



RENORBIO

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Células-tronco neurais em modelos de epilepsia no rato
Wistar: ensaio pré-clínico**

Mirna Luciano de Gois da Silva

Teresina - PI

2016

Mirna Luciano de Gois da Silva

**Células-tronco neurais em modelos de epilepsia no rato
Wistar: ensaio pré-clínico**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - RENORBIO, Ponto Focal Universidade Federal do Piauí, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

Orientadora: Profa Dra. Maria Acelina M. de Carvalho

Coorientador: Prof. Dr. Rivelilson M. de Freitas (*In Memoriam*)

Teresina - PI

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processamento Técnico

S586a Silva, Luciano de Gois da.
Células-tronco neurais em modelos de epilepsia no rato *Wistar*:
ensaio pré-clínico, 2016.
109 f.

Tese (Doutorado em Biotecnologia - RENORBIO) –
Universidade Federal do Piauí, 2016.
“Orientadora Prof^a Dr^a. Maria Acelina M. de Carvalho.”

1. Farmacologia. 2. Neuroesferas. 3. Sistema Nervoso
Central. 4. Terapia Celular. I. Freitas, Rivelilson M. de. II. Título.

CDD 615.1

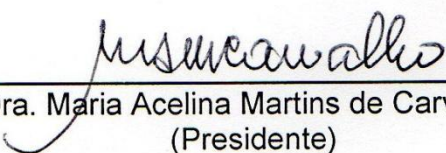
**Células-tronco neurais em modelos de epilepsia no rato
Wistar: ensaio pré-clínico**

Tese de doutorado elaborada e defendida por:

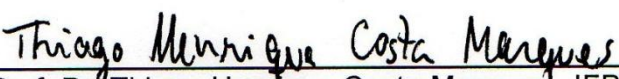
Mirna Luciano de Gois da Silva

Aprovado em: 27/05/2016

Banca Examinadora:




Profa. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho – UFPI
(Presidente)




Prof. Dr. Thiago Henrique Costa Marques - IFPI
(Examinador)



Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira - UFPI
(Examinador)



Prof. Dr. Matheus Levi Tajra Feitosa – UFPI
(Examinador)



Profa. Dra. Márcia dos Santos Rizzo - UFPI
(Examinadora)

Dedico

À Deus, por sempre guiar meus passos, me iluminar, abençoar e me dar forças para alcançar mais este objetivo.

Aos meus pais, Natannael Luciano da Silva e Maria José de Gois Melo da Silva, que sempre me guiam pelos melhores caminhos e incentivam a prosseguir nos estudos e tornar-me uma pessoa cada vez melhor tanto de conhecimento como de caráter. Obrigada pelo imenso carinho, atenção e enorme amor.

À minha irmã, Maiara Luciano de Gois da Silva, fiel escudeira, que não mede esforços em me ajudar nem que seja com um simples sorriso ou com atividades que melhorem meu condicionando físico e emocional.

Ao meu eterno pai científico Rivelilson Mendes de Freitas, o meu grande incentivador em prosseguir os estudos após o mestrado com o doutorado, mesmo sendo uma linha de pesquisa diferente. Mas como ele mesmo dizia: “Eu sei que você consegue”.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, que permitiu que todo esse momento se tornasse realidade, guiando meus passos, fazendo com que eu ultrapassasse obstáculos e proporcionasse meu crescimento pessoal e profissional. Ainda há muito por vir, mas quem o tem ao seu lado, tudo se torna pequeno a enfrentar.

Aos meus pais **Natanael e Maria José**, à minha irmã **Maiara** e aos meus familiares, em especial a vovó **Durvalina** (in memoriam) e **Francisca** (in memoriam), grandes fãs, ajudantes e incentivadores dessa e de todas as jornadas da minha vida. “Família não troco por nada; são partes de mim; são pedaços do meu coração”.

Ao **Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Rede Nordeste de Biotecnologia, Ponto Focal: Universidade Federal do Piauí (RENORBIO – UFPI)** pela minha formação acadêmica através de seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a concretização de mais essa etapa com mérito e ética proposta por esta instituição, e à **Fundação de Amparo a Pesquisa do Piauí (FAPEPI)** e **CAPES** pelo auxílio bolsa de estudo durante essa pesquisa.

À minha orientadora **Profa. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho** por me proporcionar o conhecimento não apenas científico, mas também a manifestação do amor e dedicação à profissão de professora e pesquisadora preocupada com o desenvolvimento e formação profissional de seus alunos. “Um professor é a personificada consciência do aluno; confirma-o nas suas dúvidas; explica-lhes o motivo de sua insatisfação e lhe estimula a vontade de melhorar” (Thomas Mann).

Ao meu coorientador **Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas** (in memoriam) com o qual tive o prazer de desenvolver trabalhos científicos desde o mestrado, fazendo-me prosseguir no doutorado com uma nova linha de pesquisa do LAPNEX, um verdadeiro desafio. Mas isso só foi possível porque um Líder de visão é capaz de incetivar, traçar metas, alcançar objetivos e acreditar na possibilidade de sua equipe tornar-se vencedora. Muito obrigada pela confiança sempre depositada em minha pessoa.

À **Monica Felts de La Roca Soares** e **José Lamartine Soares Sobrinho** pelo carinho, amizade e pela orientação desde o mestrado que culminou no prosseguimento dos estudos no doutorado. A participação de vocês foi fundamental para que eu pudesse ascender ao doutorado.

Ao **Matheus Levi Tajra Feitosa** pela brilhante orientação em me repassar as técnicas de isolamento, cultivo, expansão, caracterização e aplicação terapêutica das células tronco.

Aos **companheiros de laboratório NUPCelt**, em especial **Dayseanny de Oliveira** (amiga pessoal e de grande auxílio científico), **Andressa Santana** e **Clautina Ribeiro**; e aos **companheiros de LAPNEX**, em especial **Ana Paula dos Santos**, **José Carlos Correia Lima**, **Immaculée Kabangie**, **Amanda Almeida**, **Rusbene Bruno**, **Oskar Almeida**, **Guilherme** e **George Laylson** pelo auxílio logístico e descontração pós-trabalhos. Feliz de mim que tive a oportunidade de participar de dois grandes grupos de pesquisa na UFPI e conviver com diferentes tipos de pessoas, mas todas com espírito de cooperação e solidariedade.

Às **peessoas de apoio do NUPCelt**, em especial **Nilcely Guimarães**, **Fabiana**, **Amanda** e **Hermínio**; e aos do LAPNEX, em especial o seu **Orlando**, seu **Francisco** e seu **Ari** pela ajuda logística.

Ao **Laboratório de Imonogenética e Biologia Molecular (LIB) – UFPI**, em especial ao **Prof. Dr. Adalberto**, **Ester Miranda** e **Raimundo**, pelos registros fotográficos da imunofluência celular e análises por Citometria de Fluxo. E ao **Laboratório de Histotécnica – Departamento de morfologia – UFPI**, em especial a **Profa. Dra. Márcia Rizzo** e **Michelle** pelas análises histopatológicas e registros fotográficos.

Às **amigas Ana Carolina Soares**, **Ana Luísa Silva**, **Monique Xavier**, **Natalia Andrade** e **Liviane Martins**, que juntamente com minha irmã **Maiara** formamos um grupo que sempre se ajudou com discussões científicas sobre as nossas áreas acadêmica e correlatadas, e principalmente pelo preparo físico e mental por meio de

nosso lazer com caminhada, patins, filmes e viagens que renovavam as energias para prosseguir nessa jornada.

*Às amigas no Colégio Sagrado Coração de Jesus, **Sabrina Fontinele**, **Keilla Viviani** e **Ana Lúcia Chaves** pelas palavras de incentivo e confiança, pelo ombro amigo e na ajuda de troca de horários para que fosse possível conciliar trabalho e doutorado.*

*Ao **Colégio Sagrado Coração de Jesus**, em especial às **Irmãs** e à coordenadora **Patrícia Pádua**, pelo carinho e compreensão nos momentos que tive que me ausentar do trabalho em prol das atividades do doutorado.*

*Ao **Instituto Federal do Piauí – Campus Teresina Zona Sul**, em especial aos alunos e companheiros de trabalho, pelo carinho e momentos de intenso aprendizado acadêmico e pessoal.*

*Aos **colegas de doutorado**, que sendo composta por profissionais das mais diversas áreas do conhecimento fizeram com que, nas disciplinas que cursamos, a aprendizagem se tornasse significativa por meio de visões diferenciadas sobre um determinado assunto.*

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Os sonhos são como uma bússola, indicando os caminhos
que seguiremos e as metas que queremos alcançar.
São eles que nos impulsionam, nos fortalecem e nos permitem
crescer.”*

Augusto Cury

DA SILVA, Mirna Luciano de Gois. **Células-tronco neurais em modelos de epilepsia no rato *Wistar*: ensaio pré-clínico**. 2016. 109p. Tese (Pós-graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO), Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina.

RESUMO

A epilepsia é um conjunto de distúrbios neurológicos resultantes de um elevado número de funções cerebrais desordenadas que desenvolvem alterações neuronais. Nos últimos anos as células-tronco têm sido alvo de pesquisas com a análise do potencial terapêutico para diversos processos patológicos. A ausência de um tratamento farmacológico apropriado para a epilepsia incentiva o estudo da utilização das células-tronco neurais na reparação das lesões neurais por essa doença. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial terapêutico das células-tronco neurais, provenientes da região subventricular do cérebro de ratos, na reparação de lesão tecidual em ratos *Wistar* epiléticos. Uma prospecção científica e tecnológica foi realizada nas bases de dados INPI, *Latipat*, *Spacenet* e *Science Direct* sobre a temática. O isolamento e cultivo de células-troncos neurais para a obtenção das neuroesferas foram realizados para teste de viabilidade por azul de tripan, identificação celular por Qtracker® 655 Cell Labeling Kit e marcação por proteína glial fibrilar ácida e Nestin, além da avaliação do estresse oxidativo por meio das atividades glutatona reduzida, superóxido dismutase e catalase. Utilizou-se 24 ratos para a indução da epilepsia por pilocarpina, pentilenotetrazol e picrotoxina, dos quais 12 receberam a infusão de neuroesferas. Os encéfalos foram submetidos à análise do estresse oxidativo e histopatológica. Na prospecção tecnológica foram observados 10043 pedidos de depósito de patente e 64378 artigos científicos publicados, todos não relacionados diretamente as neuroesferas e terapia da epilepsia. Em relação ao isolamento e cultivo de neuroesferas foi observado que a cultura apresentou 95% de células viáveis, com morfologia e características específicas para esse tipo celular, além de não apresentarem estresse oxidativo entre o 7º e 30º dia de cultivo celular. Após 30 dias da infusão celular pela veia da cauda dos ratos, as neuroesferas foram rastreadas nos encéfalos. A dose dos fármacos indutores de epilepsia comprometeu o microambiente cerebral, visto que não foi observado estresse oxidativo na cultura celular a ser infundida, mas as regiões encefálicas com e sem infusão das neuroesferas apresentaram estresse oxidativo. Na análise histopatológica, foi visto processo de gliose, necrose, áreas de desmielinização e hemorragias na região cerebral provocada pela epilepsia, e apesar de persistirem no grupo tratado com neuroesferas, foi verificado que as células se distribuíram por todo o tecido cerebral, diferenciando-se principalmente no grupo epilético por pilocarpina. Portanto, as células-tronco neurais sinalizam potencial promissor na reparação de lesões e uma estratégia para a melhora de danos ocasionados pela epilepsia.

Palavras-Chave: Farmacologia; Neuroesferas; Sistema Nervoso Central; Terapia Celular.

DA SILVA, Mirna Luciano de Gois. **Neural stem cells in models of epilepsy in *Wistar* rat: pre-clinical trial**. 2016. 109p. Thesis (Pós-graduate in Biotechnology, Northeast Biotechnology Network - RENORBIO), Federal University of Piauí (UFPI), Teresina.

ABSTRACT

Epilepsy is a set of neurological disorders resulting from a high number of brain functions disordered developing neuronal changes. Currently, stem cells have been the subject of research with the analysis of the therapeutic potential for various pathological processes. The absence of an appropriate pharmacological treatment for epilepsy encourage the study of the use of neural stem cells in the repair of affected damage by this disease. The aim of this study was to evaluate the therapeutic potential of neural stem cells from the subventricular zone of the brain of rats in tissue injury repair in epileptic rats. A scientific and technological exploration was performed in INPI, *Latipat*, *Spacenet* e *Science Direct* databases about the subject. The isolation and cultivation of neural stem cells to obtain the neurospheres were performed to test feasibility, by Trypan Blue, cell identification Qtracker® 655 Cell Labeling Kit and marked by glial fibrillary acidic protein and Nestin, besides the evaluation of stress by oxidative activities of reduced glutathione, superoxide dismutase and catalase. Twenty four rats were used for epilepsy induced by pilocarpine, pentylenetetrazole and picrotoxin, of which 12 received the infusion of neurospheres marked with Qtracker® for cell tracking. The brains were submitted to analysis of oxidative stress and histopathological. Technological prospecting were observed 10043 patent and 64378 papers published, both not directly related to the neurospheres and epilepsy therapy. In regard to isolation and neural stem cell culture it was observed that the culture showed 95% viable cells with specific morphology and characteristics of this cell type, not presenting oxidative stress between the 7th and 30th days of cell culture. After 30 days of cell infusion by caudal vein of rats, the neurospheres were tracking in the brains. The dose inducing drugs of epilepsy committed the brain microenvironment, since there was no oxidative stress in cell culture, but there was in brain regions with and without infusion of neuroesferas. Histological analysis was seen gliosis process, necrosis, areas of demyelination and hemorrhages in the brain region caused by epilepsy, and despite persists in the group treated with neurospheres, it was found that the cells were distributed throughout the brain tissue, differentiating particularly in the epileptic group by pilocarpine. Therefore, the neural stem cells indicate promising potential for injury repair and a strategy for the improvement of damage caused by epilepsy.

Keywords: Neurospheres; Pharmacology; Central Nervous System; Cellular Therapy.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1.** Mecanismo e natureza das crises epiléticas por meio da ativação dos elementos excitatórios (glutamato, sódio e cálcio) .. 27
- Figura 2.** Efeitos da neurotransmissão colinérgica induzida por pilocarpina 29
- Figura 3.** Isolamento, cultivo e diferenciação de células-tronco neurais em neuroesferas, obtidas a partir da zona subventricular de encéfalo adulto 36

CAPÍTULO I: Utilização de células-tronco neurais como terapia da epilepsia: Uma prospecção tecnológica.

- Figura 1.** Delineamento realizado nos bancos de dados para a prospecção tecnológica em células-tronco neurais e epilepsia ... 56
- Figura 2.** Evolução anual de pedidos de depósitos de patentes referentes ao uso de células-tronco neurais ou neuroesferas em distúrbios neurológicos na base de dados INPI, *Latipat* e *Espacenet* 59
- Figura 3.** Evolução anual da publicação de artigos científicos referentes ao uso de células-tronco neurais ou neuroesferas em distúrbios neurológicos na base de dados *Science Direct* 60

CAPÍTULO II: Avaliação do estresse oxidativo em culturas de células-tronco neurais isoladas da região subventricular de encéfalo de ratos.

- Figura 1.** Protocolo de isolamento das células-tronco neurais (CTN) da região subventricular (RSV) do encéfalo de ratos 69
- Figura 2.** Determinação dos níveis de superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), nitrito, proteína total, glutatona reduzida (GSH) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) de células-tronco neurais em cultivo celular por espectrofotômetro, seguindo protocolos específicos 71

- Figura 3.** Fotomicrofotografias da cultura de CTNP isoladas da região subventricular do encéfalo de ratos *Wistar*. A. Primeiro dia de cultivo celular (células com tamanho e morfologia difusas), 10x. B. Formação de neuroesferas com morfologia esférica, 7 dias de cultivo, 10x. C. Neuroesferas com 15 dias de cultivo, 95% de viabilidade celular, 10x. D. Células em 30 dias de cultivo iniciando desagregação celular e formação de “espículas” (D₁) e diferenciação celular (D₂), 10x 74
- Figura 4.** Fotomicrografias fluorescentes de neuroesferas após 15 dias de cultivo, isolada da zona subventricular de encéfalo de rato. A. Neuroesferas com Qtracker - Dapi, corte parafinado sem coloração, 20x. B. Neuroesferas com Qtracker - sem Dapi, corte parafinado sem coloração, 20x. C. Neuroesferas marcada por GFAP - Dapi, a fresco sobre a lâmina e coberta com lamínula, 40x. D. Neuroesferas marcadas por GFAP - FITC, a fresco sobre a lâmina e coberta com lamínula, 40x. E. Neuroesferas marcadas com Nestin - Dapi, a fresco sobre a lâmina e coberta com lamínula, 40x. F. Neuroesferas marcadas com Nestin – FITC, a fresco sobre lâmina e coberta com lamínula, 40x 75
- Figura 5.** Alterações nos níveis de TBARS e nitrito nas culturas de células-tronco neurais durante o 1^o, 7^o e 30^o dias de cultivo. A. Nitrito. B. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os valores representam a média ± E.P.M da quantificação de Nitrito e TBARS. ^a p<0,05 quando comparado ao 1^o dia de cultura celular; ^b p<0,05 quando comparado ao 7^o dia de cultura celular (ANOVA e *t-Student-Newman-Keuls*). Resultados expressos em nmol de MDA/g de tecido (TBARS) e mM (nitrito) 76
- Figura 6.** Atividade antioxidante em culturas com células-tronco neurais com 1, 7 e 30 dias de cultivo celular. A. Concentração da glutatona reduzida (GSH). B. Atividade da catalase (CAT). C. Atividade de superóxido dismutase (SOD). Os valores representam a média ± E.P.M dos níveis de atividade dos antioxidantes em estudo. ^ap<0,05 quando comparado ao 1^o dia de cultura celular; ^b p<0,05 quando comparado ao 7^o dia de cultura celular (ANOVA e *t-Student-Newman-Keuls*). Os resultados foram expressos em mM (GSH), mM/min/ug de proteína (CAT) e U/mg de proteína (SOD) 77

CAPÍTULO III: Potencial terapêutico das células-tronco neurais em modelos experimentais de epilepsia em ratos Wistar.

- Figura 1.** Fotomicrografias da cultura celular de neuroesferas isoladas da região subventricular do encéfalo de ratos. A. Formação de neuroesferas com morfologia esférica, 7 dias de cultivo, aumento 20x. B. Neuroesferas com 15 dias de cultivo, aumento 20x 91
- Figura 2.** Fotomicrografias do encéfalo de ratos marcadas com Qtracker® 655 em corte parafinado sem coloração, após 30 dias da infusão das neuroesferas 92
- Figura 3.** Níveis de peroxidação lipídica (TBARS) e de íons nitritos (NO_2^-) no hipocampo, corpo estriado e córtex frontal de ratos com estado epiléptico não tratado e tratado com cultura de neuroesferas. Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de animais usados nos experimentos, n=4 por grupo. * $p < 0,05$ versus ABC4 (ANOVA e *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste); ^a $p < 0,05$ versus A1 (ANOVA e *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste). ^b $p < 0,05$ versus B1 (ANOVA e *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste). ^c $p < 0,05$ versus C1 (ANOVA e *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste) 93
- Figura 4.** Atividade antioxidante da GSH (glutathiona reduzida) no hipocampo, corpo estriado e córtex frontal de ratos com estado epiléptico não tratados e tratados com cultura de neuroesferas. Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de animais usados nos experimentos, n=4 por grupo. * $p < 0,05$ versus ABC4 (ANOVA e *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste); ^a $p < 0,05$ versus A1 (ANOVA e *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste). ^b $p < 0,05$ versus B1 (ANOVA e *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste). ^c $p < 0,05$ versus C1 (ANOVA e *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste) 94
- Figura 5.** Atividade antioxidante de SOD (superóxido dismutase) no hipocampo, corpo estriado e córtex frontal de ratos com estado epiléptico não tratados e tratados com cultura de neuroesferas. Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de animais usados nos experimentos, n=4 por grupo. * $p < 0,05$ versus ABC4 (ANOVA e *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste); ^a $p < 0,05$ versus A1 (ANOVA e *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste). ^b $p < 0,05$ versus B1 (ANOVA e *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste). ^c $p < 0,05$ versus C1 (ANOVA e *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste) 95

Figura 6. Atividade antioxidante de catalase no hipocampo, corpo estriado e córtex frontal de ratos com estado epiléptico não tratados e tratados com cultura de neuroesferas. Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de animais usados nos experimentos, n = 4 por grupo. *p<0,05 versus ABC4 (ANOVA e <i>t-Student-Newman-Keuls</i> como <i>post hoc</i> teste)	96
Figura 7. Fotomicrografias de cortes histológicos do encéfalo de ratos após 30 dias da infusão de neuroesferas, coradas com Hematoxilina-Eosina	97
Figura 8. Fotomicrografias de cortes histológicos do encéfalo de ratos após 30 dias da infusão de neuroesferas, coradas com Hematoxilina-Eosina	99

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Classificação das crises epiléticas segundo a International League Against Epilepsy 32

Tabela 2. Fármacos antiepiléticas desenvolvidas para controle das crises epiléticas 34

CAPÍTULO I: Utilização de células-tronco neurais como terapia da epilepsia: Uma prospecção tecnológica.

Tabela 1. Quantificação de pedidos de depósito de patentes e artigos científicos por palavras-chave nos bancos de dados do INPI, *Latipat*, *Espacenet* e *Science Direct* 57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

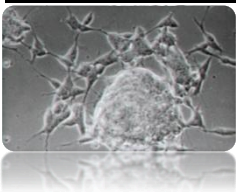
ACh	Acetilcolina
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
CAT	Catalase
CCS	Centro de Ciências da Saúde
Cl⁻	Cloreto
CTN	Células-Tronco Neurais
CTNP	Células-Tronco Neurais Progenitoras
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CuSO₄	Sulfato de Cobre
DAPI	Marcador do núcleo celular
DMEM/F-12	Meio de cultivo celular - Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient mixture F-12 Ham
DND	Doenças Neurodegenerativas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTND	Reagente de Ellman / ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
E.P.M.	Erro Padrão da Média
EPO	European Patente Office
Espacenet	Escritório Europeu de Patentes
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
GABA	Ácido Gama Aminobutírico
GABA_A	Ácido Gama Aminobutírico - receptor A
GEINTEC	Gestão, Inovação e Tecnologia
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GSH	Glutathiona reduzida
HCl	Ácido Clorídrico
HE	Hematoxilina-Eosina
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio

ILAE	International League Against Epilepsy
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Intelectual
i.p	Intraperitoneal
ILAE	International League Against Epilepsy
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Intelectual
LABCelt	Laboratório de Cultivo de Células-tronco
LAPNEX	Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental
Latipat	Patentes da América Latica e Espanha
Na₂CO₃	Carbonato de Sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NaKC₄H₄O₆	Tartarato de Sódio e Potássio
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido Nítrico
NSC	Célula-Tronco Neural
NUPCelt	Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco
PBS	Solução tampão fosfato de sódio
PIL	Pilocarpina
PTZ	Pentilenotetrazol
PTX	Picrotoxina
PVC	Policloreto de Polivinila
RSV	Região Subventricular
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
SOX2	Fator de Transcrição da Família Sox
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1 Epilepsia	25
2.1.1 Fisiopatologia da epilepsia	26
2.1.1.1 Modelo de convulsão por pilocarpina	28
2.1.1.2 Modelo de convulsão por pentilenotetrazol	29
2.1.1.3 Modelo de convulsão por picrotoxina	29
2.1.2 Epilepsia e estresse oxidativo	30
2.1.3 Tipos de crises epiléticas	31
2.1.4 Terapêutica para epilepsia	32
2.2 Células-tronco neurais	35
2.2.1 Neurogênese	37
2.3 Terapia Celular	38
Referências	41
3 CAPÍTULO I: Utilização de células-tronco neurais como terapia da epilepsia: uma prospecção tecnológica	52
Resumo	53
Abstract	54
3.1 Introdução	55
3.2 Material e métodos	56
3.3 Resultados	56
3.4 Discussão	60
3.5 Conclusão	61
Referências	62
4 CAPÍTULO II: Avaliação do estresse oxidativo em culturas de células-tronco neurais isoladas da região subventricular de encéfalo de ratos	64
Resumo	65
Abstract	66
4.1 Introdução	67

4.2 Material e métodos	68
4.2.1 Isolamento e cultivo de células-tronco neurais - CTN	68
4.2.2 Viabilidade, identificação e Marcação celular	70
4.2.3 Determinação do estresse oxidativo	71
4.2.3.1 Determinação dos níveis de peroxidação lipídica e teor de nitrito ...	72
4.2.3.2 Determinação da atividade superóxido dismutase, catalase e glutaciona reduzida	72
4.2.4 Análises estatísticas	73
4.3 Resultados	73
4.3.1 Obtenção e identificação das neuroesferas	73
4.3.2 As neuroesferas e o estresse oxidativo	75
4.4 Discussão	77
4.5 Conclusão	79
Referências	81
5 CAPÍTULO III: Potencial terapêutico das células-tronco neurais em modelos experimentais de epilepsia em ratos <i>Wistar</i>	84
Resumo	85
Abstract	86
5.1 Introdução	87
5.2 Material e métodos	87
5.2.1 Animais e delineamento experimental	87
5.2.2 Isolamento e cultura das células-tronco neurais	88
5.2.3 Rastreamento das células-tronco com Qtracker® 655	89
5.2.4 Infusão das neuroesferas no rato	89
5.2.5 Determinação do estresse oxidativo	90
5.2.6 Avaliação histopatológica	90
5.2.7 Análises estatísticas	90
5.3 Resultados	91
5.4 Discussão	100
5.5 Conclusão	101
Referências	102
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	105
ANEXO	108



INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O século XXI está sendo classificado como o século da convergência tecnológica uma vez que o agrupamento da ciência e da tecnologia fazendo diferença na qualidade de vida da sociedade. Desta forma, abre-se a possibilidade de usar a ciência a favor da saúde humana por meio da cura de doenças e disfunções até então causadoras de grandes males à humanidade: as doenças neurodegenerativas (EMERICK; MONTENEGRO; DEGRAVE, 2007). Estas doenças surgem por disfunção neuronal (PALOP et al., 2006), acúmulo gradual do enovelamento de proteínas e da aceleração da formação de agregados (LANSBURY; LASHUEL, 2006), morte neuronal (BREDESEN et al., 2006) ou da progressão de doenças causadas por células não neuronais (LOBSIGER; CLEVELAND, 2007).

