams, R. Y., Jordan, W. H., Miller, M. A., Thacker, H. L., Snyder, P. W. Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions. **Toxicol Pathol**, v. 35, n. 7, p. 984-99, Dec 2007.

Shetty, A. K., Hattiangady, B. Restoration of calbindin after fetal hippocampal CA3 cell grafting into the injured hippocampus in a rat model of temporal lobe epilepsy. **Hippocampus**, v. 17, n. 10, p. 943-56, 2007.

Shetty, A. K., Turner, D. A. Glutamic acid decarboxylase-67-positive hippocampal interneurons undergo a permanent reduction in number following kainic acid-induced degeneration of ca3 pyramidal neurons. **Exp Neurol**, v. 169, n. 2, p. 276-97, Jun 2001.

Sibilia, M., Steinbach, J. P., Stingl, L., Aguzzi, A., Wagner, E. F. A strain-independent postnatal neurodegeneration in mice lacking the EGF receptor. **Embo j**, v. 17, n. 3, p. 719-31, Feb 2 1998.

Silva, A., Pereira, J., Oliveira, C. R., Relvas, J. B., Rego, A. C. BDNF and extracellular matrix regulate differentiation of mice neurosphere-derived cells into a GABAergic neuronal phenotype. **J Neurosci Res**, v. 87, n. 9, p. 1986-96, Jul 2009.

Sloviter, R. S. Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. **Science**, v. 235, n. 4784, p. 73-6, Jan 2 1987.

\_\_\_\_\_. Feedforward and feedback inhibition of hippocampal principal cell activity evoked by perforant path stimulation: GABA-mediated mechanisms that regulate excitability in vivo. **Hippocampus**, v. 1, n. 1, p. 31-40, Jan 1991.

\_\_\_\_\_. The neurobiology of temporal lobe epilepsy: too much information, not enough knowledge. **C R Biol**, v. 328, n. 2, p. 143-53, Feb 2005.

Sloviter, R. S., Zappone, C. A., Harvey, B. D., Bumanglag, A. V., Bender, R. A., Frotscher, M. "Dormant basket cell" hypothesis revisited: relative vulnerabilities of dentate gyrus mossy cells and inhibitory interneurons after hippocampal status epilepticus in the rat. **J Comp Neurol**, v. 459, n. 1, p. 44-76, Apr 21 2003.

Smolders, I., Bogaert, L., Ebinger, G., Michotte, Y. Muscarinic modulation of striatal dopamine, glutamate, and GABA release, as measured with in vivo microdialysis. **J Neurochem**, v. 68, n. 5, p. 1942-8, May 1997.

Soprano, D. R., Teets, B. W., Soprano, K. J. Role of retinoic acid in the differentiation of embryonal carcinoma and embryonic stem cells. **Vitam Horm**, v. 75, p. 69-95, 2007.

Soukupova, M., Binaschi, A., Falcicchia, C., Zucchini, S., Roncon, P., Palma, E., Magri, E., Grandi, E., Simonato, M. Impairment of GABA release in the hippocampus at the time of the first spontaneous seizure in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Exp Neurol**, v. 257, p. 39-49, Jul 2014.

Southwell, D. G., Froemke, R. C., Alvarez-Buylla, A., Stryker, M. P., Gandhi, S. P. Cortical plasticity induced by inhibitory neuron transplantation. **Science**, v. 327, n. 5969, p. 1145-8, Feb 26 2010.

Supeno, N. E., Pati, S., Hadi, R. A., Ghani, A. R., Mustafa, Z., Abdullah, J. M., Idris, F. M., Han, X., Jaafar, H. IGF-1 acts as controlling switch for long-term proliferation and maintenance of EGF/FGF-responsive striatal neural stem cells. **Int J Med Sci**, v. 10, n. 5, p. 522-31, 2013.

Sussel, L., Marin, O., Kimura, S., Rubenstein, J. L. Loss of Nkx2.1 homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. **Development**, v. 126, n. 15, p. 3359-70, Aug 1999.

Sypecka, J., Sarnowska, A., Domanska-Janik, K. Crucial role of the local micro-environment in fate decision of neonatal rat NG2 progenitors. **Cell Prolif**, v. 42, n. 5, p. 661-71, Oct 2009.

Takahashi, Palmer, T. D., Gage, F. H. Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures. **J Neurobiol**, v. 38, n. 1, p. 65-81, Jan 1999.

Takahashi, Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663-76, Aug 25 2006.

Tamamaki, N., Tomioka, R. Long-Range GABAergic Connections Distributed throughout the Neocortex and their Possible Function. **Front Neurosci**, v. 4, p. 202, 2010.

Tamamaki, N., Yanagawa, Y., Tomioka, R., Miyazaki, J., Obata, K., Kaneko, T. Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. **J Comp Neurol**, v. 467, n. 1, p. 60-79, Dec 1 2003.

Tauck, D. L., Nadler, J. V. Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. **J Neurosci**, v. 5, n. 4, p. 1016-22, Apr 1985.

Telfeian, A. E., Connors, B. W. Layer-specific pathways for the horizontal propagation of epileptiform discharges in neocortex. **Epilepsia**, v. 39, n. 7, p. 700-8, Jul 1998.