A epilepsia é uma doença neurodegenerativa, caracterizada pela manifestação de crises convulsivas recorrentes e espontâneas que se desenvolvem a partir de alterações neuronais em áreas do sistema nervoso central, principalmente na região do hipocampo (BRUNTON et al., 2006; NIKALJE et al., 2011).

Devido às alterações na excitabilidade neuronal decorrente do processo epiléptico, há a formação excessiva de radicais livres (FLOYD, 1990; WALDBAUM e PATEL, 2010). Em condições normais, o cérebro possui sistemas antioxidantes que reduzem a atuação das substâncias prooxidantes, mas o desequilíbrio nesse mecanismo gera um processo fisiopatológico que pode ocasionar a toxicidade celular e, conseqüentemente, dano ou morte neuronal (HALLIWELL, 2007; GOMES et al., 2011)

Quando os neurônios são perdidos durante a progressão da doença, os medicamentos se tornam menos eficazes (HUNG et al., 2010). A utilização de células-tronco e a mobilização de células-tronco endógenas dentro do cérebro de adultos têm sido propostas como promissoras terapias para as doenças neurodegenerativas (RAMASAMY et al., 2013). Testes em modelos animais têm demonstrado que a substituição neuronal e a reconstrução parcial do circuito neuronal são possíveis. Além disso, há evidências em ensaios clínicos que a substituição celular no cérebro doente pode levar a um alívio sintomático (HITOSHI et al., 2004; LINDVALL et al., 2004; RAMASAMY et al., 2013).

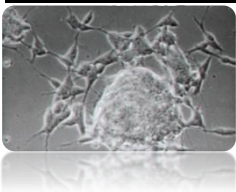
Por conta disso, as células-tronco têm sido alvo de muitas pesquisas e discussões no meio científico, devido a sua elevada plasticidade e ao seu potencial terapêutico para diversos processos patológicos, tanto em espécies domésticas como em silvestres (MONTEIRO et al., 2008; ROCHA et al., 2012; PESSOA et al., 2014; CARVALHO et al., 2015; ARGÔLO NETO et al., 2016). A plasticidade é definida como a capacidade de autorrenovação e diferenciação em diversas linhagens de células e tecidos (MEIRELLES et al., 2006), tendo, portanto, as células-tronco neurais como um dos tipos de células-tronco que ao serem cultivadas e induzidas à diferenciação, formam as neuroesferas. Estes aglomerados celulares podem gerar neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (SAREEN et al., 2009).

Os ensaios clínicos utilizando as células-tronco apresentam graus variados de êxito, sendo de fundamental importância o conhecimento de suas características biológicas, necessárias para isolamento, expansão e diferenciação em células de uma linhagem específica (BERTINE et al., 2009).

Diante disso e da ausência de um tratamento farmacológico apropriado, assim como a suscetibilidade que a epilepsia pode provocar para outras neuropatologias, há o incentivo para a análise do potencial neurogênico das células-tronco neurais e a sua aplicabilidade na reparação dos danos acometidos por essa doença (KWAN et al., 2010). Este estudo tem como objetivo avaliar o potencial terapêutico das células-tronco neurais, provenientes da região subventricular do cérebro de ratos, na reparação de lesão tecidual em ratos epiléticos.

Essa tese se encontra organizada da seguinte forma: Introdução sobre a epilepsia e a utilização das células-tronco como terapia; Revisão de Literatura, caracterizando a epilepsia, quanto a sua fisiopatologia e terapêutica, além de relatar as possibilidades do uso de células-tronco na terapia da epilepsia; Capítulo I - Utilização de células-tronco neurais como terapia da epilepsia: uma prospecção tecnológica, relatando uma busca de anterioridade para análise do uso de células-tronco neurais e neuroesferas na terapia da epilepsia. O capítulo II – Avaliação do estresse oxidativo em culturas de células-tronco neurais isoladas da região subventricular de encéfalo de ratos, referindo-se ao protocolo de isolamento das

células-tronco neurais, à sua identificação por marcação celular com proteína glial fibrilar ácida, e à avaliação do estresse oxidativo em culturas de neuroesferas isoladas da região subventricular do cérebro de ratos *Wistar*, tendo em vista a sua posterior utilização na terapia celular da epilepsia em ratos; O capítulo III – Potencial terapêutico das células-tronco neurais em modelos experimentais de epilepsia em ratos *Wistar*, relatando sobre a potencialidade terapêutica das células-tronco neurais na epilepsia por meio de biomarcadores de estresse oxidativo e análise histopatológica em modelos de epilepsia em ratos *Wistar*. A tese é finalizada com as considerações finais.



REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epilepsia

A epilepsia é um conjunto de distúrbios neurológicos que resultam de um elevado número de funções cerebrais desordenadas, sendo caracterizadas por crises recorrentes e espontâneas que, aparecendo subitamente, constituem episódios intermitentes de atividade elétrica excessiva do cérebro acompanhada dos correspondentes sintomas clínicos (ENGEL e PEDLEY, 1997; GILLIAM et al., 2004; VEZZANI e GRANATA, 2005; FABENE et al., 2008). Tal atividade cerebral pode, eventualmente, interferir no comportamento, na percepção, produzindo uma variedade de manifestações cognitivas, sensoriais e motoras (NOE e MANNO, 2005), além de estabelecer perda de células ou neurodegeneração (VEZZANI e GRANATA, 2005).

A epilepsia é conhecida desde tempos remotos, sendo na Grécia e em Roma vista como um castigo exercido pelos deuses ou espíritos malignos contra a pessoa. Foi somente em meados do século XIX que se iniciou a abordagem científica do fenômeno epiléptico (ENGEL e PEDLEY, 1997). Esse distúrbio neurológico acomete 1% da população do mundo, representando 60 milhões de pessoas. Destes, 50% dos casos de epilepsia começam na infância ou adolescência (THURMAN, 2011).

As causas para a ocorrência das crises convulsivas ainda não estão totalmente elucidadas, mas sabe-se que cicatrizes provocadas por traumatismos cranianos, interrupção do fluxo sanguíneo devido acidente vascular cerebral, tumores ou doenças infecciosas, drogas ou traumatismo de parto podem também desencadear uma descarga excessiva e anormal nas células nervosas, e assim, levar, dependendo do local e severidade da descarga, a uma diversidade de formas clínicas (TÜTÜNCÜOĞLU; SERDAROĞLU; KADIOĞLU, 2002; TRINKA et al., 2015). Os breves movimentos involuntários característicos da epilepsia podem ser por meio de crise parcial afetando apenas uma parte do cérebro ou por crise generalizada ao afetar toda a extensão dos dois hemisférios cerebrais (TRINKA et al., 2015).

2.1.1 Fisiopatologia da epilepsia

As crises convulsivas surgem por ictogênese quando há um rompimento do equilíbrio entre excitação e inibição no cérebro (SCHARFMAN, 2007) ou por epileptogênese ao se transformar em foco gerador de descargas convulsivas devido lesões adquiridas do tecido cerebral que induzem uma reorganização dos circuitos cerebrais (SILVA; CABRAL, 2008). Evidências clínicas recentes demonstram que a inflamação se faz presente na fisiopatologia da epilepsia humana (VEZZANI; FRIEDMAN, 2011; VEZZANI et al., 2011).

O desencadeamento convulsivo acontece por alterações em vários sistemas de neurotransmissores (OLIVEIRA et al., 2001), por alterações despolarizantes nos focos epiléticos pelo receptor pós-sináptico de glutamato do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) e por excitabilidade intrínseca do sistema nervoso que é intimamente controlada pela abertura ou bloqueio de canais iônicos. Estes últimos, na atual hipótese fisiopatológica, explicam os distúrbios que provocam crises convulsivas por meio de alterações na permeabilidade da membrana celular, interferindo no desencadeamento das demais formas convulsivas supracitadas (KWAN; BRODIE, 2000).

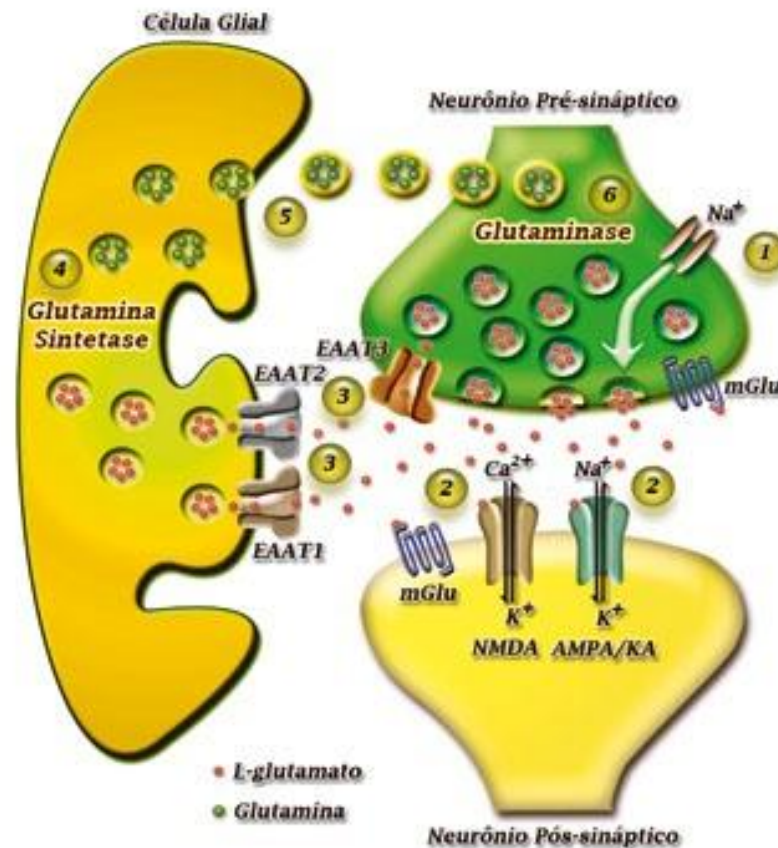
Os canais iônicos interferem na excitabilidade dos neurônios por meio da liberação de neurotransmissores, sendo os canais de Na^+ , K^+ , Ca^{+2} e Cl^- os mais alterados nas crises convulsivas (STEINLEIN, 2004).

Os canais de Na^+ e K^+ estabelecem o controle do potencial da membrana neuronal e são um dos principais responsáveis pela rápida despolarização dessa membrana, presente amplamente e de forma desordenada nos processos epiléticos (KWAN et al., 2001; PISCIOTTA; PRESTIPINO, 2002). Os canais de K^+ , através do mecanismo voltagem-dependente, auxiliam na repolarização da membrana do neurônio despolarizado, que juntamente com os canais de Na^+ , evitam a repetição do potencial de ação. A despolarização é induzida pelo acúmulo extracelular de K^+ (Di NUZZO et al., 2014), e assim, juntamente com os canais de sódio, ativam ou cessam as crises convulsivas (D'ADAMO et al., 2014)

Os canais de Ca^{+2} também são voltagem-dependente, pois dependendo de sua concentração celular pode ativar ou inibir a atividade epilética, e desta forma, tem participação importante nos processos funcionais do sistema nervoso (CATTERALL,

2000; SILVA et al., 2014). A partir do influxo de Ca^{+2} , ocorre o aumento desse íon no meio celular provocando a hiperexcitabilidade no neurônio e, conseqüentemente, as sinapses excitatórias (SILVA; SOUZA; SILVA, 2014). Desta forma, com o desencadeamento das descargas excessivas, súbitas e recorrentes na substância cinzenta, ocorrerá o aumento do neurotransmissor glutamato e dos íons sódio e cálcio, e diminuição do neurotransmissor GABA e dos íons cloreto e potássio, ocasionando as crises convulsivas. O glutamato, diferentemente do GABA, medeia as respostas sinápticas excitatórias rápidas (Figura 1). Esse neurotransmissor possui canais seletivos de cátions, principalmente dependentes de Ca^{+2} (Di NUZZO et al., 2014; RITTER et al., 2004).

Figura 1. Mecanismo e natureza das crises epilépticas por meio da ativação dos elementos excitatórios (glutamato, sódio e cálcio).



Fonte: RITTER e colaboradores (2004)

Legenda: 1 – íons Na^+ induzem a despolarização de membrana e liberação do L-glutamato das vesículas; 2 – o L-glutamato se liga aos receptores e abre canais iônicos; 3 – recaptção do L-glutamato por meio de seus transportadores; 4 – o L-glutamato é degradado em glutamina pela ação da enzima glutamina sintetase; 5 – transporte da glutamina da célula glial para o neurônio; 6 – conversão da glutamina em L-glutamato pela ação da enzima glutaminase.

Em contrapartida, os canais de Cl^- estão associados ao GABA, um dos principais neurotransmissores inibitórios (DU et al., 2005). Esses canais são ativados pelo aumento do volume celular, pela acidificação do pH extracelular e por hiperpolarização da membrana (STALEY, 1994). Desta forma, a concentração de Cl^- na membrana plasmática determina se o GABA despolariza ou hiperpolariza a membrana pós-sináptica (REGESTA; TANGANELLI, 1999). Quando ocorre a crise convulsiva, o GABA se ligará aos receptores, abrindo um canal por onde entrará íon cloreto na célula neuronal, fazendo com que a célula fique hiperpolarizada, dificulte a despolarização e, como consequência, dá-se a diminuição da condução neuronal, que provocará a inibição do SNC (STALEY, 1994).

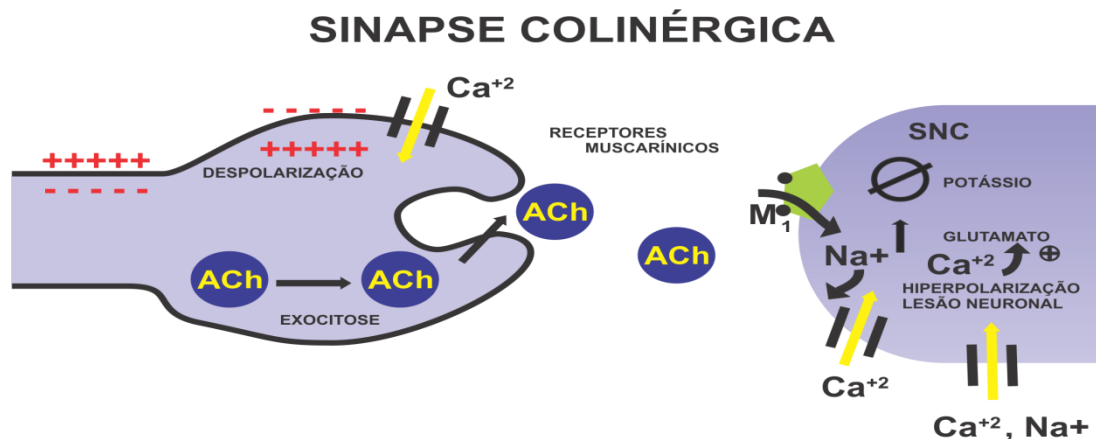
Modelos experimentais de epilepsia, especialmente aplicados em camundongos e ratos, são usados para compreender a fisiopatologia da atividade convulsivante, que se apresenta semelhante à epilepsia de humanos. As análises desses modelos permitem verificar alterações histopatológicas, fatores neuroquímicos e comportamentais relacionados ao estado epiléptico (FREITAS et al., 2006).

2.1.1.1 Modelo de convulsão por pilocarpina

As convulsões induzidas por pilocarpina, um agonista colinérgico muscarínico (CAVALHEIRO, 1995), podem gerar perdas neuronais no hipocampo, corpo estriado, córtex frontal, entre outras áreas cerebrais (FREITAS et al., 2007). Há dois modelos: pilocarpina administrada em doses de 300-400 mg/kg e em doses de 30-60 mg/kg, sendo precedido (16-24 h) por administração de cloreto de lítio (3 mEq/kg) para diminuir os prejuízos periféricos (JOPE; MORRISETT; SNEAD, 1986).

A pilocarpina hiperexcita a síntese e a liberação da acetilcolina (ACh). Desta forma, ela modifica a atividade das enzimas do sistema límbico colinérgico e suas interações com outros neurotransmissores, como, por exemplo, o GABAérgico e o glutamatérgico (FREITAS et al., 2006; EHLERT et al., 1995). A figura 2 demonstra a neurotransmissão colinérgica. Segundo Fernandes (2013), a liberação de ACh ativa o receptor muscarínico M1 e bloqueia as correntes de saída de potássio transmembrana, provocando lesão neuronal devido ao efeito excitotóxico dos receptores de glutamato e influxo de Ca^{+2} .

Figura 2. Efeitos da neurotransmissão colinérgica induzida por pilocarpina.



Fonte: Adaptado de EHLERT e colaboradores (1995)

2.1.1.2 Modelo de convulsão por pentilenotetrazol

O pentilenotetrazol (PTZ) é um antagonista não competitivo do receptor GABA, especificamente do GABA_A. Esta característica deve-se a esse convulsivante não ocupar o local do receptor, mas apenas se ligar no poro do canal que bloqueia o movimento de íons que estão ligados ao GABA_A (SCHENBERG et al., 2001; SMITH et al., 2007).

O mecanismo de ação do PTZ consiste em inibir os canais de cloreto e o efluxo de K^{+} do neurônio que estão associados aos receptores GABA_A (LÖSCHER, 1998). Desta forma, ocorre um desequilíbrio no estado excitação/inibição (glutamato/GABA) provocando hiperexcitação no neurônio e crise epiléptica. O nível dos eventos convulsivos após a infusão do PTZ dependerá da dose administrada no animal (JAIN et al., 2011). Doses baixas de PTZ (20 mg/kg) produzem crises de ausência (SNEAD, 1999) e doses superiores a 50 mg/kg produzem crises do tipo tônico-clônicas generalizadas (ENGEL, 1989).

2.1.1.3 Modelo de convulsão por picrotoxina

A picrotoxina (PTX) atua como antagonista do receptor GABA, sendo um poderoso estimulante do SNC quando utilizado como indutor de convulsões devido o seu antagonismo aos receptores GABAérgicos (ZIA et al., 1995).

Assim como o pentilenotetrazol, a PTX age sobre os canais de cloreto que, ao bloqueá-los, interferem no receptor GABA e, conseqüentemente, no receptor glutamato que age com efeito excitatório neuronal, provocando crises convulsivas, diferindo por apresentar um desenvolvimento sintomatológico mais lento. Vale ressaltar que a picrotoxina não apenas reduz o fluxo de cloreto, mas principalmente atua na frequência no tempo de abertura média do canal (NEWLAND; CULL-CANDY, 1992).

2.1.2 Epilepsia e estresse oxidativo

A elevação das funções cerebrais desordenadas e a atividade elétrica excessiva do cérebro, decorrentes da epilepsia, geram radicais livres que podem causar danos nas macromoléculas celulares, levando, eventualmente, à morte celular (FRANTSEVA et al., 2000; WALZ et al., 2000).

Os radicais livres estão presentes em todos os sistemas biológicos. A produção deles ocorre quando, por exemplo, não há a redução completa do oxigênio. Ao invés disso, o oxigênio é reduzido a radicais superóxidos, hidroxil e peróxido de hidrogênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). Em condições fisiológicas normais, o sistema nervoso possui antioxidantes (glutathiona reduzida, superóxido dismutase e catalase) que atuam na eliminação desses radicais livres. Mas, devido aos seus respectivos níveis baixos, especialmente da catalase, a região cerebral tem dificuldade de eliminar o peróxido de hidrogênio produzido como resultado da epilepsia, e, assim, gera espécies reativas de oxigênio que causam efeitos deletérios no cérebro (SHIVAKUMAR et al., 1991; LIANG et al., 2000; PATEL, 2004).

O cérebro possui um baixo sistema antioxidante, que aliado ao seu alto consumo de oxigênio e elevado teor de ácidos graxos poliinsaturados, a região fica extremamente susceptível a danos oxidativos (BERGAMINI et al., 2004; KHAIROVA et al., 2012).

Durante o desencadeamento da epilepsia ocorre o aumento da peroxidação lipídica, principalmente no hipocampo de ratos, demonstrando que os radicais livres podem estabelecer a neuropatogenia (FREITAS et al., 2004a).

Além disso, Tran e colaboradores (2005) e Berry e colaboradores (2000) demonstraram que as convulsões induzidas também elevam o metabolismo do óxido nítrico, que além de ativarem os receptores glutamatérgicos, estimulando a ação excitatória do sistema nervoso central, também atua no bloqueio dos agregados plaquetários, interferindo no processo inflamatório. Caso não haja a ação dos sistemas antioxidantes, danos neuronais irão ocorrer e interferir no desenvolvimento motor, sensitivo e cognitivo do ser afetado (FREITAS et al., 2004b)

2.1.3 Tipos de crises epilépticas

A epilepsia é classificada de acordo com manifestações clínicas, fisiopatologia e etiologia (SHORVON, 1990). Engel e Pedley (1997) classificaram a epilepsia quanto à etiologia em crises idiopáticas (a causa do distúrbio é devido à predisposição hereditária, tendo boas respostas à terapia com fármacos antiepilépticos); crises sintomáticas (a causa é devido consequências geradas por um transtorno do sistema nervoso central, tendo resistência à terapia); e crises criptogênicas (a causa é oculta e muitas vezes multifatorial). Em 2010, a *Commission on Classification and Terminology da ILAE (International League Against Epilepsy)* substituiu os termos idiopático, sintomático e criptogênico por genética, estrutural ou metabólica e causa desconhecida, respectivamente (BERG et al., 2010).

A *International League Against Epilepsy* elaborou um esquema contendo os tipos de crise conforme a prognose, fisiopatologia e etiologia (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação das crises epiléticas segundo a International League Against Epilepsy

Grupos de crises	Local afetado	Manifestação
Parciais	redes neuronais limitadas a hemisfério do cérebro	<p>Crise parcial simples sem comprometimento da consciência</p> <p>Crise parcial complexa com comprometimento da consciência</p> <p>Crise secundariamente generalizada com comprometimento da consciência e evoluindo para uma crise convulsiva bilateral</p>
Generalizadas	Redes neurais nos dois hemisférios do cérebro	<p>Tônico-clônico contração dos 4 membros com período pós-crítico com confusão mental e sonolência</p> <p>Clônicos mioclonias (contração muscular súbita e involuntária) repetidas</p> <p>Tônicas contração muscular por poucos segundos a minutos</p> <p>Mioclônicas contração muscular súbita</p> <p>Ausência perda ou não de consciência com manifestações motoras</p>
Desconhecido	-	espasmos epiléticos

Fonte: BERG et al. (2010).

2.1.4 Terapêutica para epilepsia

O século XXI tem se destacado na abordagem terapêutica da epilepsia, seja por meios de medicamentos novos ou quimicamente modificados em busca de melhores perfis farmacológicos (BIALER, 2002), seja por meios cirúrgicos (WIEBE; JETTE, 2012) ou ainda pela infusão de células-tronco (BONNAMAIN; NEVEU; NAVEILHAN, 2012).

A farmacoterapia é a estratégia mais utilizada no controle das crises epiléticas ou pelo menos na diminuição da frequência e da severidade da epilepsia (BALDONI et al., 2013). Mas essa terapia fornece apenas o tratamento sintomático e não o controle da progressão da doença (DEVINSKY, 2004). Apesar disso, a não adesão a

essa terapia pode gerar problemas clínicos e econômicos, além do descontrole das crises (HOVINGA et al., 2008).

O maior conhecimento dos mecanismos de ação envolvidos no desencadeamento da epilepsia e o diagnóstico preciso aliado à prática clínica são estratégias que propiciam a escolha terapêutica mais adequada para cada tipo de paciente que apresente esse distúrbio (GLAUSER et al., 2013).

A busca por medicamentos mais eficazes para o tratamento da epilepsia tem sido o desafio de vários pesquisadores. No mercado farmacêutico já existem várias fármacos antiepilépticas (Tabela 2), e outras que ainda estão em processo de desenvolvimento. Para a descoberta de novos fármacos, é necessário o conhecimento dos diferentes mecanismos de ação da atividade epiléptica, levando em consideração a geração de compostos que inibam a ação do neurotransmissor excitatório glutamato (BLOOM, 2010); potenciação da atividade do neurotransmissor inibitório GABA (SHANK et al., 2000); ativação da corrente de potássio hiperpolarizante (MCNAMARA, 2010); e modulação dos canais iônicos que propiciem o potencial de ação nos neurônios (SHANK et al., 2000).

Tabela 2: Fármacos antiepilépticas desenvolvidas para controle das crises epiléticas

Antiepilépticos	Atuação	Mecanismo de ação
Benzodiazepínicos	Modulação do receptor GABA _A (MCNAMARA, 2006)	↑ Frequência de abertura dos canais de íons de cloreto - Hiperpolariza a membrana
Fenobarbital	Inibição da ação do glutamato (MCNAMARA, 2006)	- Bloqueio dos canais de sódio provoca o aumento da ação do GABA através dos receptores GABA _A .
Valproato Sódico	Elevação da ação GABAérgica (COSTA et al., 2012)	- Inibe os canais de sódio e, possivelmente, os canais tipo T de cálcio.
Topiramato	Intensificação da ação GABA por mecanismos desconhecidos; Inibição do subtipo AMPA do receptor de glutamato. (CZUCZOR; PRZESMYCKI, 2001; MCNAMARA, 2006)	- Inibe a condutância de sódio; ↓ da duração das crises espontâneas; ↓ frequência do potencial de ação no neurônio
Felbamato	Potenciação da neurotransmissão GABAérgica; Redução do glutamato (MCNAMARA, 2006)	- Bloqueio dos canais de sódio e cálcio do tipo L dependentes da voltagem.
Gabapentina	Elevação da síntese de GABA (MCNAMARA, 2006)	- Bloqueio das subunidades $\alpha 2\text{-}\delta 1$ do canal de cálcio voltagem-dependente

Como já mencionado, a cirurgia é mais uma alternativa no tratamento da epilepsia, pois se pode dissecar a parte do encéfalo onde está localizada a zona epileptogênica (WIEBE; JETTE, 2012). Mas mesmo realizado essa cirurgia, o paciente ainda necessita ficar em tratamento farmacológico (KWAN; BRODIE, 2000).

Rogawski e Holmes (2009) sugerem que células pluripotentes humanas podem ser uma nova terapêutica não invasiva no tratamento da epilepsia, mas é necessário investigar se essas células podem agir como agente modificador da doença.

Portanto, o tratamento da epilepsia continua a ser um desafio para a ciência, já que a terapêutica clássica não se revelou totalmente satisfatória (BIALER, 2002). 60% dos pacientes com epilepsia conseguem o controle completo de suas crises com fármacos antiepilépticas (BROWN et al., 2009) e desses pacientes, alguns apresentam efeitos colaterais e interações farmacológicas bastante relevantes (McCABE, 2000).

2.2 Células-tronco neurais

As células-tronco estão sendo alvos constantes de investigações para o tratamento de diversas doenças, principalmente as neurodegenerativas (BONNAMAIN; NEVEU; NAVEILHAN, 2012). Isso se deve à capacidade em se diferenciarem e autorreplicarem em múltiplas linhagens celulares, além de regenerarem tecidos. O aprimoramento de métodos para o crescimento e diferenciação dessas células é a propensão internacional de autorização do seu uso nas pesquisas (SANTIN; NUNEZ; MOURA, 2015).

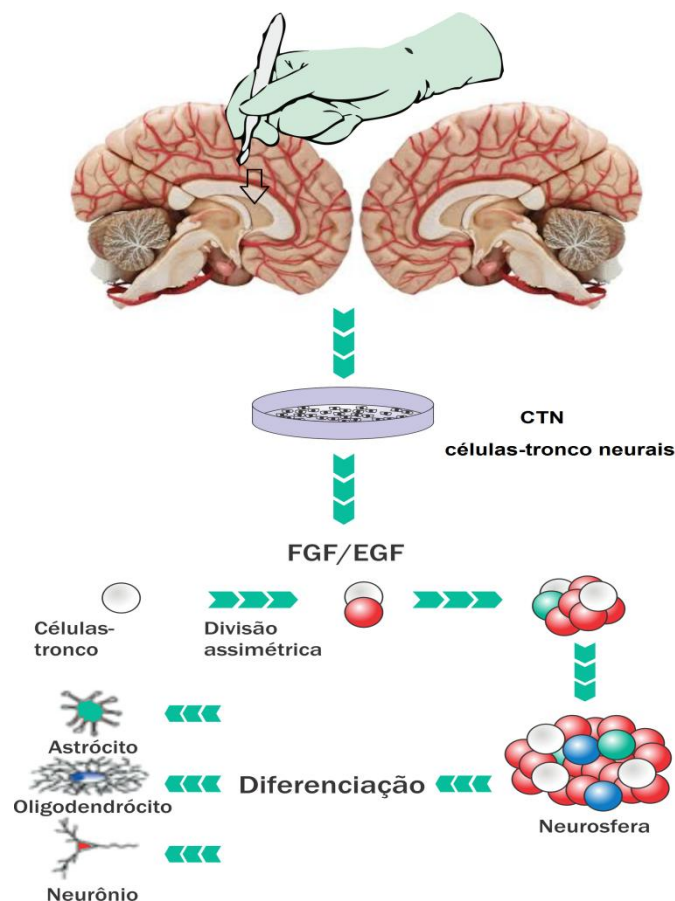
As células-tronco, também denominadas células-mãe ou células estaminais, dividem-se em células embrionárias e em células derivadas de tecidos adultos. Estas últimas linhagens celulares são multipotentes (capazes de gerar tipos celulares que compõem tecidos e órgãos específicos de seu local de origem) e pesquisadas para substituição, reparo ou incremento de tecidos ou órgãos lesados (FUCHS; SEGRE, 2000).

Dentre a linhagem adulta, tem-se as células-tronco neurais (CTN). Este tipo celular é proveniente da neuroectoderme (DELEYROLLE; REYNOLDS, 2009), sendo capaz de se diferenciar em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos, além de integrar circuitos neurais ou substituir neurônios danificados (HOSSINI et al., 2015).

Em procedimentos *in vitro*, as células-tronco neurais formam estruturas esféricas não aderentes, denominadas neuroesferas. Estas células são uma mistura heterogênea de CTN e progenitores específicos (neurônios, astrócitos e oligodendrócitos). Além disso, elas podem se apresentar em diferentes fases mitóticas ou em apoptose, e ainda em interfase ou com processos apoptóticos (LOBO et al., 2003; MARIANO et al., 2015).

Schwindt e colaboradores (2005) e Vescovi e colaboradores (1993) afirmaram que as neuroesferas podem ser dissociadas e subcultivadas, tendo os fatores EGF (fator de crescimento epidérmico) e FGF (fator de crescimento de fibroblastos) como suplementos para o seu desenvolvimento em cultura. Após a retirada desses fatores de crescimento do meio de cultivo, as neuroesferas se diferenciam em neurônio, astrócito e oligodendrócito (Figura 3). A obtenção desse tipo celular é um modelo experimental considerado importante para estudo *in vitro* devido à obtenção celular em grande escala para posterior utilização em terapias celulares (SUN et al., 2011).

Figura 3. Isolamento, cultivo e diferenciação de células-tronco neurais em neuroesferas, obtidas a partir da zona subventricular de encéfalo adulto.



Fonte: Adaptado de Schwindt et al. (2005)

Kuhn e colaboradores (1997) mostraram que o FGF induziu a proliferação e expansão de neuroesferas quando infundido na zona subventricular de cérebro de ratos adultos. Gritti e colaboradores (1999) também demonstraram que, além do

FGF, o EGF também é fator de crescimento de cultura de neuroesferas *ex vivo*, e que ambos expressam semelhanças quanto a dinâmica de proliferação celular das neuroesferas, apesar de terem efeitos diferentes em células-tronco neurais adultas, pois estas, ao serem cultivadas somente com FGF, dividem-se lentamente e, quando cultivados somente com EGF, divide-se mais rapidamente.

Além disso, é necessário, após infusão, acompanhar as neuroesferas e as células-tronco neurais. Isto é possível por marcadores celulares de superfície, de morfologia ou intracelular. Porém, inexitem marcadores que diferenciem as CTN das neuroesferas *in vitro*, e a diferenciação ocorre por meio do comportamento de cada uma na cultura (LOUIS et al., 2008). Dentre os marcadores celulares mais comuns a serem usados nas culturas estão os marcadores intracelulares Nestin (LENDAHL; ZIMMERMAN; MCKAY, 1990), Sox2 (ELLIS et al., 2004) e GFAP (DOETSCH; GARCÍA-VERDUGO; ALVAREZ-BUYLLA, 1999), além dos marcadores de superfície Notch1 (NAGATO et al., 2005) e o de morfologia Hoechst 33342 (KIM; MORSHEAD, 2003).

2.2.1 Neurogênese

A descoberta da neurogênese em regiões específicas do encéfalo adulto, como na zona subventricular e no hipocampo, trouxe novas perspectivas para as pesquisas relacionadas à terapia celular e regeneração do sistema nervoso (VAN et al., 1999).

A neurogênese consiste na formação de novos neurônios por processos complexos que envolvem divisão celular, especificação de destino, diferenciação e integração das células-tronco neurais recém-formadas durante toda a vida do indivíduo (COLUCCI-D'AMATO; BONAVIDA; DI, 2006). Portanto, a formação não ocorre somente no período embrionário dos mamíferos, mas também na idade adulta (ERIKSSON et al., 1998).

O processo de neurogênese ocorre no cérebro, especificamente na zona do giro dentado do hipocampo (HSIEH, 2012) e na zona subventricular (HSIEH, 2012; SPALDING et al., 2013) do ser humano, sendo restrita a essas áreas em ratos (HORNER; GAGE, 2000). A neurogênese no hipocampo não é estática, pois ela reage aos estímulos fisiológicos e patológicos. Esses estímulos podem ser

observados durante um exercício físico ou uma crise epiléptica, em que ambas tem a capacidade de aumentar a neurogênese (KURUBA; HATTIANGADY; SHETTY, 2009).

O estudo desse processo tem se tornado relevante devido a região do hipocampo ser o centro da aprendizagem e da memória, além de locais de disfunção de várias doenças neurodegenerativas (KURUBA; HATTIANGADY; SHETTY, 2009).

2.3 Terapia Celular

A capacidade de proliferação e diferenciação das células-tronco possibilitou que as terapias celulares fossem tema de extensa pesquisa, proporcionando uma estratégia promissora para a cura das doenças neurodegenerativas - DND (LUNN et al., 2011).

As DND representam um desafio para a medicina regenerativa, principalmente porque há poucas opções terapêuticas (LUNN et al., 2011), e estas não permitem a cura, apenas reduzem os sintomas da doença, mas a doença continua a progredir (ENGELHARDT et al., 2005). Considerando o atual processo de envelhecimento populacional, essa realidade tende a se agravar, elevando ainda mais os gastos públicos, que, em alguns países, passam dos bilhões de dólares (LUNN et al., 2011).

O SNC adulto possui capacidade limitada de autorreparação devido a sua pouca produção de elementos celulares importantes para regeneração após uma lesão. É por isso, que a maioria dos tratamentos dessas lesões neuronais apenas aliviam os sintomas e previnem danos correlatados (NAM et al., 2015). No entanto, o conhecimento sobre neurogênese nas regiões subventricular e hipocampo no cérebro abre a possibilidade de reparação desse sistema através da infusão de células-tronco, especificamente, de células-tronco neurais (LÖSCHER et al., 2008)

Devido à reduzida capacidade proliferativa das células-tronco neurais endógenas, faz-se necessário o isolamento e expansão das CTN *in vitro*, para aquisição de quantidade necessária que gere eficácia quando utilizadas em transplantes para reparação de lesões neuronais (NAM et al., 2015). Aggarwal e Harikumar (2009) afirmaram que o transplante desses tipos celulares contorna essa

limitação endógena, pois possuem a capacidade de se diferenciar em células neuronais de todas as linhagens (astrócitos, neurônios e os oligodendrócitos) e promovem a autorrenovação.

Investigações estão sendo feitas sobre o uso dessas células-tronco e seus efeitos positivos no tratamento de pacientes com DND diversas, como alotransplante de células mesencefálicas fetais em Parkinsonianos, que proporcionaram melhora a longo prazo, inclusive com reinervação parcial do núcleo estriado em alguns pacientes (BJÖRKLUND; LINDVALL, 2000; RICHARDSON et al., 2005), além da recuperação funcional em pacientes com Huntington tratados com neuroblastos de fetos humanos derivados do núcleo estriado (BACHOUD-LÉVI et al., 2006). Contudo, ainda há alguns obstáculos a serem transpostos, dentre os quais OLANOW e pesquisadores (2003) e BONNAMAIN e colaboradores (2012) citam disponibilidade tecidual, pureza e viabilidade celular, além dos efeitos colaterais indesejados.

Outro modelo de terapia celular consiste na estimulação da proliferação endógena de células-tronco, na migração e na diferenciação pela infusão de fatores específicos, como a transformação de fator de crescimento (FALLON et al., 2000), ou inclusão de FGF e EGF (NAKATOMI et al., 2002)

Por muito tempo as pesquisas envolvendo terapia com células-tronco neurais centraram-se na doença de Parkinson, acidente vascular cerebral e lesão da medula espinhal. Mas, atualmente, com o conhecimento do processo de desencadeamento da epilepsia, assim como da perda de tipos específicos de neurônios nas crises epiléticas e o modo de substituição seletiva ou a apreensão de geração de danos dessas áreas, fez com que a epilepsia se tornasse um alvo promissor para o uso dessas células na terapia (KWAN; BRODIE, 2000). Ren e Boison (2010) afirmaram que células-tronco mesenquimais já foram isoladas de medula óssea para se verificar o seu efeito neuroprotetor e potencial na epilepsia.

Miller e Bai (2012) afirmaram que há três grandes desafios em transpor para a clínica a terapia com as células-tronco realizada em laboratório. A primeira é se essas células possuem propriedades funcionais semelhantes aos seus homólogos quando testado em roedores, apesar de estudos já terem demonstrado que modelos animais podem ser diretamente aplicáveis às células humanas. Outro desafio é

saber quais as células-tronco mais adequadas com a terapêutica em que se quer aplicá-las, pois as diferentes condições dos locais possuem condições mais adequadas para um tipo de célula do que outros. E o terceiro desafio é a definição dos níveis de heterogeneidade nas populações de células transplantadas.

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, B.B.; HARIKUMAR, K.B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 41, n. 1, p. 40-59, 2009.

ARGÔLO NETO, N.M.; FEITOSA, M.L.T.; SILVA, S.S.; FERNANDES, P.B.; PESSOA, G.T.; BEZERRA, D.O.; ALMEIDA, H.M.; CARVALHO, Y.K.P.; ROCHA, A.R.; SILVA, L.M.C.; CARVALHO, M.A.M. Isolation, Expansion, Differentiation and Growth Kinetics essay in mesenchymal stem cells culture from the bone marrow of collared peccaries (*Tayassu tajacu*). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p. 1-11, 2016.

BACHOUD-LÉVI, A. C.; GAURA, V.; BRUGIÈRES, P.; LEFAUCHEUR, J. P.; BOISSÉ, M. F.; MAISON, P.; BAUDIC, S.; RIBEIRO, M. J.; BOURDET, C.; REMY, P.; CESARO, P.; HANTRAYE, P.; PESCHANSKI, M. Effect of fetal neural transplants in patients with Huntington's disease 6 years after surgery: a long term follow-up study. **The Lancet Neurology**, v. 5, n. 1, p. 303-309, 2006.

BALDONI, A.O.; FREITAS-LIMA, P.; PEREIRA, L.R.L.; ALEXANDRE JUNIOR, V. Epilepsia. In: OBRIELI NETO, P.R.; BALDONI, A.O.; GUIDONI, C.M. (Orgs). **Farmacoterapia: guia terapêutico de doenças mais prevalentes**. São Paulo: Pharmabooks, p. 261-336, 2013.

BERG, A.; BERKOVIC, S.F.; BRODIE, M.J.; BUCHHALTER, J.; CROSS, J.H.; VAN EMDE BOAS, W.; ENGEL, J.; FRENCH, J.; GLAUSER, T.A.; MATHERN, G.W.; MOSHÉ, S.L.; NORDLI, D.; PLOUIN, P.; SCHEFFER, I.E. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. **Epilepsia**, v. 51, n. 4, p. 676-685, 2010.

BERGAMINI, C.M.; GAMBETTI, S.; DONDI, A.; CERVELLATI, C. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, p. 111-112, 2004.

BERRY, C.; HAMILTON, C.A.; BROSNAN, M.J.; MAGILL, F.G.; BERG, G.A.; MCMURRAY, J.J.; DOMINICZAK, A.F. Investigation into the sources of superoxide in human blood vessels: angiotensin II increases superoxide production in human internal mammary arteries. **Circulation**, v. 101, p. 2206-2212, 2000.

BERTINE, M.A.H.; ARAÚJO, F.D. Biologia e uso clínico das células-tronco mesenquimais. **Investigação**, v. 9, n. 2/3, p. 105-110, 2009.

BIALER, M. New antiepileptic drugs currently in clinical trials: is there a strategy in their development? **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 24, n. 1, p.85-90, 2002.

BJÖRKLUND, A.; LINDVALL, O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. **Nature Neuroscience**, v. 3, n. 6, p. 537-544, 2000.

BLOOM, F.E. Neurotransmissão e sistema nervosa central. In: BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. (Orgs). **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman and Gilman**. 11nd ed. Porto Alegre: AMGH, p. 283-303, 2010.

BONNAMAIN, V.; NEVEU, I.; NAVEILHAN, P. Neural stem/progenitor cells as promising candidates for regenerative therapy of the central nervous system. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 6, n. 17, p. 1/8, 2012.

BROWN, I.; SHEERAN, P.; REUBER, M. Enhancing antiepileptic drug adherence: a randomized controlled trial. **Epilepsy and Behavior**, v. 16, n. 4, p. 634-639, 2009.

BREDESEN, D.E.; RAO, R.V.; MEHLEN, P. Cell death in the nervous system. **Nature**, v. 443, n. 7113, p. 796–802, 2006.

BRUNTON, L.; PARKER, K.; BLUMENTHAL, D.; BUXTON, I. (Ed.). **Goodman and Gilman's: manual of pharmacology and therapeutics**. New York: McGraw Hill, 2006.

CARVALHO, Y.K.P.; ARGÔLO NETO, N.M.; AMBROSIO, C.E.; OLIVEIRA, L.J.; ROCHA, A.R.; SILVA, J.B.; CARVALHO, M.A.M.; RIBEIRO, F.A. Isolation, expansion and differentiation of cellular progenitors obtained from dental pulp of agouti (*Dasyprocta prymnolopha* Wagler, 1831) cell progenitor from agouti dental pulp. **Pesquisa Veterinária Brasileira (Impresso)**, v. 35, p. 590-598, 2015.

CATTERALL, W.A. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 16, p. 521-55, 2000.

CAVALHEIRO, E.A.; BELLÍSSIMO, M.I.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G. Profile of prostaglandin levels in the rat hippocampus in pilocarpina model of epilepsy. **Neurochemical**, v. 27, n. 6, p. 461-466, 1995

COLUCCI-D'AMATO, L.; BONAVITA, V.; DI, PU. The end of the central dogma of neurobiology: stem cells and neurogenesis in adult CNS. **Neurological Science**, v. 27, n. 4, p. 266-270, 2006.

COSTA, A.R.; CORRÊA, P.C.; PARTATA, A.K. Epilepsia e os fármacos mais utilizados no seu tratamento. **Revista Científica do ITPAC, Araguaína**, v. 5, n. 3, Pub.4, 2012.

D'ADAMO, M.C.; CATACUZZENO, L.; DI GIOVANNI, G.; FRANCIOLINI, F.; PESSIA, M. K⁺ channelepsy: progress in the neurobiology of potassium channels and epilepsy. **Frontiers in Cellular Neuroscience (online)**, v. 8, n. 9, 2014.

DAL-PIZZOL, F.; KLAMT, F.; VIANNA, M.M.R.; SCHORER, N.; QUEVEDO, J.; BENFATO, M.S.; MOREIRA, J.C.F.; WALZ, R. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in *Wistar* rats. **Neuroscience Letters**, v. 291, p. 179-182, 2000.

DELEYROLLE, L.P.; REYNOLDS, B.A. Isolation, expansion, and differentiation of adult mammalian neural stem and progenitor cells using the neurosphere assay. **Methods in Molecular Biology**, v. 549, p. 91–101, 2009.

DEVINSKY, O. Diagnosis and treatment of temporal lobe epilepsy. **Reviews in Neurological Diseases**, v. 1, n. 1, p. 2/9, 2004.

Di NUZZO, L.; ORLANDO, R.; NASCA, C.; NICOLETTI, F. Molecular pharmacodynamics of new oral drugs used in the treatment of multiple sclerosis. **Journal of Drug Design, Development and Therapy**, v. 8, p. 555-568, 2014.

DOETSCH, F.; GARCÍA-VERDUGO, J.M.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. **Proceedings of the National Academy Science**, v. 97, n. 7, p. 703-716, 1999.

DU, W.; BAUTISTA, J.F.; YANG, H. DIEZ-SAMPEDRO, A. YOU, S.A.; WANG, L.; KOTAGAL, P.; LÜDERS, H.O.; SHI, J.; CUI, J.; RICHERSON, G.B.; WANG, Q.K. Calcium-sensitive potassium channelopathy in human epilepsy and paroxysmal movement disorder. **Nature Genetics**, v. 37, n. 7, p. 733-738, 2005.

EHLERT, F.J.; ROESKE, W.R.; YAMAMURA, H.I. **Molecular biology and brain distribution of subtypes of the muscarinic receptor**. In: BLOOM, F.E.; KUPFER, D.J. *Psychopharmacology*, New York: Raven Press, Ltda., Cap. 10, p. 111-124, 1995.

ELLIS, P.; FAGAN, B.M.; MAGNESS, S.T.; HUTTON, S.; TARANOVA, O.; HAYASHI, S.; MCMAHON, A.; RAO, M. PEVNY, L. SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. **Developmental Neuroscience**, v. 26, n. 2/4, p. 148-165, 2004.

EMERICK, M.C.; MONTENEGRO, K.B.M.; DEGRAVE, W. **Novas tecnologias na genética humana: avanços e impactos para a saúde**. Rio de Janeiro: GESTEC-Nit, 2007. 252p.

ENGEL, J. **Seizures and epilepsy**. Davids Company, U.S.A. v. 3-7, p. 71-84, 1989.

ENGEL, J.; PEDLEY, T.A. Introduction: What Is Epilepsy?. In ENGEL, J.; PEDLEY, T.A., ed. lit. – **Epilepsy: A Comprehensive Textbook**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, v. 1, n. 1, p. 1/7, 1997.

ENGELHARDT, E.; BRUCKI, S. M. T.; CAVALCANTI, J. L. S.; FORLENZA, O. V.; LAKS, J.; VALE, F. A. C. Tratamento da doença de Alzheimer: recomendações e sugestões do Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 63, n. 4, p. 1104-1112, 2005.

ERIKSSON, P.S.; PERFILIEVA, E.; BJÖRK-ERIKSSON, T.; ALBORN, A.M.; NORDBORG, C.; PETERSON, D.A.; GAGE, F.H. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nature Medicine**, v. 4, n. 11, p. 1313-1317, 1998.

FABENE, P.F.; NAVARRO, M.G.; MARTINELLO, M.; ROSSI, B.; MERIGO, F.; OTTOBONI, L.; BACH, S.; ANGIARI, S.; BENATI, D.; CHAKIR, A.; ZANETTI, L.; SCHIO, F.; OSCULATI, A.; MARZOLA, P.; NICOLATO, E.; HOMEISTER, J.W.; XIA, L.; LOWE, J.B.; MCEVER, R.P.; OSCULATI, F.; SBARBATI, A.; BUTCHER, E.C.; CONSTANTIN, G. A role for leukocyte-endothelial adhesion mechanisms in epilepsy. **Nature Medicine**, v. 14, p. 1377–1383, 2008.

FALON, J.; REID, S.; KINYAMU, R.; OPOLE, R.; BARATTA, J.; KORC, M.; ENDO, T.L.; DUONG, A.; NGUYEN, G.; KARKEHABADHI, M.; TWARDZIK, D.; PATEL, S.; LOUGHLIN, S. *In vivo* induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 97, p. 14686-14691, 2000.

FERNANDES, M.J.S. Epilepsia do lobo temporal: mecanismos e perspectivas. **Estudos Avançados**, v. 27, n. 77, p. 85-96, 2013.

FLOYD, R.A. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. **The FASEB Journal**, v. 4, p. 2587-2597, 1990.

FRANTSEVA, M.V.; PEREZ VELAZQUEZ, J.L.; HWANG, P.A.; CARLEN, P.L. Free radical production correlates with cell death in an in vitro model of epilepsy. **European Journal of Neuroscience**, v. 12, p. 1431- 1439, 2000.

FREITAS, R.M.; SOUSA, F.C.F.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA, G.S.B.; FONTELES, M.M.F. Pilocarpine-induced status epilepticus in rats: lipid peroxidation level, nitrite formation, GABAergic and glutamatergic receptor alterations in the hippocampus, striatum and frontal cortex. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 78, p. 327-332, 2004a.

FREITAS, R.M.; NASCIMENTO, V.S.; VASCONCELOS, S.M.M.; SOUSA, F.C.F.; VIANA, G.S.B.; FONTELES, M.M.F. Catalase activity in cerebellum, hippocampus, frontal cortex and striatum after status epilepticus induced by pilocarpine in *Wistar* rats. **Neuroscience Letters**, v. 365, p. 102-105, 2004b.

FREITAS, R.M.; SOUSA, F.C.F.; VIANA, G.S.B.; FONTELES, M.M.F. Acetylcholinesterase activities in hippocampus, frontal cortex and striatum of *Wistar* rats after pilocarpine-induced status epilepticus. **Neuroscience Letters**, v. 399, p. 76-78, 2006.

FREITAS, R.M.; OLIVEIRA, A.A.; VASCONCELOS, S.M.M.; SOUSA, F.C.F.; VIANA, G.S.B.; FONTELES, M.M.F. Pathophysiology of status epilepticus induced by pilocarpine. **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 11-15, 2007.

FUCHS, E.; SEGRE, J.A. Stem cells: a new lease on life. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 143-155, 2000.

GILLIAM F.G., SANTOS, J., VAHLE V., CARTER J., BROWN K., HECIMOVIC, H. Depression in epilepsy: ignoring clinical expression of neuronal network dysfunction. **Epilepsia**, v. 45, S2, p. 26-30, 2004.