Thom, M. Review: Hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 40, n. 5, p. 520-43, Aug 2014.

Thom, M., Eriksson, S., Martinian, L., Caboclo, L. O., McEvoy, A. W., Duncan, J. S., Sisodiya, S. M. Temporal lobe sclerosis associated with hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: neuropathological features. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 68, n. 8, p. 928-38, Aug 2009.

Thompson, K. Transplantation of GABA-producing cells for seizure control in models of temporal lobe epilepsy. **Neurotherapeutics**, v. 6, n. 2, p. 284-94, Apr 2009.

Threadgill, D. W., Dlugosz, A. A., Hansen, L. A., Tennenbaum, T., Lichti, U., Yee, D., LaMantia, C., Mourton, T., Herrup, K., Harris, R. C., et al. Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. **Science**, v. 269, n. 5221, p. 230-4, Jul 14 1995.

Toresson, H., Potter, S. S., Campbell, K. Genetic control of dorsal-ventral identity in the telencephalon: opposing roles for Pax6 and Gsh2. **Development**, v. 127, n. 20, p. 4361-71, Oct 2000.

Torres, E. M., Dowd, E., Dunnett, S. B. Recovery of functional deficits following early donor age ventral mesencephalic grafts in a rat model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 154, n. 2, p. 631-40, Jun 23 2008.

Toth, K., Eross, L., Vajda, J., Halasz, P., Freund, T. F., Magloczky, Z. Loss and reorganization of calretinin-containing interneurons in the epileptic human hippocampus. **Brain**, v. 133, n. 9, p. 2763-77, Sep 2010.

Tropepe, V., Sibilian, M., Ciruna, B. G., Rossant, J., Wagner, E. F., van der Kooy, D. Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. **Dev Biol**, v. 208, n. 1, p. 166-88, Apr 1 1999.

Tucker, E. S., Segall, S., Gopalakrishna, D., Wu, Y., Vernon, M., Polleux, F., Lamantia, A. S. Molecular specification and patterning of progenitor cells in the lateral and medial ganglionic eminences. **J Neurosci**, v. 28, n. 38, p. 9504-18, Sep 17 2008.

Tureyen, K., Vemuganti, R., Bowen, K. K., Sailor, K. A., Dempsey, R. J. EGF and FGF-2 infusion increases post-ischemic neural progenitor cell proliferation in the adult rat brain. **Neurosurgery**, v. 57, n. 6, p. 1254-63; discussion 54-63, Dec 2005.

Turski. Pilocarpine-induced seizures in rodents--17 years on. **Pol J Pharmacol**, v. 52, n. 1, p. 63-5, Jan-Feb 2000.

Turski, Cavalheiro, E. A., Schwarz, M., Czuczwar, S. J., Kleinrok, Z., Turski, L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behav Brain Res**, v. 9, n. 3, p. 315-35, Sep 1983.

Turski, Ikonomidou, C., Turski, W. A., Bortolotto, Z. A., Cavalheiro, E. A. Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. **Synapse**, v. 3, n. 2, p. 154-71, 1989.

Tyson, J. A., Anderson, S. A. GABAergic interneuron transplants to study development and treat disease. **Trends Neurosci**, v. 37, n. 3, p. 169-77, Mar 2014.

Vaccarino, F. M., Ganat, Y., Zhang, Y., Zheng, W. Stem cells in neurodevelopment and plasticity. **Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 6, p. 805-15, Dec 2001.

Valente, M. F., Romariz, S., Calcagnotto, M. E., Ruiz, L., Mello, L. E., Frussa-Filho, R., Longo, B. M. Postnatal transplantation of interneuronal precursor cells decreases anxiety-like behavior in adult mice. **Cell Transplant**, v. 22, n. 7, p. 1237-47, 2013.

Vallier, L., Alexander, M., Pedersen, R. A. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. **J Cell Sci**, v. 118, n. Pt 19, p. 4495-509, Oct 1 2005.

van Praag, H., Christie, B. R., Sejnowski, T. J., Gage, F. H. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 23, p. 13427-31, Nov 9 1999.

Ventura-Mejia, C., Medina-Ceja, L. Decreased fast ripples in the hippocampus of rats with spontaneous recurrent seizures treated with carbenoxolone and quinine. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 282490, 2014.

Wagers, A. J., Weissman, I. L. Plasticity of adult stem cells. **Cell**, v. 116, n. 5, p. 639-48, Mar 5 2004.

Waldau, B., Hattiangady, B., Kuruba, R., Shetty, A. K. 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**, v. 28, n. 7, p. 1153-64, Jul 2010.

Webber, D. J., Compston, A., Chandran, S. Minimally manipulated oligodendrocyte precursor cells retain exclusive commitment to the oligodendrocyte lineage following transplantation into intact and injured hippocampus. **Eur J Neurosci**, v. 26, n. 7, p. 1791-800, Oct 2007.

Wichterle, H., Garcia-Verdugo, J. M., Herrera, D. G., Alvarez-Buylla, A. Young neurons from medial ganglionic eminence disperse in adult and embryonic brain. **Nat Neurosci**, v. 2, n. 5, p. 461-6, May 1999.