GLAUSER, T.; BEN-MENACHEM, E.; BOURGEOIS, B.; CNAAN, A.; GUERREIRO, C.; KÄLVIÄINEN, R.; MATTSON, R.; FRENCH, J.A.; PERUCCA, E.; TOMSON, T.; ILAE SUBCOMMISSION ON AED GUIDELINES. Updated ILAE evidence review of antiepileptic drug efficacy and effectiveness as initial monotherapy for epileptic seizures and syndromes. **Epilepsia**, v. 54, n. 3, p. 551-563, 2013.

GOMES, T.K.C.; OLIVEIRA, S.L.; ATAÍDE, T.R.; TRINDADE FILHO, E.M. The role of the ketogenic diet on oxidative stress present in experimental epilepsy. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 17, p. 54-64, 2011.

GRITTI, P.; FRÖLICHSTHAL-SCHOELLER, R.; GALLI, E.A.; PARATI, L.; COVA, S.F.; PAGANO, C.R.; BJORNSON, A.L.; VESCOVI, J. Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain. **Neuroscience**, v. 19, n. 9, p. 3287–3297, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, USA, 2006, 704p.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, p. 1147-1150, 2007.

HORNER, P.J.; GAGE, F.H. Regenerating the damaged central nervous system. **Nature**, v. 407, n. 6807, p. 963-970, 2000.

HITOSHI, S.; SEABERG, R.M.; KOSCIK, C.; ALEXSON, T.; KUSUNOKI, S.; KANAZAWA, I.; TSUJI, S.; KOOY, D.V. Primitive neural stem cells from the mammalian epiblast differentiate to definitive neural stem cells under the control of Notch signaling. **Genes and Development**, v. 18, n. 15, p. 1806-1811, 2004.

HOSSINI, A.M.; MEGGES, M.; PRIGIONE, A.; LICHTNER, B.; TOLIAT, M.R.; WRUCK, W.; SCHRÖTER, F.; NUERNBERG, P.; KROLL, H.; MAKRANTONAKI, E.; ZOUBOULISS, C.C.; ADJAYE, J. Induced pluripotent stem cell-derived neuronal cells from a sporadic Alzheimer's diseases donor as a model for investigating AD-associated gene regulatory networks. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p.84, 2015.

HOVINGA, C.A; ASATO, M.R.; MANJUNATH. R.; WHELESS, J.W.; PHELPS, S.J.; SHETH, R.D.; PINA-GARZA, J.E.; ZINGARO, W.M.; HASKINS, L.S. Association of non-adherence to antiepileptic drugs and seizures, quality of life, and productivity: survey of patients with epilepsy and physicians. **Epilepsy and Behavior**, v. 13, n. 2, p. 316-322, 2008.

HSIEH, J. Orchestrating transcriptional control of adult neurogenesis. **Genes and Development**, v. 26, p. 1010-1021, 2012.

JAIN, S.; BHARAL, N.; KHURANA, S. Anticonvulsant and antioxidant actions of trimetazidine in pentylenetetrazole-induced kindling model in mice. **Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology**, v. 383, n. 4, p. 385-392, 2011.

JOPE, R.S.; MORRISETT, R.A.; SNEAD III, O.C. Characterization of lithium potentiation of pilocarpine-induced status epilepticus in rats. **Experimental Neurology**, v. 67, p. 471-480, 1986.

KHAIROVA, R.; PAWAR, R.; SALVADORE, G.; JURUENA, M.F.; DE SOUSA, R.T.; SOEIRO-DE-SOUZA, M.G.; SALVADOR, M.; ZARATE, C.A.; GATTAZ, W.F.; MACHADO-VIEIRA, R. Effects of lithium on oxidative stress parameters in healthy subjects. **Molecular Medicine Reports**, v. 5, p. 680-682, 2012.

KIM, M.; MORSHEAD, C.M. Distinct populations of forebrain neural stem and progenitor cells can be isolated using side-population analysis. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 33, p. 10703-10709, 2003.

KUHN, H.G.; WINKLER, J.; KEMPERMANN, G.; THAL, L.J.; GAGE, F.H. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 15, p. 5820-5829, 1997.

KURUBA, R.; HATTIANGADY, B.; SHETTY, A.K. Hippocampal neurogenesis and neural stem cells in temporal lobe epilepsy. **Epilepsy and Behavior**, v. 14, p. 65-73, 2009.

KWAN, P.; BRODIE, M.J. Epilepsy after the first drug fails: substitution or add-on? **Seizures**, v. 9, n. 7, p. 464-468, 2000.

KWAN, P.; SILLS, G.J.; BRODIE, M.J. The mechanisms of action of commonly used antiepileptic drugs. **Pharmacology Therapy**, v. 90, p. 21-34, 2001.

KWAN, P.; ARZIMANOGLU, A.; BERG, A.T.; BRODIE, M.J.; HAUSER, W.A.; 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. 1069-1077, 2010.

LANSBURY, P.T.; LASHUEL, H.A. A century-old debate on protein aggregation and neurodegeneration enters the clinic. **Nature**, v. 443, p. 774-779, 2006.

LEND AHL, U.; ZIMMERMAN, L.B.; MCKAY, R.D. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. **Cell**, v. 60, n. 4, p. 585-595, 1990.

LIANG, L.P.; HO, Y.S.; PANTEL, M. Mitochondrial superoxide production in kainate-induced hippocampal damage. **Neuroscience**, v. 101, p. 563-570, 2000.

LOBO, M.V.T.; ALONSO, F.J.M.; REDONDO, C.; TOLEDANO, M.A.L.; CASO, E.; HERRANZ, A.S.; PAINO, C.L.; REIMERS, D.; BAZAN, E. Cellular characterization of epidermal growth factor-expanded, free-floating neurospheres. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 51, n. 1, p. 89-103, 2003.

LOUIS, S.A.; RIETZE, R.L.; DELEYROLLE, L.; WAGEY, R.E.; THOMAS, T.E.; EAVES, A.C.; REYNOLDS, B.A. Enumeration of neural stem and progenitor cells in the neural colony-forming cell assay. **Stem Cells**, v. 26, n. 4, p. 988-996, 2008.

LÖSCHER W. New visions in the pharmacology of anticonvulsion. **European Journal of Pharmacology**, v. 342, n. 1, p. 1/13, 1998.

LÖSCHER, W.; GERNERT, M.; HEINEMANN, U. Cell and gene therapies in epilepsy-promising avenues or blind alleys? **Trends in Neuroscience**, v. 31, n. 2, p. 62-73, 2008.

LUNN, J. S.; SAKOWSKI, S. A.; HUR, J.; FELDMAN, E. L. Stem cell technology for neurodegenerative diseases. **Annals of Neurology**, v. 70, n. 3, p. 353–361, 2011.

MARIANO, E.D.; TEIXEIRA, M.J.; MARIE, S.K.N.; LEPSKI, G. Adult stem cells in neural repair: Current options, limitations and perspectives. **World Journal of Stem Cells**, v. 7, n. 2, p. 477-482, 2015.

MCCABE, P.H. New anti-epileptic drugs for the 21st century. **Expert Opin Pharmacother**, v. 1, p. 633-674, 2000.

MCNAMARA, J. O. Farmacoterapia das epilepsias. In: BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. (Orgs) **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. The McGraw-Hill Medical Publishing Division, NY, p. 501–525, 2006.

MCNAMARA, J. O. Farmacoterapia das epilepsias. In: BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. (Orgs). **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman and Gilman**. 11nd ed. Porto Alegre: AMGH, p. 447-468, 2010.

MEIRELLES, L.S.; CHAGASTELLES, P.C.; NARDI, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, v. 119, n. 11, p. 2204-2213, 2006.

MILLER, R.H.; BAI, L. Translating stem cell therapies to the clinic. **Neuroscience Letters**, v. 519, n. 2, p. 87-92, 2012.

MONTEIRO, BS.; ARGÔLO-NETO, N.M.; DEL CARLO, R.J. Terapia celular em reparação óssea – aplicação clínica de células-tronco mesenquimais. **Ciência Veterinária nos Trópicos, Recife-PE**, v. 11, supl. 2, p. 95-100, 2008.

NAGATO, M.; HEIKE, T.; KATO, T.; YAMANAKA, Y.; YOSHIMOTO, M.; SHIMAZAKI, T.; OKANO, H.; NAKAHATA, T. Prospective characterization of neural stem cells by flow cytometry analysis using a combination of surface markers. **Journal of Neuroscience Research**, v. 80, n. 4, p. 456-466, 2005.

NAKATOMI, H.; KURIU, T.; OKABE, S.; YAMAMOTO, S.; HATANO, O.; KAWAHARA, N.; TAMURA, A.; KIRINO, T.; NAKAFUKU, M. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. **Cell**, v. 110, n. 4, p. 429-441, 2002.

NAM, H.; LEE, K.H.; NAM, D.H.; JOO, K.M. Adult human neural stem cell therapeutics: Current developmental status and prospect. **World Journal of Stem Cells**, v. 7, n. 1, p. 126-136, 2015.

NEWLAND, C.F.; CULL-CANDY, S.G. On the mechanism of action of picrotoxin on GABA receptor channels in dissociated sympathetic neurones of the rat. **Journal of Physiology**, v. 447, p. 191-213, 1992.

NIKALJE, A.P.G.; GHODKE, M.; GIRBANE, A. GABA modulating agents: A brief review. **Asian Journal Biological Science**, v.4, n.3, p. 201-220, 2011.

NOE, K.H.; MANNO, E.M. Mechanisms underlying status epilepticus. **Drugs Today (Barc)**, v. 41, n. 4, p. 257–266, 2005.

OLANOW, C.W.; GOETZ, C.G.; KORDOWER, J.H.; STOESSL, A.J.; SOSSI, V. BRIN, M.F.; SHANNON, K.M.; NAUERT, G.M.; PERL, D.P.; GODBOLD, J.; FREEMAN, T.B. A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, v. 54, n. 3, p. 403-414, 2003.

OLIVEIRA, F.A.; ALMEIDA, R.N.; SOUSA, M.F.V.; BARBOSA-FILHO, J.M.; DINIZ, A.S.; MEDEIROS, I.A. Anticonvulsant properties of N-salicyloyltryptamine in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 68, n. 2, p. 199-202, 2001.

PALOP, J. J.; CHIN, J.; MUCKE, L. A network dysfunction perspective on neurodegenerative diseases. **Nature**, v. 443, n. 7113, p. 768-773, 2006.

PATEL, M.N. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 37, p. 1951-1962, 2004.

PESSOA, G. T. ; FEITOSA, M. L. T. ; ARGÔLO NETO, N. M. ; ROCHA, A. R. ; COSTA, C.R.M. ; BEZERRA, D. O. ; SILVA, G.C. ; COELHO, C.J.C. ; SILVA, S. S. ; CARVALHO, M. A. M. . Isolation, Culture and Differentiation Potential of Collared Peccary (*Tayassu tajcu*) Adipose-Derived Stem Cells. **Acta Scientiae Veterinariae (UFRGS. Impresso)**, v. 42, p. 1-10, 2014.

PISCIOTTA, M.; PRESTIPINO, G. Anticonvulsant phenytoin affects voltage-gated potassium currents in cerebellar granule cells. **Brain Research**, v. 941, n. 1/2, p. 53-61, 2002.

RAMASAMY, S.; NARAYANAN, G.; SANKARAN, S.; YU, Y.H.; AHMED, S. Neural stem cell survival factors. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 534, n. 1/2, p. 71-87, 2013.

REGESTA, G.; TANGANELLI, P. Clinical aspects and biological bases of drug-resistant epilepsies. **Epilepsy Research**, v. 34, p. 109-122, 1999.

REN, G.; BOISON, D. Engineering human mesenchymal stem cells to release adenosine using miRNA technology. **Methods in Molecular Biology**, v. 650, p. 225-240, 2010.

RICHARDSON, R. M.; BROADDUS, W. C.; HOLLOWAY, K. L.; FILLMORE, H. L. Grafts of adult subependymal zone neuronal progenitor cells rescue hemiparkinsonian behavioral decline. **Brain Research**, v. 1032, n. 1, p. 11-22, 2005.

RITTER, J.M.; MOORE, P.K.; DALE, M.M.; RANG, H.P. **Farmacologia**. Tradução da 5ª edição. Editora Elsevier, 2004, 904p.

ROCHA, A.R.; ALVES, F.R.; ARGÔLO NETO, N.M.; DOS SANTOS, L.F.; DE ALMEIDA, H.M.; DE CARVALHO, Y.K.; BEZERRA, D.D.E.O.; FERRAZ, M.S.; PESSOA, G.T.; DE CARVALHO, M.A. Hematopoietic progenitor constituents and adherent cell progenitor morphology isolated from black-rumped agouti (*Dasyprocta rymnolopha*, Wagler 1831) Bone Marrow. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 10, p. 1376-1382, 2012.

ROGAWSKI, M.A.; HOLMES, G.L. Nontraditional epilepsy treatment approaches. **Neurotherapeutics**, v. 6, n. 2, p. 213-217, 2009.

SANTIN, D.M.; NUNEZ, Z.A.G.; MOURA, A.M.M. Brazilian scientific output in stem cells from 2000 till 2013: features and international collaboration. **Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde**, v. 9, n. 2, 2015.

SAREEN, D.; MCMILLAN, E.; EBERT, A.D.; SHELLEY, B.C.; JOHNSON, J.A.; MEISNER, L.F.; SVENDSEN, C.N. Chromosome 7 and 19 trisomy in cultured human neural progenitor cells. **PLoS One**, v. 4, n. 10, e7630, 2009.

SCHARFMAN, H.E. The neurobiology of epilepsy. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 7, n. 4, p. 348-354, 2007.

SCHENBERG, L.C.; BITTENCOURT, A.S.; SUDRÉ, E.C.; VARGAS, L.C. Modeling panic attacks. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 7/8, p. 647-59, 2001.

SHANK, R.P.; GARDOCKI, J.F.; STREETER, A.J.; MARYANOFF, B.E. An overview of the preclinical aspects of topiramate: pharmacology, pharmacokinetics and mechanism of action. **Epilepsia**, v. 41, Suppl 1, p. S3-S9, 2000.

SHIVAKUMAR, B.R.; ANANNDATHEERTHAVARADA, H.K.; RAVINDRANATH, V. Free radical scavenging system in developing rat brain. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 9, p. 181-185, 1991.

SCHWINDT, T.T.; BARNABÉ, G.F.; MELLO, L.E.A.M. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 16, n. 1, p. 13-19, 2005.

SHORVON, S.D. Octeto de la Epilepsia: Epidemiología, clasificación, evolución natural y genética de la epilepsia. **Lancet (Ed. Esp.)**, v. 17, n. 6, p. 334-338, 1990.

SILVA, A.V.; CABRAL, F.R. Ictogênese, epileptogênese e mecanismo de ação das drogas na profilaxia e tratamento da epilepsia. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 14, Suppl 2, p. 39-45, 2008.

SILVA, A.S.; SOUZA, I.L.L.; SILVA, B.A. Canais iônicos na epilepsia. **Medicina**, v. 47, n. 4, p. 370-376, 2014.

SMITH, M.; WILCOX, K.S.; WHITE, H.S. Discovery of antiepileptic drugs. **Neurotherapeutics**, v. 4, n. 1, p. 12-17, 2007.

SNEAD, O. Absence epilepsy: advances in experimental animal model. **Advances in Neurology**, v. 79, p. 253-278, 1999.

SPALDING, K.L.; BERGMANN, O.; ALKASS, K.; BERNARD, S.; SALEHPOUR, M.; HUTTNER, H.B.; BOSTRÖM, E.; WESTERLUND, I.; VIAL, C.; BUCHHOLZ, B.A.; POSSNERT, G.; MASH, D.C.; DRUID, H.; FRISÉN, J. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. **Cell**, v. 153, n. 6, p. 1219-1227, 2013.

STALEY, K. The role of an inwardly rectifying chloride conductance in postsynaptic inhibition. **Journal of Neurophysiology**, v. 72, n. 1, p. 273-284, 1994.

STEINLEIN, O.K. Genetic mechanisms that underlie epilepsy. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, n. 5, p. 400-408, 2004.

SUN, T.; WANG, X.J.; XIE, S.S.; ZHANG, D.L.; WANG, X.P.; LI, B.Q.; MA, W.; XIN, H. A comparison of proliferative capacity and passaging potential between neural stem and progenitor cells in adherent and neurosphere cultures. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 29, n. 7, p. 723-731, 2011.

THURMAN, D.J.; BEGHI, E.; BEGLEY, C.E.; BERG, A.T.; BUCHHALTER, J.R.; DING, D.; HESDORFFER, D.C.; HAUSER, W.A.; KAZIS, L.; KOBAYASHI, R.; KRONER, B.; LABINER, D.; LIOW, K.; LOGROSCINO, G.; MEDINA, M.T.; NEWTON, C.R.; PARKO, K.; PASCHAL, A.; PREUX, P.M.; SANDER, J.W.; SELASSIE, A.; THEODORE, W.; TOMSON, T.; WIEBE, S.; ILAE COMMISSION ON EPIDEMIOLOGY. Standards for epidemiologic studies and surveillance of epilepsy. **Epilepsia**, v. 52, Suppl 7, p. 2-26, 2011.

TRAN, T.D.; JACKSON, H.D.; HORN, K.H.; GOODLETT, C.R.; Vitamin E does not protect against neonatal ethanol-induced cerebellar damage or deficits in eye blink classical conditioning in rats. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 29, p. 117-129, 2005.

TRINKA, E.; COCK, H.; HESDORFFER, D.; ROSSETTI, A.O.; SCHEFFER, I.E.; SHINNAR, S.; SHORVON, S.; LOWENSTEIN, D.H. A definition and classification of status epilepticus – Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. **Epilepsia**, v. 56, n. 10, p. 1515-1523, 2015.

TÜTÜNCÜOĞLU, S.; SERDAROĞLU, G.; KADIOĞLU, B. Landau-Kleffner syndrome beginning with stuttering: case report. **Journal of Child Neurology**, v. 17, n. 10, p. 785-788, 2002.

VAN, P.H.; CHRISTIE, B.R.; SEJNOWSKI, T.J.; GAGE, F.H. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **Proceedings of the National Academy Science USA**, v. 96, n. 23, p. 13427-13431, 1999.

VESCOVI, A. L.; REYNOLDS, B. A.; FRASER, D. D.; WEISS, S. bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. **Neuron**, v. 11, n. 5, p. 951-966, 1993.

VEZZANI, A.; GRANATA, T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. **Epilepsia**, n. 46, n. 11, p. 1724-1743, 2005.

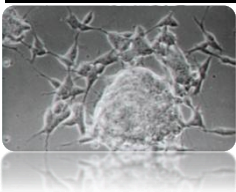
VEZZANI, A.; FRIEDMAN, A. Brain inflammation as a biomarker in epilepsy. **Biomarkers in Medicine**, v. 5, n. 5, p. 607-614, 2011.

VEZZANI, A.; FRENCH, J.; BARTFAI, T.; BARAM, T.Z. The role of inflammation in epilepsy. **Nature Reviews Neurology**, v. 7, n. 1, p. 31-40, 2011.

WALDBAUM, S.; PATEL, M. Mitochondria, oxidative stress, and temporal: lobe epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 88, p. 23-45, 2010.

WIEBE, S.; JETTE, N. Epilepsy surgery utilization: Who, when, where, and why? **Current Opinion in Neurology, Philadelphia**, v. 25, n. 2, p. 187-193, 2012.

ZIA, A.; SIDDIQUI, B.S.; BEGUM, S.; SURIA, A. Studies on the constituents of the leaves of Neriumoleander on behavior pattern in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, n. 1, p. 33-39, 1995.



CAPÍTULO I

3 CAPÍTULO I

UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO NEURAIS COMO TERAPIA DA EPILEPSIA: UMA PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA

Mirna Luciano de Gois da Silva; Maria Acelina Martins de Carvalho

Resumo

A Epilepsia é um dos distúrbios neurológicos mais comuns dentre as doenças neurodegenerativas, e o transplante de células-tronco é uma importante ferramenta na reparação desses distúrbios do sistema nervoso. O objetivo desse artigo foi a realização de uma prospecção tecnológica para avaliar a utilização de células-tronco na terapia da epilepsia por meio de patentes nas bases de dados nacionais e internacionais – Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), Patentes da América Latina e Espanha (*Latipat*) e Escritório Europeu de Patentes (*Espacenet*), e publicações científicas na base de dados *Science Direct*, utilizando palavras chaves em português, espanhol e inglês, sendo válidos os que apresentassem os termos descritos nos campos de pesquisa: título e resumo. Observou-se um número reduzido de patentes relacionadas às palavras-chave células-tronco neurais e epilepsia/neuroesferas e epilepsia quando comparada às publicações de artigos científicos, assim como a reduzida proteção tecnológica em base de dados nacionais. Portanto, faz-se necessário o estudo de novas terapias para a epilepsia por meio do uso de tratamentos naturais e promissores na inovação tecnológica.

Palavras-chave: Células-tronco neurais; Epilepsia; Neuroesferas; Prospecção tecnológica.

USE OF NEURAL STEM CELLS FOR THERAPY OF EPILEPSY: AN EXPLORATION TECHNOLOGY

Mirna Luciano de Gois da Silva; Maria Acelina Martins de Carvalho

Abstract

Epilepsy is the most common neurological disorders among the neurodegenerative diseases and stem cell transplantation is an important tool in the repair of nervous system disorders. The aim of this papers to carry out a explorations technology to assess the use of stem cells in epilepsy therapy through patents in national and international databases - National Institute of Industrial Property (INPI), United Patents Latina and Spain (*Latipat*) and European Patent Office (*Espacenet*), and scientific publications in the *Science Direct* database using keywords in Portuguese, Spanish and English, It is validly to submit the terms described in the search fields: title and abstract. There was a small number of patents related to specific keywords to the use of neural stem cells in epilepsy therapy compared to scientific articles publishing, as well as reduced technological protection in national database. Therefore, it is necessary to study new therapies for epilepsy through the use of natural and promising treatments on technological innovation.

Keywords: Neural stem cells; Epilepsy; Exploration technology; Neurospheres.

3.1 Introdução

As CTN, obtidas de regiões específicas do sistema nervoso de adultos e fetos, são cultivadas *in vitro* para formar neuroesferas com um misto de CTN e células-tronco neurais progenitoras (CTNP) quando na presença dos fatores de crescimento FGF (VESCOVI et al., 1993; GRITTI et al., 1996) e EGF (BONNAMAIN; NEVEU; NAVEILHAN, 2012). A retirada desses fatores leva à diferenciação das CTNP em células do sistema nervoso, como astrócitos, neurônios e oligodendrócitos, o que as tornam potenciais terapêuticas alternativas para as doenças neurodegenerativas, como a epilepsia (CLEVELAND, 2007; HUNG et al., 2010; LOBSIGER; BONNAMAIN; NEVEU; NAVEILHAN, 2012).

A descoberta da neurogênese em regiões específicas do encéfalo adulto, como a zona subventricular e o hipocampo, trouxe novas perspectivas para as pesquisas relacionadas à terapia celular e regeneração do sistema nervoso (VAN et al., 1999; BJÖRKLUND; LINDVALL, 2000; GAGE, 2002; KIM; de VELLIS, 2009).

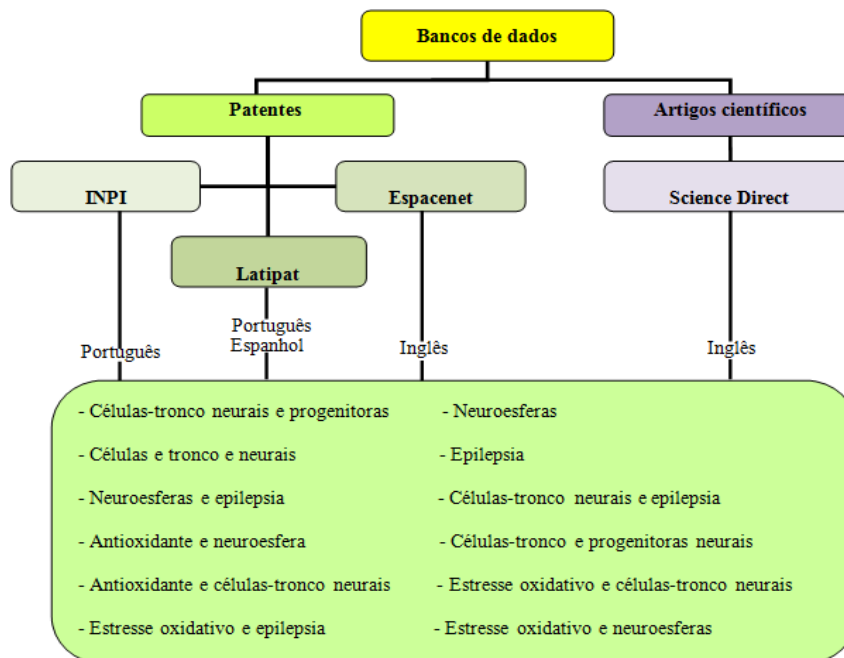
A epilepsia é uma doença neurodegenerativa, que compreende crises espontâneas e recorrentes causada por alterações neurológicas devido à atividade elétrica anormal no córtex, especificamente na região lobo temporal e hipocampo (FRENCH et al., 1993; HIRTZ et al., 2007; NAEGELE et al., 2010; MARQUES et al., 2011). Essa doença continua a ser resistente à tratamento com fármacos antiepilépticas em 25-36% dos pacientes (KWAN; BRODIE, 2000) representando, assim, um desafio para a medicina regenerativa devido às poucas opções terapêuticas (LUNN et al., 2011) e estas não permitem a cura, apenas reduzem os sintomas da doença ou retardam seu avanço, e a doença continua a progredir (ENGELHARDT et al., 2005; PALOP et al., 2006).

Diante disso, observa-se que as células-tronco neurais representam uma promessa alcançável na terapêutica da epilepsia, sendo relevante a realização de pesquisas com o escopo de tentar isolá-las, caracterizá-las e aplicá-las como terapia alternativa. Portanto, o objetivo desse trabalho foi desenvolver uma prospecção tecnológica, em bases de dados nacionais e internacionais, sobre a utilização desse tipo celular na terapia da epilepsia.

3.2 Material e métodos

A prospecção tecnológica ocorreu em bases de dados nacionais e internacionais de pedido de depósito de patentes e de artigos científicos. Os documentos encontrados até o presente momento foram analisados individualmente, a fim de caracterizar o avanço tecnológico considerando a área de interesse, o ano de depósito ou publicação, país de publicação e/ou depósito do artigo e patente, respectivamente. O levantamento foi realizado em agosto de 2015. Foram utilizados termos em inglês, espanhol e português para a busca nas bases dos pedidos de depósito de patentes, e termos em inglês em bases de artigos científicos, sendo considerados válidos os documentos que apresentassem as palavras-chave pesquisadas no título e/ou no resumo (Figura 1).

Figura 1 – Delineamento realizado nos bancos de dados para a prospecção tecnológica em células-tronco neurais e epilepsia.



3.3 Resultados

A partir da análise das palavras-chave: células-tronco neurais e progenitoras; neuroesferas; células e tronco e neurais; epilepsia; células-tronco neurais e epilepsia; neuroesferas e epilepsia; células-tronco e progenitoras neurais;

antioxidante e neuroesfera; estresse oxidativo e neuroesferas; antioxidante e células-tronco neurais; estresse oxidativo e células-tronco neurais; estresse oxidativo e epilepsia, foi obtido os números de pedidos de patentes depositados e artigos científicos por base de dados de acordo com os termos utilizados (Tabela 1).

Tabela 1. Quantificação de pedidos de depósito de patentes e artigos científicos por palavras-chave nos bancos de dados do INPI, *Latipat*, *Espacenet* e *Science Direct*.

Palavras-chave	INPI	Latipat	Espacenet	Science Direct
Células-tronco neurais e progenitoras	1	2	366	3498
Neuroesferas	0	1	49	587
Células e tronco e neurais	3	31	1655	-*
Epilepsia	19	1288	6256	30064
Células-tronco neurais e epilepsia	0	1	4	292
Neuroesferas e epilepsia	0	0	0	27
Células-tronco e progenitoras neurais	0	1	366	8411
Antioxidante e neuroesfera	0	0	0	320
Estresse oxidativo e neuroesferas	0	0	0	544
Antioxidante e células-tronco neurais	0	0	0	5276
Estresse oxidativo e células-tronco neurais	0	0	0	8663
Estresse oxidativo e epilepsia	0	0	0	6696

Fonte: dados das pesquisas nas bases de dados.

Legenda: INPI - Instituto Nacional de Propriedade Industrial do Brasil (palavras-chave em português); *Latipat* – patentes depositadas na Espanha e em países da América Latina (palavras-chave em português e espanhol); *Espacenet* – patentes depositadas em mais de 90 países, inclusive nos Estados Unidos, China, Japão, Coreia do Sul, Alemanha e Brasil (palavras-chave em inglês).

* Não é possível a busca de artigo por esse tipo de palavra-chave.

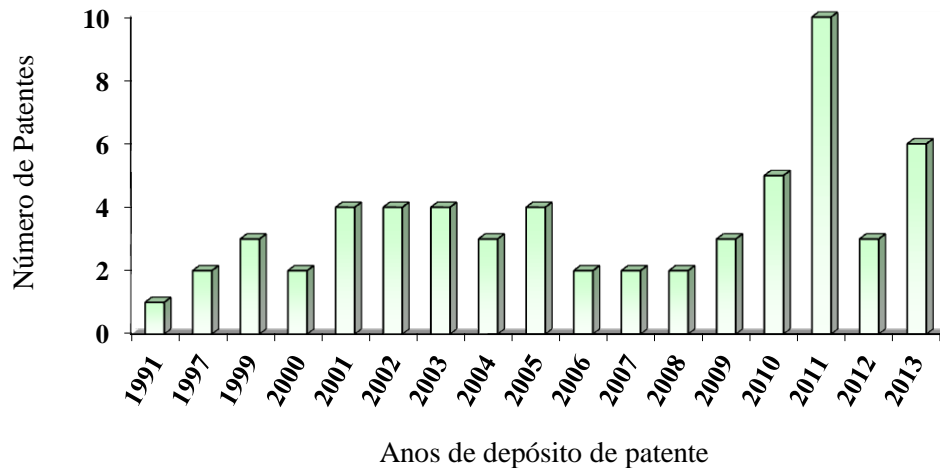
Na consulta das palavras-chave aos bancos de dados nacionais e internacionais para pedido de depósito de patentes relacionados ao tema desta pesquisa encontrou-se 23, 1324 e 8696 patentes nas bases INPI, *Latipat* e *Espacenet*, respectivamente; e na consulta ao banco de dados *Science Direct* obteve-se 64378 artigos (Tabela 1). Estes dados mostram que a quantidade de patentes nas três bases de dados pesquisadas representam aproximadamente 16%

da quantidade de artigos científicos publicados na base de dados analisada. Além disso, foi observado que dentre as patentes depositadas na INPI em relação à terapia da epilepsia, todas estão relacionadas ao uso de outros tipos de substâncias e não às células-tronco; na base *Latipat* que compreende as patentes depositadas na América Latina e Espanha, a terapia da epilepsia, assim como outros distúrbios neurológicos como o acidente vascular cerebral e a isquemia, é pela utilização de células-tronco embrionárias; e na base *Espacenet* as patentes encontradas também são com células-tronco embrionárias, além de células-tronco mesenquimais derivadas de placenta e células estaminais neurais. Esta última está relacionada à sua inclusão em uma composição farmacêutica no tratamento de pacientes com distúrbios do SNC ou sistema nervoso periférico.

Já em relação à base de dados dos artigos científicos, foi observado a utilização de CTN e de neuroesferas na terapia da epilepsia um total de 292 e 27 artigos, respectivamente (Tabela 1). No primeiro caso, a grande maioria trata-se de artigos de revisão mencionando o potencial terapêutico para o uso desse tipo celular em pacientes acometidos por epilepsia, e no segundo dado trata-se do isolamento celular ou infusão na região cerebral com sua respectiva resposta celular. As demais palavras-chave pesquisadas trazem como resultados a sua aplicação na terapia da epilepsia como também em outras doenças que acometem o ser humano.

Em relação à evolução nos pedidos de depósito de patentes, foi analisada a progressão anual de patentes nas bases de dados já mencionadas anteriormente (Figura 2).

Figura 2. Evolução anual de pedidos de depósitos de patentes referentes ao uso de CTN ou neuroesferas em distúrbios neurológicos na base de dados INPI, *Latipat* e *Espacenet*.



Fonte: Dados das pesquisas nas bases de dados.

A partir de 2001, houve o aumento do número de patentes, principalmente na *Espacenet* (depósito de patentes de mais de 90 países) em relação ao uso de CTN, neuroesferas ou células progenitoras na terapia de distúrbios neurológicos, principalmente a epilepsia, sendo bem elevada a quantificação dos pedidos de depósitos no ano de 2011.

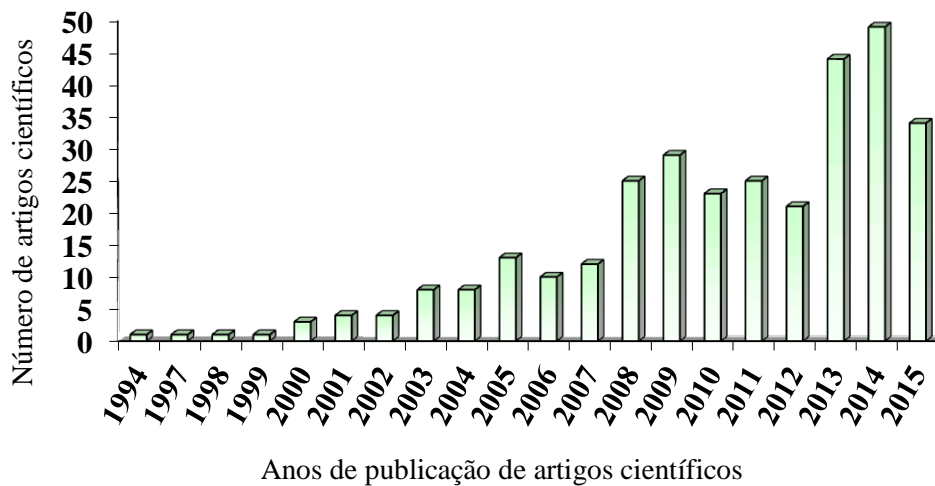
Além disso, na figura 2 observa-se que houve uma redução no número de pedidos de depósitos de patentes no ano de 2012 quando relacionado à quantificação dos dois anos anteriores.

Em relação aos países de origem dos depositantes na base de dados pesquisadas, entre os 4 depositantes listados na pesquisa com o uso das CTN ou neuroesferas na terapia da epilepsia, os Estados Unidos da América (EUA) detem 2 patentes, seguida pela China e República da Coreia com uma patente cada um.

A figura 3 mostra a evolução anual das publicações de artigos científicos na base de dados *Science Direct* correlacionando as palavras-chave células-tronco neurais e neuroesferas com epilepsia. Observa-se que a partir de 2008 as publicações de artigos tenderam a aumentar em relação aos anos anteriores, principalmente a partir de 2013, mostrando assim a relação na evolução anual de publicações entre artigos e patentes. Deve-se ressaltar que a publicação de artigo

continuou nos anos 2014 e 2015, mas não se observou patentes depositadas nesses mesmos anos.

Figura 3. Evolução anual da publicação de artigos científicos referentes ao uso de CTN ou neuroesferas em distúrbios neurológicos na base de dados *Science Direct*.



Fonte: Dados das pesquisas nas bases de dados.

3.4 Discussão

A prospecção tecnológica visa a busca de anterioridade das pesquisas científicas e tecnológicas para que a partir da mesma seja possível ampliar a capacidade de antecipação, direcionando novos estudos ou completando os já existentes a fim de influenciar de forma significativa na atividade de inovação no âmbito empresarial, bem como no meio acadêmico (AMPARO; RIBEIRO; GUARIEIRO, 2012; OLIVEIRA-JÚNIOR; ALMEIDA, 2012).

O monitoramento de informação sobre um tema ao qual se deseja cientificamente desenvolver deve constar da coleta, análise e estruturação dos dados obtidos. As principais fontes de informação em que se baseiam são as de natureza técnica e científica por meio de artigos de periódicos, patentes, conferências, etc. (AMPARO; RIBEIRO; GUARIEIRO, 2012).

Ao relacionar os termos epilepsia e neuroesferas observa-se que não há pedidos de depósito de patentes nas bases de pesquisa, provavelmente devido à tecnologia inerente nos estudos dessa área começar a serem feitos recentemente a partir da descoberta da neurogênese em regiões específicas do encéfalo adulto e

suas aplicações promissoras principalmente na terapia de Parkinson e Alzheimer (BJÖRKLUND; LINDVALL, 2000; RICHARDSON et al., 2005; LUNN et al., 2011).

Na pesquisa realizada nas bases de dados, o INPI foi o que apresentou o menor número de pedidos de depósito de patentes. Isto pode ser justificado pelas objeções ético-religiosas à utilização das células-tronco, às incertezas geradas pelas possíveis aplicações terapêuticas dessas células, bem como ao cenário regulatório, ainda em construção no país. No cenário internacional, somente a partir de 2001 elevou-se o número de patentes devido à autorização da pesquisa com células-tronco embrionárias nos Estados Unidos (país com maior número de patentes nessa área) e, conseqüentemente, o financiamento de pesquisa com linhagens de células-tronco por recursos federais (DINIZ; AVELINO, 2009).

Entretanto, houve uma redução de patentes e artigos no ano de 2012 devido novamente a interferência das questões ético-religiosas ao uso das células-tronco, aliado, especificamente a patente, ao decorrente tempo necessário para que um pedido de depósito fosse aprovado e indexado em uma base de patente privada após sua publicação.

3.5 Conclusão

A análise dos pedidos de depósito de patentes e dos artigos científicos sobre CTN, neuroesferas e células progenitoras na terapia da epilepsia até agosto de 2015 permite inferir que essa tecnologia, apesar de não ser recente, está com um número bastante reduzido de patentes até a presente data da pesquisa, possivelmente refletindo, principalmente no caso do Brasil, a ausência de investimento nacional em pesquisas, inovação e desenvolvimento de tecnologias e, refletindo mundialmente a grande burocracia envolvida no processo de proteção de pesquisa e aos entraves ético-religiosos em relação à utilização dessas células-tronco.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI) pelo auxílio bolsa de estudo.

REFERÊNCIAS

AMPARO, K.K.S; RIBEIRO, M.C.O; GUARIEIRO, L.L.N. Estudo de caso utilizando mapeamento de prospecção tecnológica como principal ferramenta de busca científica. **Perspectivas em Ciência da Informação**, v. 17, p. 195-209, 2012.

BJÖRKLUND, A.; LINDVALL, O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. **Nature Neuroscience**, v. 3, n. 6, p. 537-544, 2000.

BONNAMAIN, V.; NEVEU, I.; NAVEILHAN, P. Neural stem/progenitor cells as promising candidates for regenerative therapy of the central nervous system. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 6, n. 17, p. 1-8, 2012.

DINIZ, D.; AVELINO, D. Cenário internacional da pesquisa em células-tronco embrionárias. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, n. 3, p. 541-547, 2009.

ENGELHARDT, E.; BRUCKI, S. M. T.; CAVALCANTI, J. L. S.; FORLENZA, O. V.; LAKS, J.; VALE, F. A. C. Tratamento da doença de Alzheimer: recomendações e sugestões do Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 63, n. 4, p. 1104-1112, 2005.

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. **Annals of Neurology**, v. 34, p. 774-780, 1993.

GAGE, F.H. Neurogenesis in the adult brain. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 3, p. 612-613, 2002.

GRITTI, A.; PARATI, E.A.; COVA, L.; FROL-ICHSTHAL, P.; GALLI, R.; WANKE, E.; FARAVELLI, L.; MORASSUTTI, D.J.; ROISEN, F.; NICKEL, D.D.; VESCOVI, A.L. Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. **The Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 3, p. 1091-1100, 1996.

HIRTZ, D; THURMAN, D.J; GWINN-HARDY, K; MOHAMED, M; CHAUDHURI, A.R; ZALUTSKY, R. How common are the “common” neurologic disorders? **Neurology**, v. 68, p. 326-337, 2007.

HUNG, C.W.; CHEN, Y.C.; HSIEH, W.L.; CHIOU, S.H.; KAO, C.L. Ageing and neurodegenerative diseases. **Ageing Research Reviews**, v. 9S, n. 1, p. S36-S46, 2010.

KWAN, P.; BRODIE, M.J. Early identification of refractory epilepsy. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, p. 314-319, 2000.

KIM, S.U.; DE VELLIS, J. Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: a review. **Journal of Neuroscience**, v. 29, p. 2183-2200, 2009.

LOBSIGER, C. S.; CLEVELAND, D. W. Glial cells as intrinsic components of non-cell-autonomous neurodegenerative disease. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 11, p. 1355-1360, 2007.

LUNN, J.S.; SAKOWSKI, S.A.; HUR, J.; FELDMAN, E.L. Stem cell technology for neurodegenerative diseases. **Annals of Neurology**, v. 70, n. 3, p. 353-361, 2011.

MARQUES, T.H.C.; CARDOSO, K.M.F.; ALMEIDA, A.A.C.; TOMÉ, A.R.; FREITAS, R.M. Behavioral studies and histopathological changes in mice pretreated with *Bellis perennis* in pilocarpine-induced seizures. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 10, p. 338-350, 2011.

NAEGELE, J.R.; MAISANO, X.; YANG, J.; ROYSTON, S.; RIBEIRO, E. Review Recent advancements in stem cell and gene therapies for neurological disorders and intractable epilepsy. **Neuropharmacology**, v. 58, p. 855-864, 2010.

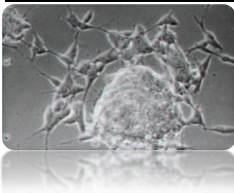
OLIVEIRA-JÚNIOR, R.G.; ALMEIDA, J.R.G.S. Prospecção tecnológica de *Ananas comosus* (Bromeliaceae). **Revista GEINTEC**, v. 2, p. 505-513, 2012.

PALOP, J.J.; CHIN, J.; MUCKE, L. A network dysfunction perspective on neurodegenerative diseases. **Nature**, v. 443, n. 7113, p. 768-773, 2006.

RICHARDSON, R. M.; BROADDUS, W. C.; HOLLOWAY, K. L.; FILLMORE, H.L. Grafts of adult subependymal zone neuronal progenitor cells rescue hemiparkinsonian behavioral decline. **Brain Research**, v. 1032, n. 1, p. 11-22, 2005.

VAN, P.H.; CHRISTIE, B. R.; SEJNOWSKI, T. J.; GAGE, F. H. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 23, p. 13427-13431, 1999.

VESCOVI, A.L.; REYNOLDS, B.A.; FRASER, D.D.; WEISS, S. bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. **Neuron**, v. 11, n. 5, p. 951-966, 1993.



CAPÍTULO II

4 CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO NEURAIS ISOLADAS DA REGIÃO SUBVENTRICULAR DE ENCÉFALO DE RATOS *WISTAR*

Mirna Luciano de Gois da Silva; Maria Acelina Martins de Carvalho

Resumo

As células-tronco neurais tem a capacidade de se diferenciarem em outros tipos celulares, e atualmente estão sendo utilizadas como alternativa terapêutica. Este estudo avaliou o estresse oxidativo em culturas de células-tronco neurais isoladas da região subventricular de encéfalo de ratos. Foi realizado o isolamento das células-troncos neurais para posterior teste de viabilidade por meio de teste com azul de tripan, identificação por Qtracker[®] e marcação por imunofluorescência para células-tronco (Nestin) e astrócito (GFAP). Os níveis de peroxidação lipídica, teor de nitrito, concentração de glutathiona reduzida e atividades das enzimas superóxido dismutase e catalase foram avaliadas nas células com 1, 7 e 30 dias de cultivo celular a fim de verificar o estresse oxidativo das culturas. Os resultados mostraram que o procedimento de isolamento das células-tronco neurais foi satisfatório, com 95% de viabilidade celular e positividade na marcação com Nestin e GFAP. Verificou-se que no 1º dia de cultura celular houve estresse oxidativo, mas no 7º dia de cultura essa situação foi revertida, proporcionando proteção às membranas das células pela ação dos antioxidantes glutathiona reduzida, superóxido dismutase e catalase, assim como no 30º dia. A avaliação do estresse oxidativo e padronização do isolamento de células-tronco neurais podem alterar o sistema antioxidante na cultura, e assim, interferir na dinâmica celular quando utilizadas em terapias.

Palavras-chave: Caracterização celular; Células-tronco neurais progenitoras; Estresse oxidativo; Neuroesferas.

EVALUATION OF OXIDATIVE STRESS IN CULTURED NEURAL STEM CELLS FROM THE RAT BRAIN SUBVENTRICULAR ZONE

Mirna Luciano de Gois da Silva; Maria Acelina Martins de Carvalho

Abstract

Progenitor neural stem cells have the ability to differentiate into other cell types, and they are currently being used as a therapeutic alternative. This study evaluated the oxidative stress in cultured neural stem cells isolated from the subventricular region of rat brain. It was performed the isolation of neural stem cells with subsequent viability test by trypan blue test, identification by Qtracker[®] and labeling by immunofluorescence for stem cells (Nestin) and astrocyte (GFAP). The levels of lipid peroxidation, nitrite content, reduced glutathione concentration, and superoxide dismutase and catalase enzyme activity were evaluated in cells with 1, 7 and 30 days cell culture to verify oxidative stress in the cultures. The results demonstrate that the neural stem cell isolation procedure was satisfactory with 95% cell viability and positive in labeling with Nestin and GFAP. It was found that on the first day of cell culture there was oxidative stress, but on the 7th day of culture, this situation was reversed, protecting cell membranes by the action of the antioxidants reduced glutathione, superoxide dismutase and catalase, as well as in the 30th day. The evaluation of oxidative stress and standardization of isolating neural stem cells can alter the antioxidant system in culture, and thus interfere with the cellular dynamics when used in therapies.

Keywords: Cell characterization; Neurospheres; Oxidative stress; Progenitor neural stem cells.

4.1 Introdução

As células-tronco tem a capacidade de se diferenciarem em diversos tipos celulares, assim como se autorrenovarem (SANTIN; NUNEZ; MOURA, 2015). Devido a essas características, esses tipos de células, e especificamente as células-tronco neurais, estão sendo utilizadas como alternativa terapêutica para doenças neurodegenerativas (BONNAMAIN; NEVEU; NAVEILHAN, 2012), pois elas são capazes de se diferenciarem em linhagens celulares específicas do sistema nervoso, além de integrarem circuitos neurais ou substituírem neurônios danificados (HOSSINI et al., 2015).

Para a obtenção desses tipos celulares, é essencial que se padronize a técnica de isolamento celular para que haja uma reprodutividade constante, além de caracterizá-las e avaliá-las para que o processo de utilização das células-tronco neurais nas terapias não se propague de forma inapropriada, induzindo os pesquisadores ao erro e prejudicando o uso dessa alternativa nas terapias das doenças neurodegenerativas (KEEFER et al., 2007; MUÑOZ et al., 2008)

O estresse oxidativo é uma ameaça constante para a manutenção das culturas celulares (WICKENS, 2001; DASURI et al., 2013). Ele ocorre quando há excessiva produção de radicais livres devido ao desequilíbrio dos sistemas prooxidantes e antioxidantes desencadeados por fatores endógenos ou exógenos (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004; VON BORELL, 2001; LIOCHEV, 2013), podendo alterar drasticamente a função celular ao induzir danos no DNA, inibir processos que ocorrem no nível de mitocôndrias e lesionar estruturas celulares por peroxidação (DASURI et al., 2013).

Os radicais livres são encontrados em todos os sistemas biológicos e são capazes de reagir com todos os componentes celulares, culminando com a morte celular (MARTIN et al., 1998; RIBEIRO, 2006; SANZ et al., 2006). Em condições normais, o mecanismo de defesa enzimático mantém a integridade celular (POWERS et al., 1994; DAJAS, 2012).

O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade das enzimas antioxidantes, assim como detectar os níveis de peroxidação lipídica, glutathiona reduzida e nitrito em culturas de neuroesfera, isoladas da região subventricular de encéfalos de ratos

Wistar, averiguando a interferência no desenvolvimento celular para posterior utilização em terapias.

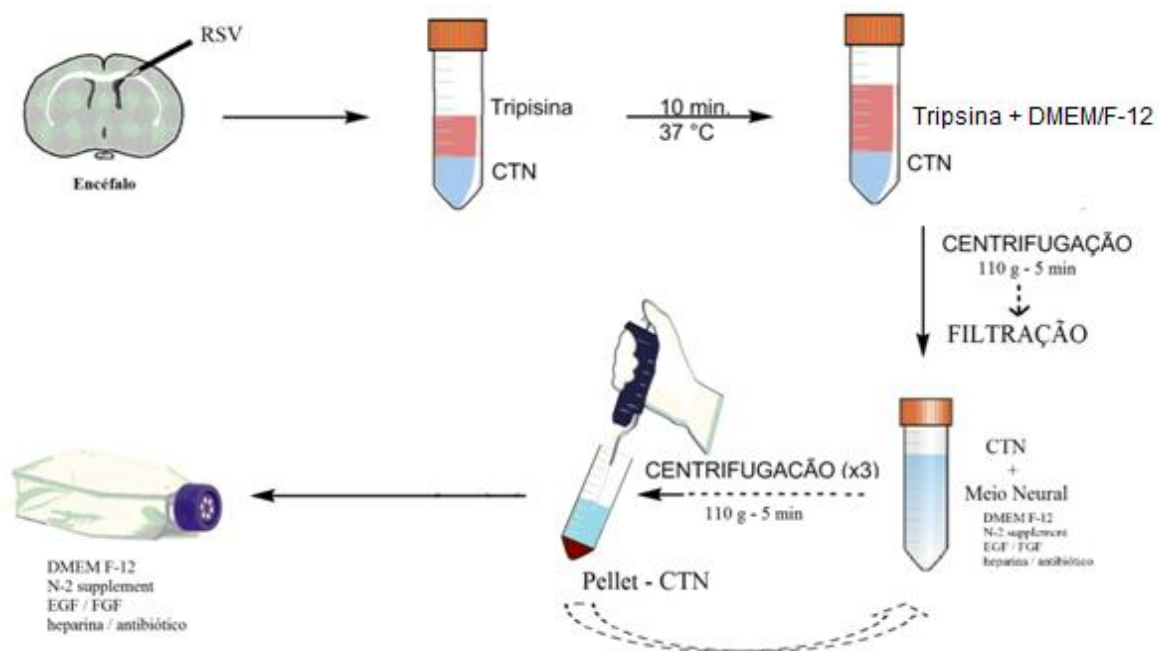
4.2 Material e métodos

4.2.1 Isolamento e cultivo de células-tronco neurais - CTN

A coleta, o isolamento e o cultivo das CTN foram realizados no Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco (NUPCelt/UFPI). Os procedimentos metodológicos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA/UFPI) nº 001/14.