Wichterle, H., Turnbull, D. H., Nery, S., Fishell, G., Alvarez-Buylla, A. In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. **Development**, v. 128, n. 19, p. 3759-71, Oct 2001.

Wieser, H. G. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. **Epilepsia**, v. 45, n. 6, p. 695-714, Jun 2004.

Wohl, C. A., Weiss, S. Retinoic acid enhances neuronal proliferation and astroglial differentiation in cultures of CNS stem cell-derived precursors. **J Neurobiol**, v. 37, n. 2, p. 281-90, Nov 5 1998.

Wonders, C. P., Anderson, S. A. The origin and specification of cortical interneurons. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 9, p. 687-96, Sep 2006.

Wuarin, L., Sidell, N. Differential susceptibilities of spinal cord neurons to retinoic acid-induced survival and differentiation. **Dev Biol**, v. 144, n. 2, p. 429-35, Apr 1991.

Xu, Cobos, I., De La Cruz, E., Rubenstein, J. L., Anderson, S. A. Origins of cortical interneuron subtypes. **J Neurosci**, v. 24, n. 11, p. 2612-22, Mar 17 2004.

Xu, Tam, M., Anderson, S. A. Fate mapping Nkx2.1-lineage cells in the mouse telencephalon. **J Comp Neurol**, v. 506, n. 1, p. 16-29, Jan 1 2008.

Xu, Wang, H., Liang, T., Cai, X., Rao, X., Huang, Z., Sheng, G. Retinoic acid promotes neural conversion of mouse embryonic stem cells in adherent monoculture. **Mol Biol Rep**, v. 39, n. 2, p. 789-95, Feb 2012.

Xu, Wonders, C. P., Anderson, S. A. Sonic hedgehog maintains the identity of cortical interneuron progenitors in the ventral telencephalon. **Development**, v. 132, n. 22, p. 4987-98, Nov 2005.

Zhu, Armstrong, D. L., Hamilton, W. J., Grossman, R. G. Disproportionate loss of CA4 parvalbumin-immunoreactive interneurons in patients with Ammon's horn sclerosis. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 56, n. 9, p. 988-98, Sep 1997.

Zhu, Ma, J., Yu, Li, Yuan, Cg. Grafted neural stem cells migrate to substantia nigra and improve behavior in Parkinsonian rats. **Neurosci Lett**, v. 462, n. 3, p. 213-8, Oct 25 2009.

Zipancic, I., Calcagnotto, M. E., Piquer-Gil, M., Mello, L. E., Alvarez-Dolado, M. Transplant of GABAergic precursors restores hippocampal inhibitory function in a mouse model of seizure susceptibility. **Cell Transplant**, v. 19, n. 5, p. 549-64, 2010.

## 8. Anexos



Universidade Federal de São Paulo

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

São Paulo, 20 de Janeiro de 2012  
**CEP 0024/12**

### Comprovante de recebimento do projeto no CEP/UNIFESP

**Pesquisador(a):** Simone Amaro Alves Romariz  
**Disciplina/Departamento:** Neurologia Experimental

**Projeto de pesquisa intitulado:** "Caracterização in vitro de precursores neuronais da eminência gangliônica medial e avaliação in vivo do seu potencial anticonvulsivo após transplante em animais epiléticos."

**Recebido em:** 20/01/2012

O Comitê de Ética terá o prazo máximo de 30 dias para emissão do parecer. Estamos à disposição para maiores esclarecimentos no endereço: Rua Botucatu, 572 - 1º andar - conj. 14 - Tel: 5571-1062 ou 5539-7162 das 9:00 as 12:00hs.

Atenciosamente,

  
Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo / Hospital São Paulo

IDnet = 185814

Rua Botucatu, 572 - 1º andar - conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil  
Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162>

**MEDIAL GANGLIONIC EMINENCE CELLS FRESHLY OBTAINED  
OR EXPANDED AS NEUROSPHERES SHOW DISTINCT  
CELLULAR AND MOLECULAR PROPERTIES IN REDUCING  
EPILEPTIC SEIZURES**

Journal:	<i>CNS Neuroscience &amp; Therapeutics</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Romariz, Simone; Universidade Federal de Sao Paulo, Fisiologia Paiva, Daisyléa; Universidade Federal de Sao Paulo, Fisiologia Galindo, Layla; Universidade Federal de Sao Paulo, Departamento de Bioquímica Barnabé, Gabriela; Instituto Sirio-Libanês de Ensino e Pesquisa, Ludwig Institute for Cancer Research Guedes, Vivian; University of South Florida College of Medicine, Department of Neurosurgery and Brain Repair Borlongan, Cesar V; University of South Florida College of Medicine, Department of Neurosurgery and Brain Repair Longo, Beatriz; Universidade Federal de Sao Paulo, Fisiologia
Keywords:	epilepsy, interneuronal progenitors, medial ganglionic eminence, neurospheres, transplantation
Scope of Manuscript:	Epilepsy, GABA, Neural stem cells, Hippocampus