As CTN foram obtidas a partir da região subventricular do encéfalo de quatro ratos *Wistar*, adultos com 2 meses de idade, com peso de 250 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Os animais foram mantidos em condições controladas de iluminação (ciclo de 12h claro/ escuro) e temperatura (25 ± 2 °C), recebendo ração padrão do tipo Purina e água *ad libitum*. Estes animais foram eutanasiados após a contenção química com 50 mg/kg/peso corporal de Cetamin (Rhobifarma Pharmaceutical Industry Ltda) associado a 2 mg/kg de Xilazin (Rhobifarma Pharmaceutical Industry Ltda) por via intramuscular, e após quinze minutos da contenção química inicial, foi administrado 150 mg/kg de tiopental sódico (CHEMIE®) dose letal por via intramuscular em cada animal. Confirmado o óbito, realizou-se a dissecação, coleta e cultivo das células, seguindo o protocolo descrito por Azari e colaboradores (2010) com modificações (Figura 1).

Figura 1: Protocolo de isolamento das células-tronco neurais (CTN) da região subventricular (RSV) do encéfalo de ratos *Wistar*.



Legenda: DMEM/F-12 (Meio de cultivo celular - Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient mixture F-12 Ham), EGF (fator de crescimento epidérmico), FGF (fator de crescimento de fibroblasto).

As células isoladas foram incubadas em 5 mL de tripsina com posterior inibição em mesma quantidade de meio DMEM/F-12. As células passaram por uma centrifugação a 110 g por 5 min, com posterior filtração em malha 40 μm ; em seguida, no *pellet* resultante adicionou-se Meio Neural (DMEM/F-12 + GlutaMax™ Gibco® Life Technologies™, suplemento N-2 (100x Gibco® Life Technologies™), EGF [20 ng/mL] (Gibco® Life Technologies™), FGF-básico [10 ng/mL] (Gibco® Life Technologies™), heparina sódica 0,2% e penicilina-estreptomicina 10% (Gibco® Life Technologies™), passando por três centrifugações sucessivas a 110 g por 5 min (Excelsa® centrífuga refrigerada, MOD. 280R), havendo troca de meio neural entre cada uma dessas centrifugações. As células foram plaqueadas em garrafas 25 cm^2 e cultivadas em meio neural até o 15º dia de cultivo, e após esse período foi retirado os fatores de crescimento EGF e FGF. As garrafas de cultura foram acondicionadas em estufa de CO_2 a 5% com temperatura mantida em 37°C. O meio de cultura foi trocado em média a cada 3 dias, e monitorado diariamente para observação da formação de neuroesferas pelo sistema computacional de análise de imagens (LEICA® QWIN D4000, UK-Cambridge).

4.2.2 Viabilidade, identificação e Marcação celular

A cultura de neuroesferas foi submetida ao ensaio de viabilidade celular com Trypan Blue (Gibco® Life Technologies™), além de identificação celular com Qtracker® 655 Cell Labeling Kit (Thermo Fisher Scientific), e marcada por anticorpos primários Nestin (Rat-401, Santa Cruz Biotechnology®, inc.) e GFAP (2A5, Santa Cruz Biotechnology®, inc.), e anticorpo secundário Goat anti-mouse IgG-FITC (Santa Cruz Biotechnology®, inc.), a fim de se identificar a presença dessas CTN na cultura. O meio com células suspensas, ao 15º dia de cultura, foi removido e centrifugado a 110 g por 5 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e ressuspendeu-se as células em 1 mL de meio neural.

Para a mensuração da viabilidade celular foi homogeneizado a suspensão celular com o azul de Tripán, e uma gota da suspensão foi colocada em câmara de Neubauer para contagem celular em microscópio (BIOVAL–L2000A). Foram contabilizadas as células vivas (coloração clara – capacidade de expulsar o azul de tripan da célula) e as células mortas (coloração azul – perdeu a capacidade de expulsar o azul de tripan por meio da membrana comprometida) para o cálculo percentual.

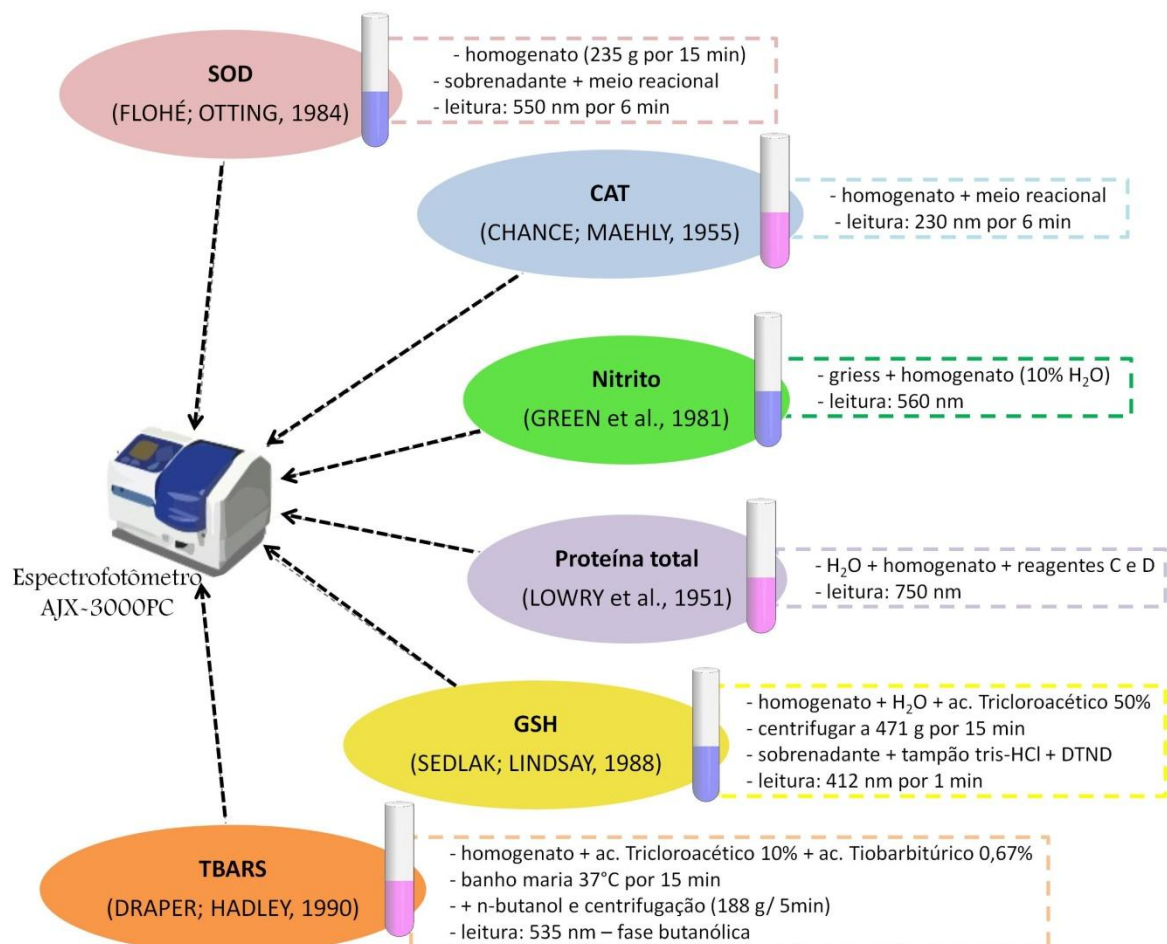
A identificação celular por Qtracker Cell Labeling 655® foi feita mediante a sua incubação com a suspensão celular por 1 h, a 37°C. Em seguida, foi centrifugada a 110 g por 5 min para a obtenção do *pellet* celular que foi ressuspendido em 1 mL de PBS buffer (GIBCO® Life Technologies™).

A imunofluorescência pelo anticorpo Nestin e GFAP, marcadores de células-tronco indiferenciadas e de astrócitos, respectivamente, ocorreu inicialmente com a fixação das neuroesferas com formaldeído 4%, permeabilização com 0,1% de Triton X-100 e em seguida, incubação em tubos distintos com os anticorpos primários Nestin e GFAP por 1 h. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas, também em tubos distintos com o anticorpo secundário Goat anti-mouse IgG-FITC por mais 1 h, sendo lavadas novamente por três vezes com PBS. Foram preparadas lâminas a fresco para análise em microscopia de fluorescência.

4.2.3 Determinação do estresse oxidativo

A análise do estresse oxidativo foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental (LAPNEX/UFPI). A cultura com as células-tronco neurais foi centrifugada a 110 g por 5 min nos dias 1, 7 e 30 do cultivo celular. O *pellet* formado foi homogeneizado com tampão fosfato de sódio pH=7,4 (*pellet* + tampão [peso *pellet* em μ L]) e utilizado para as dosagens de superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), nitrito, proteína total, glutatona reduzida (GSH) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em espectrofotômetro AJX-3000PC (Figura 2).

Figura 2. Determinação dos níveis de superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), nitrito, proteína total, glutatona reduzida (GSH) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) de células-tronco neurais em cultivo celular por espectrofotômetro, seguindo protocolos específicos.



4.2.3.1 Determinação dos níveis de peroxidação lipídica e teor de nitrito

Os ensaios TBARS foram utilizados para quantificar a peroxidação lipídica, seguindo o método previamente descrito por Draper e Hadley (1990). O homogenato (250 µL), previamente preparado, foi levado para banho maria (37°C/ 15 min) juntamente com o ácido tricloroacético 10% (1 mL) e solução de ácido tiobarbitúrico 0,67% (1 mL). Após o resfriamento, a amostra foi centrifugada com n-butanol (2 mL) a 188 g por 5 min. A fase butanólica de coloração rosa foi tomada para leitura em espectrofotômetro a 535 nm.

Para determinar o teor de nitrito na cultura de células-tronco neurais, foi adicionado em um tubo 500 µL do reagente de griess mais 500 µL do homogenato de células a 10%. Foi feita a leitura em espectrofotômetro a 560 nm (GREEN; TANNENBAUM; GOLDMAN, 1981).

4.2.3.2 Determinação da atividade superóxido dismutase, catalase e glutathiona reduzida

O homogenato celular foi centrifugado (80 g, 45 min), e o sobrenadante usado para ensaio de atividades de SOD. A atividade da SOD foi testada usando meio reacional (tampão fosfato de potássio - pH 7,8, xantina, cianeto de potássio – 200 µM, e EDTA – 1 mM, pH 6,8), homogenato e xantina oxidase para gerar radicais superóxido, sendo feita a leitura em espectrofotômetro a 550 nm após 6 min (FLOHE; OTTING, 1984). A concentração de proteína total foi medida pelo método de Lowry e colaboradores (1951).

A atividade da CAT foi medida pelo método que usa H₂O₂ para gerar H₂O e O₂. O meio reacional (H₂O₂, Tampão Tris HCl 1M e H₂O destilada) foi misturado ao homogenato, sendo realizada a leitura em espectrofotômetro (230 nm, 6 min). Com a amostra branco, foi feita a leitura na absorbância relativa a 230 nm com apenas 1 mL do meio reacional (CHANCE; MAEHLI, 1955).

A concentração de GSH utilizou o método descrito por Sedlak e Lindsay (1968). O homogenato foi centrifugado (472 g, 15 min) juntamente com H₂O e ácido tricloroacético 50%. O sobrenadante foi homogeneizado com tampão Tris HCl (pH 8,5) e DTND (0,01 M) para posterior leitura em espectrofotômetro em 412 nm.

4.2.4 Análises estatísticas

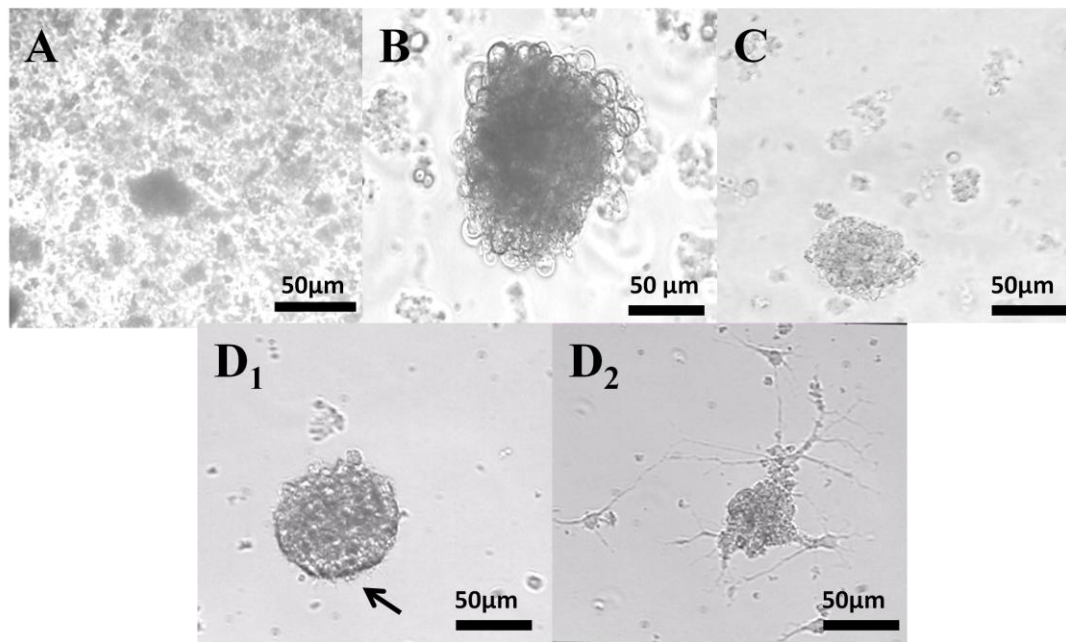
Os dados numéricos obtidos foram descritos como média \pm erro padrão da média. A análise estatística foi analisada por análise de variância (ANOVA) com teste *Student Newman Keuls*, sendo considerado estatisticamente diferente o valor de $p < 0,05$. O programa utilizado para essa análise e para a confecção dos gráficos foi *GraphPad Prism®* versão 6 para Windows (San Diego, CA, EUA).

4.3 Resultados

4.3.1 Obtenção e identificação das neuroesferas

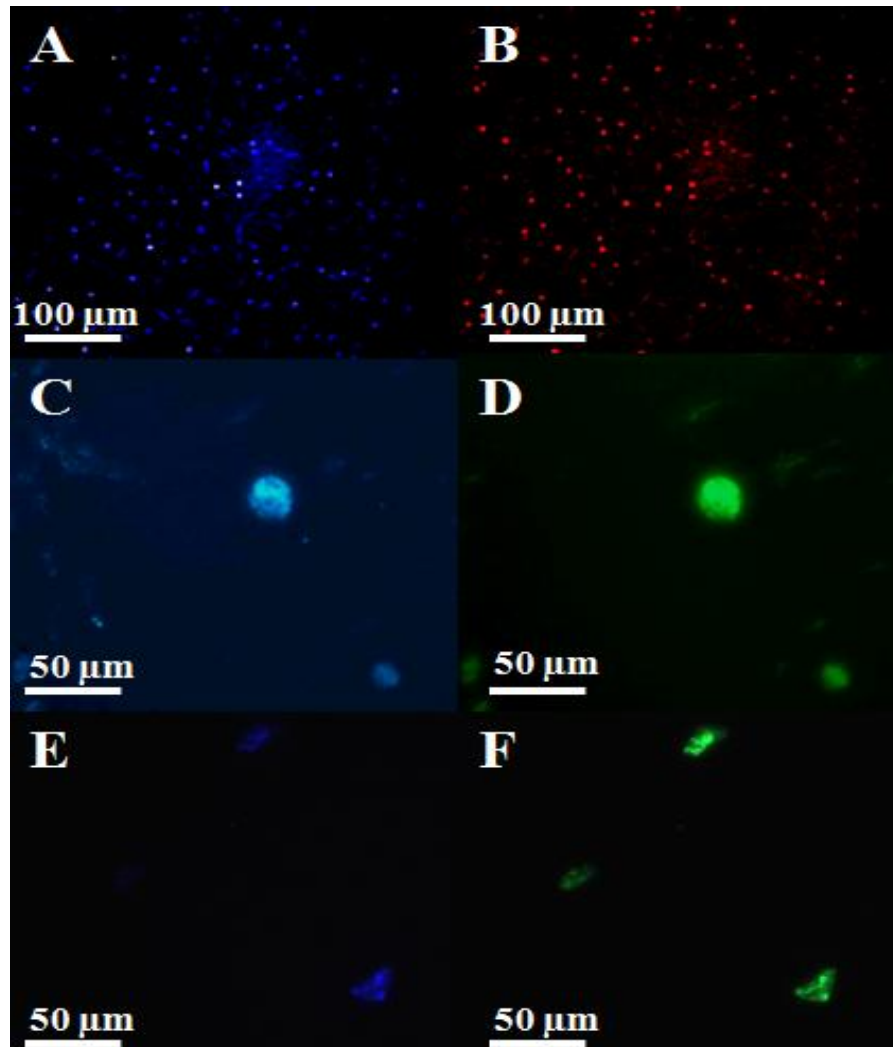
Os isolados de CTN dos ratos foram acompanhados em cultura por 30 dias a fim de se visualizar a formação e modificações das neuroesferas. Estes tipos celulares apresentaram tamanho e morfologia variados. No 1º dia da cultura, as células-tronco neurais tiveram morfologia pleomórfico (Figura 3A); do 7º ao 15º dias formaram as neuroesferas e apresentaram-se morfologicamente esféricas (Figura 3B; 3C); e no 30º dia algumas neuroesferas apresentaram início de desagregação celular com formação de “espículas” e outras formaram projeções iniciais para diferenciação celular (Figura 3D).

Figura 3. Fotomicrofotografias da cultura de CTNP isoladas da região subventricular do encéfalo de ratos *Wistar*. A. Primeiro dia de cultivo celular (células com tamanho e morfologia difusas), 10x. B. Formação de neuroesferas com morfologia esférica, 7 dias de cultivo, 10x. C. Neuroesferas com 15 dias de cultivo, 95% de viabilidade celular, 10x. D. Células em 30 dias de cultivo iniciando desagregação celular e formação de “espículas” (D₁) e diferenciação celular (D₂), 10x.



A cultura celular identificada com Qtracker Cell Labeling 655[®] (Figura 4A; 4B) e marcada com GFAP (Figura 4C; 4D) e Nestin (Figura 4E; 4F) emitiram fluorescência das células. A imunopositividade para GFAP - Dapi (Figura 4C) e GFAP - FITC (Figura 4D) apresentou formato esferóide e intensidade característicos para neuroesferas, pois houve marcação da proteína ácida fibrilar glial.

Figura 4. Fotomicrografias fluorescentes de neuroesferas após 15 dias de cultivo, isolada da zona subventricular de encéfalo de rato. A. Neuroesferas com Qtracker - Dapi, corte parafinado sem coloração, 20x. B. Neuroesferas com Qtracker - sem Dapi, corte parafinado sem coloração, 20x. C. Neuroesferas marcadas por GFAP - Dapi, a fresco sobre a lâmina e coberta com lamínula, 40x. D. Neuroesferas marcadas por GFAP - FITC, a fresco sobre a lâmina e coberta com lamínula, 40x. E. Neuroesferas marcadas com Nestin - Dapi, a fresco sobre a lâmina e coberta com lamínula, 40x. F. Neuroesferas marcadas com Nestin - FITC, a fresco sobre lâmina e coberta com lamínula, 40x.

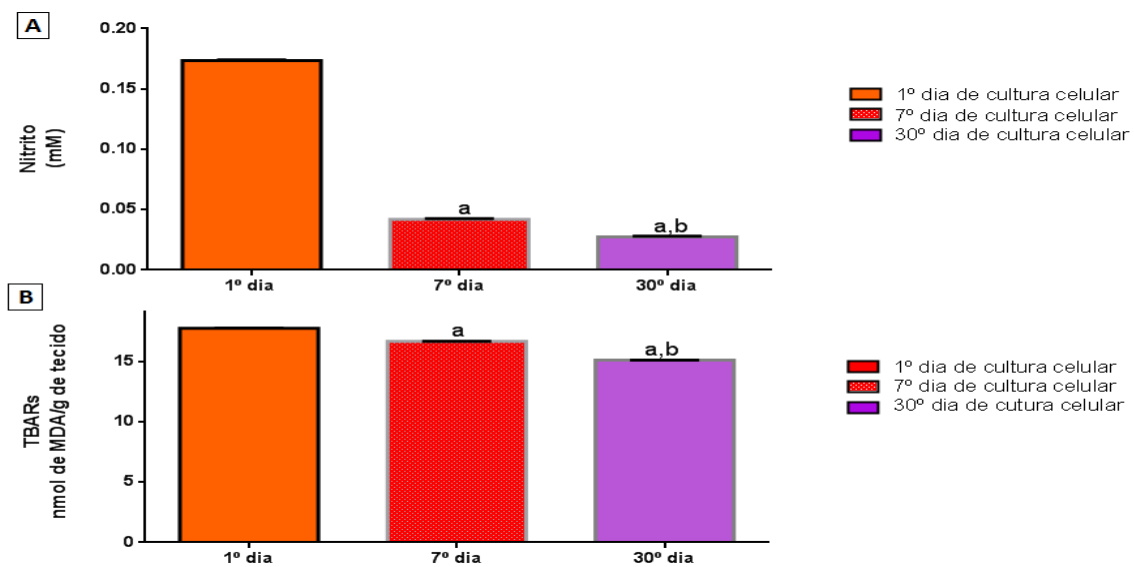


4.3.2 As neuroesferas e o estresse oxidativo

Os resultados da quantificação dos teores de nitrito e de TBARS para análise da peroxidação lipídica nas membranas, realizados em cultura de células-tronco neurais no 1º, 7º e 30º dias de cultivo celular estão representados na Fig. 5. Observa-se redução no nitrito (1º dia: $0,17 \pm 0,0005$ mM; 7º dia: $0,04 \pm 0,0005$ mM; 30º dia: $0,02 \pm 0,0005$ mM) (Figura 5B) e na peroxidação lipídica (1º dia: $17,76 \pm 0,005$ nmol de MDA/g de tecido; 7º dia: $16,66 \pm 0,005$ nmol de MDA/g de tecido; 30º dia: $15,11 \pm 0,005$ nmol de MDA/g de tecido) (Figura 5B), destacando-se a redução

nos teores de nitrito com 76% no 7º dia de cultura celular e 84,4% no 30º dia quando comparados ao 1º dia de cultivo ($p < 0,05$).

Figura 5. Alterações nos níveis de TBARS e nitrito nas culturas de células-tronco neurais durante o 1º, 7º e 30º dias de cultivo. A. Nitrito. B. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os valores representam a média \pm E.P.M da quantificação de Nitrito e TBARS. ^a $p < 0,05$ quando comparado ao 1º dia de cultura celular; ^b $p < 0,05$ quando comparado ao 7º dia de cultura celular (ANOVA e *t-Student-Newman-Keuls*). Resultados expressos em nmol de MDA/g de tecido (TBARS) e mM (nitrito).



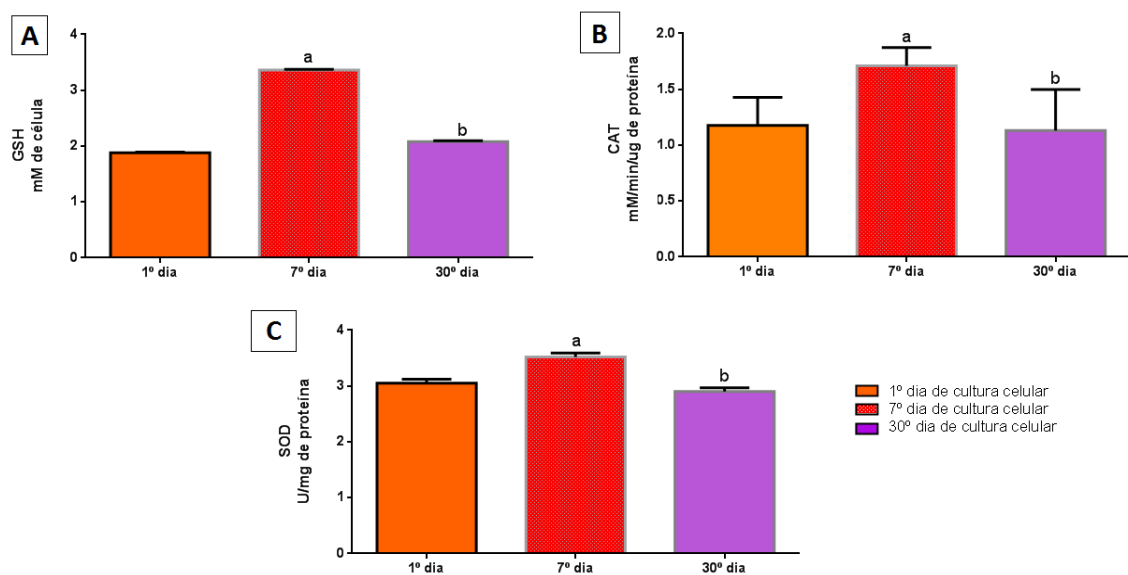
Em relação à mensuração das concentrações de glutathiona reduzida, foi observado que na cultura de células-tronco neurais no 7º dia de cultivo houve aumento da GSH quando comparado ao 1º dia de cultivo $1,88 \pm 0,006$ (7º dia: $3,36 \pm 0,006$ mM) ($p < 0,05$) e reduziu no 30º dia ($2,08 \pm 0,010$ mM) ($p < 0,05$) quando comparado ao 7º dia de cultivo celular (Figura 6A).

Quanto aos níveis de catalase, os resultados mostraram um aumento de 31% da atividade catalase no 7º dia de cultura celular ($1,71 \pm 0,734$ mM) quando comparado ao 1º dia ($1,17 \pm 0,112$ mM), e redução de 34,4% no 30º dia ($1,13 \pm 0,164$ mM) quando comparado ao 7º dia de cultura celular ($p < 0,05$) (Figura 6B).

Os resultados da atividade da superóxido dismutase nas culturas com células-tronco neurais estão apresentados na Figura 6C. Os dados mostraram que houve aumento da concentração de SOD no 7º dia de cultura celular [13,35% ($3,52 \pm 0,05$

U/mg de proteína)] quando comparado ao 1º dia de cultura, além de redução da atividade da SOD no 30º dia [17,61% ($2,9 \pm 0,05$ U/mg de proteína)] quando relacionado ao 7º dia de cultura celular ($p < 0,05$).

Figura 6. Atividade antioxidante em culturas com células-tronco neurais com 1, 7 e 30 dias de cultivo celular. A. Concentração da glutationa reduzida (GSH). B. Atividade da catalase (CAT). C. Atividade de superóxido dismutase (SOD). Os valores representam a média \pm E.P.M dos níveis de atividade dos antioxidantes em estudo. ^a $p < 0,05$ quando comparado ao 1º dia de cultura celular; ^b $p < 0,05$ quando comparado ao 7º dia de cultura celular (ANOVA e *t-Student-Newman-Keuls*). Os resultados foram expressos em mM (GSH), mM/min/ug de proteína (CAT) e U/mg de proteína (SOD).



4.4 Discussão

Jandial e pesquisadores (2007) afirmaram que as CTN são capazes de se diferenciarem em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos. Vários são os marcadores para a identificação desse tipo celular, sendo a Nestin e a GFAP as mais utilizadas (JIAO; CHEN, 2008). Na marcação por Nestin, foi observado as CTN progenitoras, além de ser utilizado como marcador de células imaturas do SNC (TAKAMORI et al., 2009); e por GFAP, foi identificado os filamentos de astrócitos (ARA et al., 2010).

A modificação no protocolo de Azari e colaboradores (2010) devido a troca do suplemento B-27 pelo suplemento N-2, observou-se que também houve a proliferação e crescimento das neuroesferas. Além disso, o FGF demonstrou

desempenhar um papel importante na sobrevivência e proliferação de células neuroectodérmicas. Foi quantificado $22,3 \times 10^5$ neuroesferas vivas no 15º dia de cultura, resultando em 95% de viabilidade. Ademais, verificou-se uma redução celular na cultura a partir da segunda passagem no 15º dia (Figura 3C; 3D) ao retirar os fatores de crescimento EGF e FGF.

Em relação ao estresse oxidativo, nitrito e TBARS são substâncias que o identifica quando em níveis elevados nas células. Com a quantificação reduzida de nitrito e TBARS durante os períodos analisados nas culturas de células-tronco neurais, infere-se que o sistema antioxidante foi satisfatório no 7º dia de cultivo celular, protegendo os lipídeos da membrana celular contra danos causados pelos radicais livres, possibilitando a fluidez e a dinâmica da membrana das células, visto que Bokov; Chaudhuri; Richardson (2004) afirmaram que alterações significativas nos níveis de nitrito e TBARS sugerem a perda de seletividade nas trocas iônicas com as alterações de permeabilidade na membrana, com risco de liberação do conteúdo das organelas e, conseqüentemente, a morte celular.

Na defesa contra o estresse oxidativo, as substâncias antioxidantes agem contra efeitos nocivos gerados pelos radicais livres (oxigênio singlet, os radicais: peróxido de hidrogênio, superóxido e hidroxila) nas células (HAIDA et al., 2011). Desta forma, tem-se a superóxido dismutase, a glutatona reduzida e a catalase como promotoras na regulação dos radicais livres (PEREIRA; VIDAL; CONSTANT, 2009).

A GSH é o antioxidante mais importante para a célula, devido está em maior concentração no meio intracelular, e desta forma atuando como primeira defesa das células contra os radicais livres (MARITIM et al., 2003; DALLAQUA; DAMASCENO, 2011). Os resultados desse estudo mostram que a GSH atuou na proteção da membrana celular, possibilitando a proliferação celular no 7º e 30º dias de cultivo celular. Isso também pode ser observado pela redução de TBARS (7º dia) e nitrito (7º e 30º dias), além do aumento do volume celular nesse mesmo período.

No 1º dia de cultivo celular, sugere-se que a redução da proteção antioxidante pela GSH, quando comparada aos demais dias de cultivo, está associada ao procedimento e período de isolamento celular, como já demonstrado por Bottino et al. (2004) com células de ilhotas pancreáticas, assim como ao período de intenso metabolismo celular pelas CTN para adequação ao meio *in vitro*, que

consequentemente elevam os níveis de fatores endógenos e exógenos, impedindo a atuação da GSH.

Assim como a glutathiona reduzida, a SOD e a CAT são consideradas defesas antioxidantes contra os radicais livres. O aumento de suas respectivas atividades no 7º e 30º dia de cultivo celular quando comparado à quantificação de nitrito, e no 7º dia quando comparado ao nível de TBARS, corrobora com os dados obtidos neste estudo mediante a quantificação de GSH assim como nos estudos de Meister e Anderson (1983), mostrando que atuam de forma conjunta na defesa das células contra agentes prooxidantes.

Entretanto, os antioxidantes GSH, CAT e SOD não atuaram de forma satisfatória no 1º dia de cultivo celular quando os correlacionam aos níveis elevados de TBARS e nitrito. Mas este comportamento não acarretou prejuízos à membrana celular, pois não comprometeu o desenvolvimento celular observado no 7º dia de cultura. Sugere-se que haja mecanismos compensatórios próprio das CTN que atuam também nessa regulação, já que os teores de nitritos foram baixos no 7º e no 30º dias de cultivo celular.

Além disso, Nogueira e colaboradores (2013) afirmaram que o efeito do estresse oxidativo varia entre as células, assim como no meio de cultivo em que estas células estão sendo cultivadas. Diante disso, as células-tronco neurais em estudo, desde o 1º dia ao 30º dia, foram cultivadas sob as mesmas condições em estufa, passando por centrifugações a cada 7 dias de cultura para a troca total do meio de cultura que continha substâncias específicas para o seu desenvolvimento. No 15º dia de cultura, foi realizada a retirada dos fatores de crescimento EGF e FGF. Sugere-se que a ausência desses fatores a partir do 15º dia possa ter alterado o equilíbrio entre prooxidantes e antioxidantes devido à redução do volume celular e ao processo de diferenciação.

4.5 Conclusão

Pode-se concluir que as CTN advindas da região subventricular de encéfalos de ratos foram protegidas do estresse oxidativo pelos sistemas antioxidantes GSH, CAT e SOD, principalmente do 7º dia ao 30º dia, período esse indicado para o uso dessas células na terapia celular. Além disso, o protocolo utilizado para coleta, isolamento e cultivo desse tipo celular proporcionou a obtenção celular desejada

tendo em vista a viabilidade celular obtida no 15^o dia de cultivo, bem como pela capacidade em formar neuroesferas, confirmada por meio da marcação com o anticorpo GFAP e Nestin, que evidenciaram morfologia e características específicas para esse tipo celular. Portanto, a avaliação do estresse oxidativo das culturas de células-tronco neurais foi de extrema importância visto que alterações bioquímicas nas células podem interferir na dinâmica celular e no uso dessas células para finalidades terapêuticas.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI) pelo auxílio bolsa de estudo.

REFERÊNCIAS

ARA, J.; FEKETE, S.; ZHU, A.; FRANK, M. Characterization of neural stem/progenitor cells expressing VEGF and its receptors in the subventricular zone of newborn piglet brain. **Neurochemistry Research**, v. 35, p. 1455-1470, 2010.

AZARI, H; RAHMAN, M; SHARIFIFAR, S; REYNOLDS, B.A. Isolation and expansion of the adult mouse neural stem cells using the neurosphere assay. **Journal of Visualized Experiments**, v. 45, p. 1-4, 2010.

BOKOV, A.; CHAUDHURI, A.; RICHARDSON, A. The role of oxidative damage and stress in aging. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 125, p. 811-826, 2004.

BONNAMAIN, V.; NEVEU, I.; NAVEILHAN, P. Neural stem/progenitor cells as promising candidates for regenerative therapy of the central nervous system. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 6, p. 1-8, 2012.

BOTTINO, R.; BALAMURUGAN, A.N.; TSE, H.; THIRUNAVUKKARASU, C.; GE, X.; PROFOZICH, J.; MILTON, M.; ZIEGENFUSS, A.; TRUCCO, M.; PIGANELLI, J.D. Response of human islets to isolation stress and the effect of antioxidant treatment. **Diabetes**, v. 53, p. 2559-2568, 2004.

CHANCE, B.; MAEHLY, A.C. Assay catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v. 2, p. 764-768, 1955.

DAJAS, F. Life or death: neuroprotective and anticancer effects of quercetin. **Journal Ethnopharmacology**, v. 143, p. 383-396, 2012.

DALLAQUA, B.; DAMASCENO, D.C. Comprovação do efeito antioxidante de plantas medicinais utilizadas no tratamento do Diabetes mellitus em animais: artigo de atualização. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 367-373, 2011.

DASURI, K; ZHANG, L; KELLER, J.N. Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. **Free Radical Biology Medicine**, v. 62, p. 170-185, 2013.

DRAPER, H.H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as an index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 421-431, 1990.

FLOHÉ, L.; OTTING, F. Superoxide dismutase assays. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 93-104, 1984.

GREEN, L.C.; TANNENBAUM, S.R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, p. 56-58, 1981.

Haida, K.S.; BARON, A.; SILVA, F.J.; ARCELES, M.L.; FERNANDES, A.; ANDREAZZA, A.P.; COSTA, J.H.B. Propriedade sequestrante de radicais livres e

determinação do teor de fenólicos totais da sálvia e eucalipto. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 4, p. 61-66, 2011.

HOSSINI, A. M.; MEGGES. M.; PRIGIONE, A.; LICHTNER, B.; TOLIAT, M.R.; WRUCK, W.; SCHRÖTER, F.; NUERNBERG, P.; KROLL, H.; MAKRANTONAKI, E.; ZOUBOULISS, C.C.; ADJAYE, J. Induced pluripotent stem cell-derived neuronal cells from a sporadic Alzheimer's diseases donor as a model for investigating AD-associated gene regulatory networks. **BMC genomics**, v. 16, p. 1-22, 2015.

JANDIAL, R.; SINGED, I.; DUENAS, V.J.; HO, A.L.; LEVY, M.L.; SNYDER, E.Y. Central nervous system repair and stem cells. **International Congress Series**, v. 1302, p. 154-163, 2007.

JIAO, J.; CHEN, D.F. Induction of neurogenesis in nonconventional neurogenic regions of the adult central nervous system by niche astrocyte-produced signals. **Stem Cells**, v. 26, p. 1221-1230, 2008.

KEEFER, C.L.; PANT, D.; BLOMBERG, L.; TALBOT, N.C. Challenges and prospects for the establishment of embryonic stem cell lines of domesticated ungulates. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 147-168, 2007.

LIOCHEV, S.L. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. **Free Radical Biology Medicine**, v. 60, p. 1-4, 2013.

LOBO, M.V.T.; ALONSO, F.J.M.; REDONDO, C.; TOLEDANO, M.A.L.; CASO, E.; HERRANZ, A.S.; PAINO, C.L.; REIMERS, D.; BAZAN, E. Cellular characterization of epidermal growth factor-expanded, free-floating neurospheres. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 51, p. 89-103, 2003.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDAL, R.J. Protein measurement with follin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MARITIM, A.C.; SANDERS, R.A.; WATKINS, J.B.3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 17, p. 24-38, 2003.

MARTIN, L. J.; AL ABDULLA, N. A.; BRAMBRINK, A. M.; KIRSCH, J. R.; SIEBER, F. E.; PORTERA-CAILLIAU, C. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. **Brain Research Bulletin**, v. 46, p. 281-309, 1998.

MEISTER, A.; ANDERSON, M.E.; Glutathione. **Annual Review Biochemistry**, v. 52, p. 711-760, 1983.

MUÑOZ, M.; RODRÍGUEZ, C.; DE FRUTOS, C.; CAAMAÑO, J.N.; DÍEZ, C.; FACAL, N.; GÓMEZ, E. Conventional pluripotency markers are unspecific for bovine embryonic-derived cell-lines. **Theriogenology**, v. 69, p. 1159-1164, 2008.

NOGUEIRA NETO, J.D.; ALMEIDA, A.A.C.; OLIVEIRA, J.S.; SANTOS, O.S.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Efeitos antioxidantes do nerolidol no hipocampo ratos após teste de campo aberto. **Neurochemical Research**, v. 38, p. 1861-1870, 2013.

PEREIRA, A.L.F.; VIDAL, T.F.; CONSTANT, P.B.L. Dietary antioxidants: chemical and biological importance. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 34, p. 231-247, 2009.

POWERS, S.K; CRISWELL, D.; LAWLER, J.; JI, L.L.; MARTIN, D.; HERB, R.A.; DUDLEY, G. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. **American Journal of Physiology**, v. 266, p. 375-80, 1994.

RIBEIRO, A. M. **Aspectos bioquímicos: Envelhecimento cerebral normal e demências**. In FREITAS, S.V.; PY, L.; CANÇADO, F. A. X.; DOLL, J.; GORZONI, M. L.(Eds.). Tratado de Geriatria e Gerontologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 212-223, 2006.

SANTIN, D. M.; NUNEZ, Z. A. G.; MOURA, A. M. M. Brazilian scientific output in stem cells from 2000 till 2013: features and international collaboration. **Revista Eletrônica de Comunicação, Informação & Inovação em Saúde**, v. 9, 2015.

SANZ, A.; CARO, P.; SANCHEZ, J. G.; BARJA, G. Effect of lipid restriction on mitochondrial free radical production and oxidative DNA damage. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1067, p. 200-209, 2006.

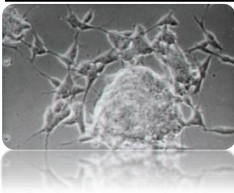
SCHNEIDER, C.D.E.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, p. 87-90, 2004.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1988.

TAKAMORI, Y.; MORI, T.; WAKABAYASHI, T.; NAGASAKA, Y.; MATSUZAKI, T.; YAMADA, H. Nestin-positive microglia in adult rat cerebral cortex. **Brain Research**, v. 1270, p. 10-18, 2009.

VON BORELL, E.H. The biology of stress and its application to livestock housing and transportation assessment. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 260-267, 2001.

WICKENS, A.P. Ageing and the free radical theory. **Respiration Physiology**, v. 128, p. 379-91, 2001.



CAPÍTULO III

5 CAPÍTULO III

POTENCIAL TERAPÊUTICO DAS CÉLULAS-TRONCO NEURAIIS EM TRÊS MODELOS EXPERIMENTAIS DE EPILEPSIA EM RATOS *WISTAR*

Mirna Luciano de Gois da Silva; Maria Acelina Martins de Carvalho

Resumo

A reposição celular por meio das células-tronco neurais vem sendo uma alternativa promissora na terapia das doenças neurodegenerativas. Foi avaliado o potencial terapêutico das células-tronco neurais em modelos experimentais de epilepsia por meio de biomarcadores de estresse oxidativo e avaliação histopatológica. Após 1h das induções epilêpticas por pilocarpina, pentilenotetrazol e picrotoxina, ratos foram infundidos com 2×10^6 células/0,25 mL da cultura, marcadas com Qtracker[®] 655, por veia caudal. No grupo controle não foi induzido epilepsia, mas recebeu a infusão celular sob as mesmas condições dos demais grupos. Após 30 dias, os ratos foram eutanasiados e procedeu-se a remoção do cérebro para avaliação do estresse oxidativo e histopatológico. Os níveis de ácido tiobarbitúrico e nitrito foram elevados nos grupos epilêpticos tratados com neuroesferas, e os níveis de glutathione reduzida, superóxido dismutase e catalase foram reduzidos quando comparados aos grupos não tratados com células-tronco. Na avaliação histopatológica, a distribuição das células-tronco ocorreu por todo o tecido cerebral com células viáveis e em processo de diferenciação no grupo da pilocarpina, mas com diferenciação e regeneração comprometida na epilepsia por picrotoxina. A terapia com células-tronco neurais tem potencial promissor no modelo de epilepsia por pilocarpina, porém nos modelos por pentilenotetrazol e picrotoxina existe um microambiente oxidativo, que pode ter interferido no processo reparador das lesões cerebrais provocadas pela epilepsia.

Palavras-chave: Células-tronco neurais progenitoras; Murino; Neuroesferas; Sistema nervoso central; Terapia celular.

THERAPEUTIC POTENTIAL OF STEM CELLS IN NEURAL EPILEPSY IN THREE MODELS OF EXPERIMENTAL RATS *WISTAR*

Mirna Luciano de Gois da Silva; Maria Acelina Martins de Carvalho

Abstract

The cell replacement through neural stem cells has been a promising alternative for the treatment of neurodegenerative diseases. It was evaluated the therapeutic potential of neural stem cells in experimental models of epilepsy through biomarkers of oxidative stress and histopathological evaluation. After 1h induction of epileptic by pilocarpine, pentylenetetrazol and picrotoxina, rats were treated with 2×10^6 cells/0.25 mL culture, marked with Qtracker[®] 655 by caudal vein. In the control group it was not induced epilepsy, but received cell infusion under the same conditions as other groups. After 30 days, the rats were euthanized and carried by removal of the brain to assess oxidative stress and histopathological. Thiobarbituric acid and nitrite levels were high in epileptic groups treated with neurospheres, and reduced glutathione, superoxide dismutase and catalase were reduced when compared to the groups not treated with stem cells. Histopathological evaluation, the distribution of stem cells occurred throughout the brain tissue with living cells and differentiation process in pilocarpine group, but with differentiation and regeneration committed in epilepsy by picrotoxine. The therapy with neural stem cells has promising potential in epilepsy model by pilocarpine, however the models by pentylenetetrazole and picrotoxine had microenvironment with oxidative stress that may have interfered with the reparative process of brain injuries caused by epilepsy.

Keywords: Cell therapy; Central nervous system; Murine; Neural progenitor stem cells; Neurospheres.

5.1 Introdução

A epilepsia é um conjunto de distúrbios neurológicos que resultam de um elevado número de funções cerebrais desordenadas, sendo caracterizadas por crises recorrentes e espontâneas que, aparecendo subitamente, constituem episódios intermitentes de atividade elétrica excessiva do cérebro acompanhada dos correspondentes sintomas clínicos (VEZZANI; GRANATA, 2005; FABENE et al., 2008). Os breves movimentos involuntários característicos da epilepsia podem afetar apenas uma parte do cérebro ou toda a extensão dos dois hemisférios cerebrais (TRINKA et al., 2015).

As células-tronco neurais apresentam-se como tipos celulares promissores na terapia celular, e especificamente por meio das neuroesferas estão sendo realizados experimentos para análise desse potencial (OTERO et al., 2009; LIMA; GOMES, 2010). Estes corpos esferóides são constituídos por células-tronco progenitoras e células-tronco pluripotentes capazes de autorrenovação e geração de neurônios (ANGHILERI et al., 2008) , células da glia (RADTKE et al., 2009) e oligodendrócitos (KANG et al., 2006).

Considerando as consequências geradas pelo processo epiléptico nos hemisférios cerebrais e a capacidade de autorrenovação das neuroesferas, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial terapêutico das células-tronco neurais em modelos experimentais de epilepsia, por meio de biomarcadores de estresse oxidativo e avaliação histopatológica em tecido cerebral de ratos *Wistar*.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Animais e delineamento experimental

Foram utilizados 32 ratos *Wistar*, 14 machos e 18 fêmeas (250 ± 50 g/2-3 meses) provenientes do Biotério do Centro de Ciências Agrárias - CCA da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Os procedimentos metodológicos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UFPI), sob nº 001/14.

Os animais foram divididos em sete grupos (n=4) contendo animais epilépticos tratados e não tratados com neuroesferas. A indução das convulsões foi realizada

por pilocarpina (400 mg/Kg, i.p) nos grupos A1 e A2 seguindo protocolo Turski e colaboradores (1983), pentilenotetrazol (60 mg/Kg, i.p) nos grupos B1 e B2 conforme Smith; Wilcox; White (2007) e picrotoxina (3 mg/Kg, i.p) nos grupos C1 e C2 seguindo Bum e pesquisadores (2001). Após 1 h da administração do fármaco indutor da crise epiléptica e da observação dos sinais periféricos e colinérgicos dos animais, foi realizada a infusão das neuroesferas (0,25 mL, i.p) em A2, B2 e C2, e nos demais grupos houve a infusão de solução fisiológica (0,25 mL, i.p). No grupo controle (ABC4) não foi induzido a epilepsia, mas foi infundido neuroesferas sob as mesmas condições dos grupos experimentais. Passados 30 dias, os animais foram eutanasiados por tiopental sódico (CHEMIE[®]) dose letal (150 mg/kg/peso corporal, intramuscular) após uma dose com 50 mg/kg/peso corporal de Cetamina (Rhubifarma Pharmaceutical Industry Ltda) associado a 2 mg/kg/peso corporal de Xilazina (Rhubifarma Pharmaceutical Industry Ltda) por via intramuscular.

5.2.2 Isolamento e cultura das CTN

Foram eutanasiados quatro ratos *Wistar* para a coleta, isolamento, cultivo e expansão de células-tronco neurais, no Laboratório de Cultivo de Células-tronco (LABCelt) do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-tronco (NUPCelt) – Universidade Federal do Piauí.

Os procedimentos para obtenção das células seguiu protocolo Azari e colaboradores (2010) com modificações. Foram utilizados 5 mL de tripsina para melhor digestão dos tecidos colhidos. Após 7 min em banho maria foi adicionado igual volume do meio de cultivo DMEM/F-12 para inativação da tripsina. Após centrifugação, o *pellet* foi ressuspensionado em 150 µL de Meio Neural (DMEM/F-12 + GlutaMax[™] Gibco[®] Life Technologies[™], suplemento N-2 (100x Gibco[®] Life Technologies[™]), EGF [20ng/mL] (Gibco[®] Life Technologies[™]), FGF-básico [10ng/mL] (Gibco[®] Life Technologies[™]), heparina sódica 0,2% e penicilina-estreptomicina 10% (Gibco[®] Life Technologies[™]), passando por três centrifugações sucessivas a 110 g por 5 min. O tecido dissociado foi plaqueado em uma garrafa 25 cm² contendo 5 mL de meio neural. As células foram incubadas a 37 °C, 5% CO₂. A troca de meio ocorreu em média a cada 3 dias, sendo monitorado diariamente para a observação da formação de neuroesferas (7 a 15 dias de cultivo celular) pelo

sistema computacional de análise de imagens (LEICA® QWIN D4000, UK-Cambridge).

5.2.3 Rastreamento das células-tronco com Qtracker® 655

A cultura celular com 15 dias de desenvolvimento foi tripsinizada e o *pellet* ressuspenso em 1 mL de meio de cultivo (DMEM/F-12, GIBCO®). A homogeneização dos componentes do Qtracker® 655 foi realizada segundo a especificação do fabricante. As neuroesferas foram adicionadas aos componentes do Qtracker® 655, incubadas em estufa de CO₂ a 37°C por 50 minutos e agitadas no vortex a cada 10 min. Em seguida, foi acrescentado 1 mL de meio DMEM/F-12 e centrifugadas duas vezes, 110 g durante 5 minutos, e o *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de solução fisiológica para posterior infusão animal e rastreamento das neuroesferas por microscopia de fluorescência de cortes parafinados e não corados do encéfalo de ratos.

5.2.4 Infusão das neuroesferas no rato

As neuroesferas foram utilizadas para infusão celular nos modelos experimentais para epilepsia quando atingiram quinze dias de cultivo celular, devido à celularidade e viabilidade de 95%. Para infusão das neuroesferas nos ratos, foram preparadas vinte amostras contendo 2×10^6 de células ressuspendidas em 0,25 mL de solução fisiológica. A contenção mecânica dos animais foi realizada segundo Pereira (2001) com tubos de cloreto de polivinila rígido (PVC) de 60 milímetros de diâmetro acoplado em suas extremidades dois tampões também de PVC de 60 milímetros. Para cada animal dos grupos ABC4, A2, B2 e C2, uma amostra foi infundida via sistêmica pela veia da cauda. Após 30 dias, os ratos foram eutanasiados, conforme procedimento já descrito, para análise do estresse oxidativo (região do hipocampo, córtex frontal e corpo estriado) e histopatológica do encéfalo dos animais.

5.2.5 Determinação do estresse oxidativo

A análise do estresse oxidativo foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental (LAPNEX/UFPI). Foram realizadas as dissecações de áreas encefálicas (hipocampo, córtex frontal e corpo estriado) dos ratos com posterior preparação dos homogenatos (área cerebral + tampão fosfato de sódio pH=7,4) para as dosagens dos testes de estresse oxidativo em espectrofotômetro AJX-3000PC.

A determinação dos conteúdos de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) e nitrito *ex vivo* foram medidos por meio do método Draper e Hadley (1990) e pelo método descrito por Green; Tannenbaum; Goldman (1981), respectivamente.

A atividade do superóxido dismutase (SOD) e catalase *ex vivo* foi determinada por método descrito por Flohé; Otting (1984), e pelo descrito por Chance; Maehly (1955), respectivamente. As concentrações de proteínas totais foram determinadas pelo método Lowry e colaboradores (1951) e os níveis de glutathiona reduzida (GSH) foram detectados conforme método Sedlak; Lindsay (1988).

5.2.6 Avaliação histopatológica

Os hemisférios esquerdos dos encéfalos dos ratos foram fixados em formaldeído a 10% por 24 horas e levados a uma bateria com sequência de álcoois 70, 80, 90 e 100% para desidratação e diafanizados em xilol. Em seguida, foram submetidos a banhos de parafina a 60 °C, e emblocados em parafina. Foram realizados cortes de 5 µm de espessura em micrótomo Leica® para montagem de lâminas e coloração por Hematoxilina-Eosina (HE). As lâminas foram avaliadas histopatologicamente sendo fotografadas por microscopia de luz no Laboratório de Histotécnica (Departamento de Morfologia – CCS – UFPI).

5.2.7 Análises estatísticas

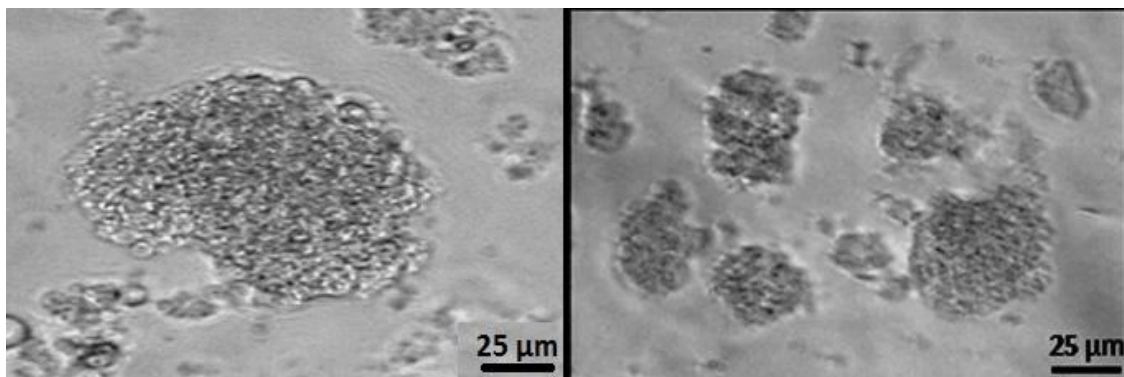
Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) e pelo teste *Student*

Newman Keuls, sendo considerado estatisticamente diferente o valor de $p < 0,05$. Usou-se para essa análise, o *GraphPad Prism*® 6 para Windows.

5.3 Resultados

No cultivo celular das CTN, neuroesferas foram obtidas inicialmente com tamanhos e morfologia variados, tornando-se esféricas a partir do 7º dia, com redução no tamanho e mais densas no 15º dia de cultivo celular, não aderidas ao frasco de cultivo (Figura 1).

Figura 1. Fotomicrografias da cultura celular de neuroesferas isoladas da região subventricular do encéfalo de ratos. A. Formação de neuroesferas com morfologia esférica, 7 dias de cultivo, aumento 20x. B. Neuroesferas com 15 dias de cultivo, aumento 20x.



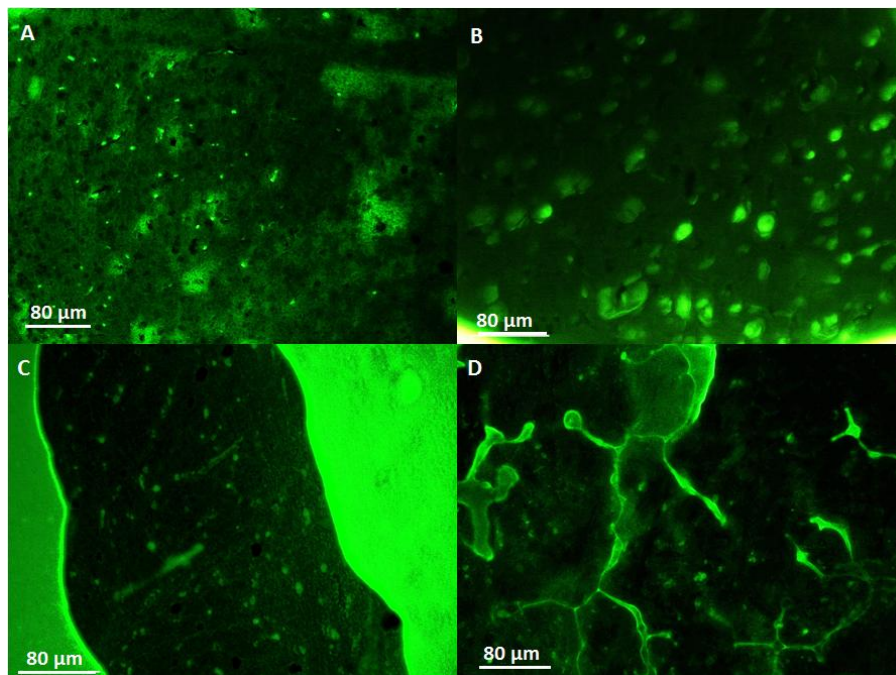
Os fatores EGF e FGF proporcionam a expansão de precursores neurais *in vitro*, semelhante ao que ocorre *ex vivo*. Além disso, no 7º dia de cultura celular houve a formação de aglomerados esféricos difusos e nos dias subsequentes ocorreu aumento na celularidade com aglomerados mais esféricos e densos que atingiram confluência de 95% ao 15º dia de cultivo celular, e com concentração de $2,0 \times 10^6$ em garrafas de 25 cm², quantificadas em câmara de *Neubauer*. Foi observado que o suplemento N-2 conferiu vantagem à proliferação e sobrevivência dos precursores neurais.

Um total de 24 animais recebeu tratamento com PIL, PTZ e PTX. A taxa de mortalidade foi de 8,3% (2/24), sendo animais pertencentes aos grupos tratados com PTX. Além disso, todos os ratos apresentaram sinais colinérgicos periféricos,

movimentos estereotipados, convulsões e estados epilépticos característicos das três fármacos utilizados como modelo experimental.

Quando observadas as lâminas preparadas com cortes histológicos do encéfalo dos animais após 30 dias de infundidas as células pela veia caudal dos ratos, as neuroesferas marcadas com Qtracker® 655 foram rastreadas por sinais fluorescentes nos cortes parafinados em microscopia de fluorescência (Figura 2).

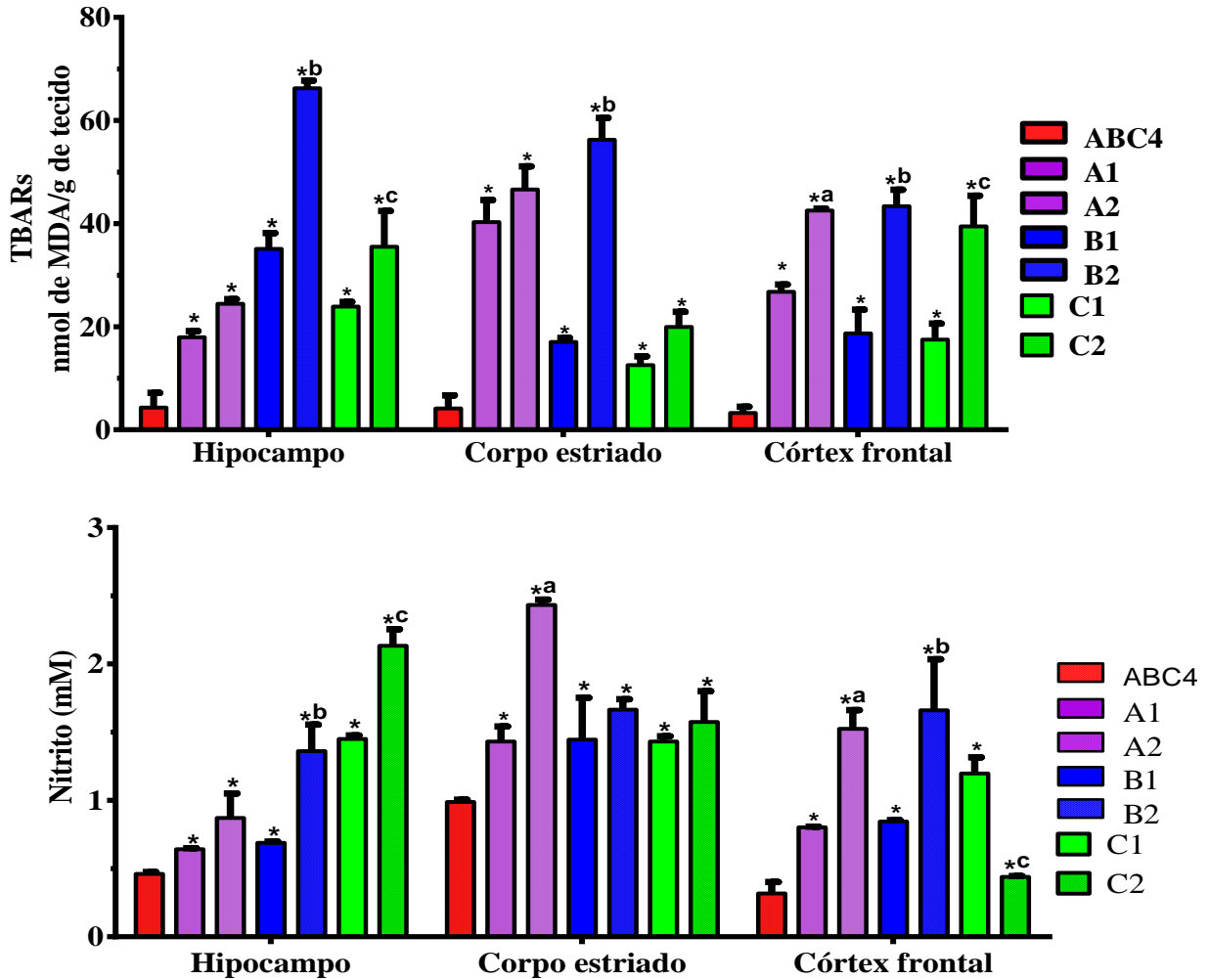
Figura 2. Fotomicrografias do encéfalo de ratos marcadas com Qtracker® 655 em corte parafinado sem coloração, após 30 dias da infusão das neuroesferas.



Legenda: A. grupo ABC4, 20x. B. grupo A2, 20x. C. grupo B2, 20x. D. grupo C2, 20x. ABC4 – Solução fisiológica + Neuroesferas, A2 – Pilocarpina + Neuroesferas, B2 – Pentilenotetrazol + Neuroesferas, C2 – Picrotoxina + Neuroesferas.

Na avaliação do estresse oxidativo, os níveis de TBARS encontrados no hipocampo, corpo estriado e córtex frontal do grupo ABC4 foram de $4,29 \pm 1,29$; $4,13 \pm 1,13$; $3,28 \pm 0,52$ nmol de MDA/g de tecido, e os de íons nitrito foram de $0,46 \pm 0,01$; $0,98 \pm 0,01$; $0,31 \pm 0,08$ mM, respectivamente para as áreas cerebrais mencionadas, sendo observado um aumento destes valores nos grupos de animais com estado epiléptico não tratado e tratado com cultura de neuroesferas ($p < 0,05$) (Figura 3).

Figura 3. Níveis de peroxidação lipídica (TBARS) e de íons nitritos (NO_2^-) no hipocampo, corpo estriado e córtex frontal de ratos com estado epiléptico não tratado e tratado com cultura de neuroesferas. Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de animais usados nos experimentos, $n=4$ por grupo. $^*p<0,05$ versus ABC4 (ANOVA e *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste); $^a p<0,05$ versus A1 (ANOVA e *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste). $^b p<0,05$ versus B1 (ANOVA e *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste). $^c p<0,05$ versus C1 (ANOVA e *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste).



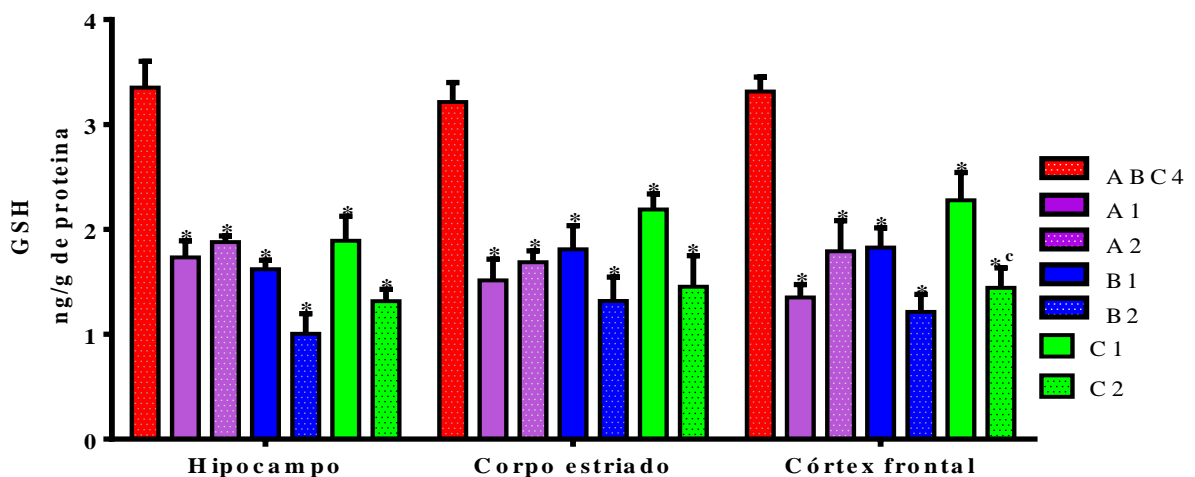
Legenda: ABC4 – Solução fisiológica + Neuroesferas, A1 – Pilocarpina + Solução fisiológica, A2 – Pilocarpina + Neuroesferas, B1 – Pentilenotetrazol + Solução fisiológica, B2 – Pentilenotetrazol + Neuroesferas, C1 – Picrotoxina + Solução fisiológica, C2 – Picrotoxina + Neuroesferas.

Neste estudo, diferenças estatísticas foram observadas para TBARS nos grupos B1 e C1 em relação aos grupos B2 e C2 do hipocampo, respectivamente. No corpo estriado, diferença estatística ($p<0,05$) foi observada apenas entre os grupos B1 e B2. Para os grupos A1, B1 e C1, no córtex frontal foram estatisticamente diferentes ($p<0,05$) em relação aos grupos A2, B2 e C2, respectivamente. Os níveis de íons nitrito, comparando o hipocampo e córtex frontal dos grupos B1 e C1 com

B2 e C2, respectivamente, foram estatisticamente diferente ($p < 0,05$). No corpo estriado, diferenças estatísticas foram observadas apenas entre o resultado do grupo A1 e A2.

Em relação aos níveis de GSH encontrado no hipocampo, corpo estriado e córtex frontal do grupo ABC4 foi registrado $3,35 \pm 0,11$; $3,21 \pm 0,08$; $3,31 \pm 0,06$ ng/g de proteína, sendo observada uma diminuição destes valores nas áreas cerebrais estudadas dos grupos de animais com estado epiléptico não tratado e tratado com cultura de neuroesferas ($p < 0,05$) (Figura 4). Em comparação com os grupos A1, B1 e C1, os níveis de GSH no hipocampo e corpo estriado dos grupos A2, B2 e C2 não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$). No córtex frontal foi observada diferença estatística apenas entre o grupo C1 e C2 ($p < 0,05$).

Figura 4. Atividade antioxidante da GSH (glutathiona reduzida) no hipocampo, corpo estriado e córtex frontal de ratos com estado epiléptico não tratados e tratados com cultura de neuroesferas. Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de animais usados nos experimentos, $n=4$ por grupo. ^a $p < 0,05$ versus ABC4 (ANOVA e *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste); ^b $p < 0,05$ versus A1 (ANOVA e *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste). ^c $p < 0,05$ versus C1 (ANOVA e *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste).

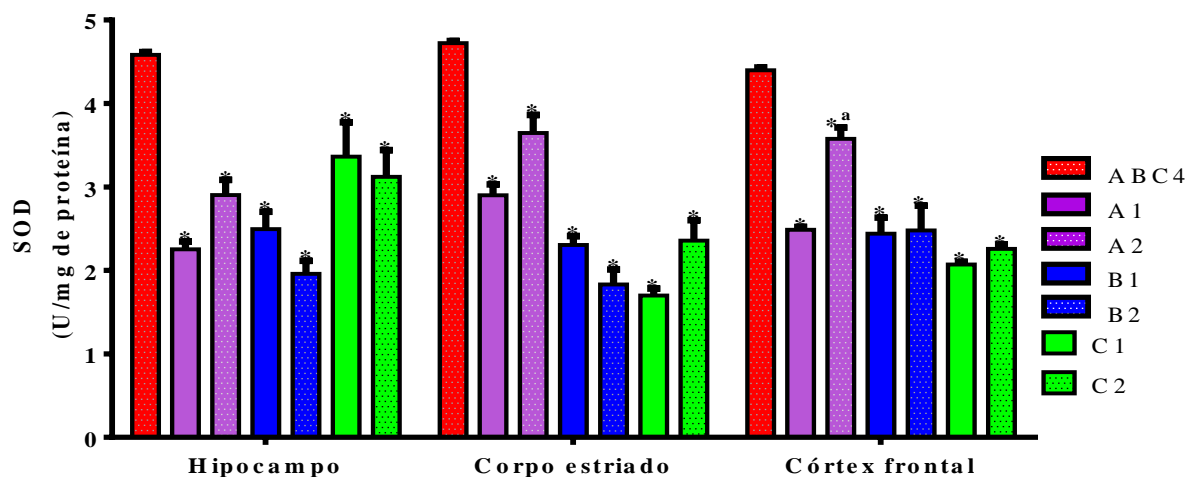


Legenda: ABC4 – Solução fisiológica + Neuroesferas, A1 – Pilocarpina + Solução fisiológica, A2 – Pilocarpina + Neuroesferas, B1 – Pentilenotetrazol + Solução fisiológica, B2 – Pentilenotetrazol + Neuroesferas, C1 – Picrotoxina + Solução fisiológica, C2 – Picrotoxina + Neuroesferas.

Quando mensurado os níveis de SOD nas áreas hipocampo, corpo estriado e córtex frontal do grupo ABC4 foi obtido $4,58 \pm 0,07$; $4,72 \pm 0,02$; $4,39 \pm 0,03$ U/mg de proteína, sendo observado uma diminuição destes valores nas áreas cerebrais

estudadas dos grupos de animais com estado epiléptico não tratado e tratado com cultura de neuroesferas ($p < 0,05$) (Figura 5). Em comparação com os grupos A1, B1 e C1, os níveis de SOD no hipocampo e corpo estriado dos grupos A2, B2 e C2 não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$). Entretanto, no córtex frontal foi observada diferença estatística apenas entre o grupo A1 e A2 ($p < 0,05$).

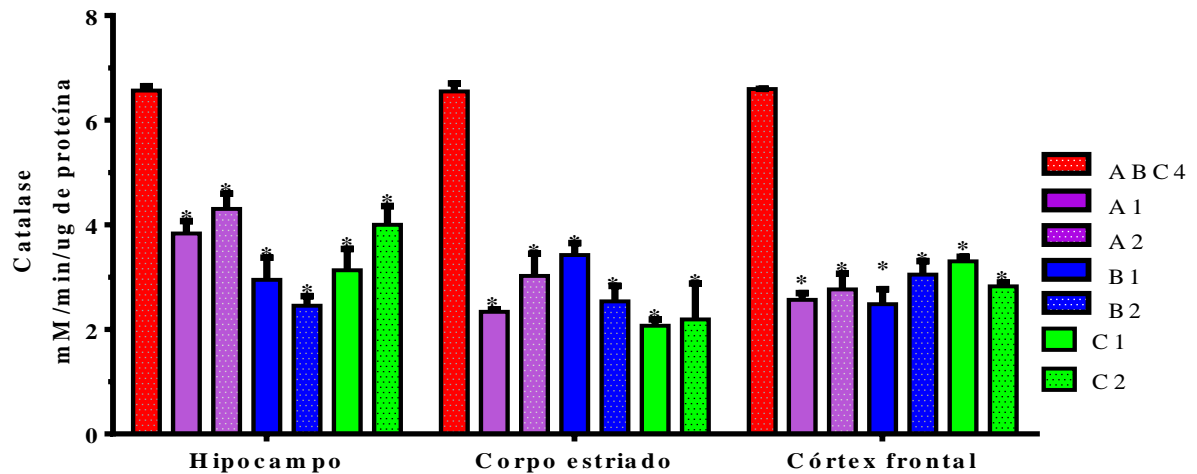
Figura 5. Atividade antioxidante de SOD (superóxido dismutase) no hipocampo, corpo estriado e córtex frontal de ratos com estado epiléptico não tratados e tratados com cultura de neuroesferas. Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de animais usados nos experimentos, $n = 4$ por grupo. ^a $p < 0,05$ versus ABC4 (ANOVA e *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste); ^b $p < 0,05$ versus A1 (ANOVA e *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste). ^c $p < 0,05$ versus B1 (ANOVA e *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste). ^d $p < 0,05$ versus C1 (ANOVA e *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste).



Legenda: ABC4 – Solução fisiológica + Neuroesferas, A1 – Pilocarpina + Solução fisiológica, A2 – Pilocarpina + Neuroesferas, B1 – Pentilenotetrazol + Solução fisiológica, B2 – Pentilenotetrazol + Neuroesferas, C1 – Picrotoxina + Solução fisiológica, C2 – Picrotoxina + Neuroesferas.

Em relação aos níveis de catalase nas áreas cerebrais analisadas do grupo ABC4 foram de $6,56 \pm 0,08$; $6,55 \pm 0,15$; $6,59 \pm 0,01$ mM/min/mg de proteína, sendo observado uma diminuição destes valores nas áreas cerebrais dos grupos de animais com estado epiléptico não tratado e tratado com neuroesferas ($p < 0,05$) (Figura 6). Em comparação com os grupos A1, B1 e C1, os níveis de CAT no hipocampo, corpo estriado e córtex frontal dos grupos A2, B2 e C2 não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$).

Figura 6: Atividade antioxidante de catalase no hipocampo, corpo estriado e córtex frontal de ratos com estado epiléptico não tratado e tratado com cultura de neuroesferas. Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de animais usados nos experimentos, $n = 4$ por grupo. * $p < 0,05$ versus ABC4 (ANOVA e *t-Student-Newman-Keuls* como *post hoc* teste).



Legenda: ABC4 – Solução fisiológica + Neuroesferas, A1 – Pilocarpina + Solução fisiológica, A2 – Pilocarpina + Neuroesferas, B1 – Pentilenotetrazol + Solução fisiológica, B2 – Pentilenotetrazol + Neuroesferas, C1 – Picrotoxina + Solução fisiológica, C2 – Picrotoxina + Neuroesferas.

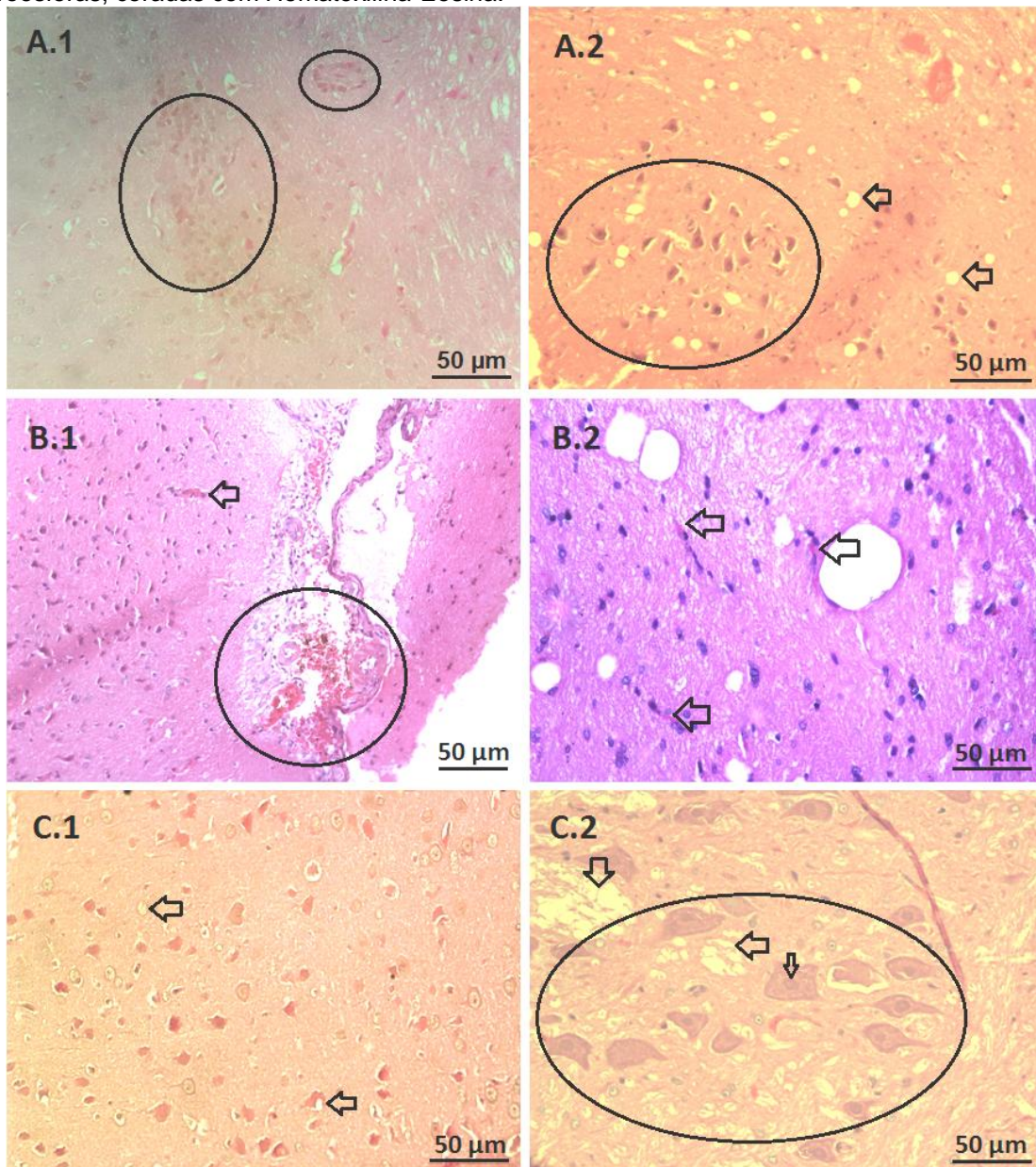
A avaliação histopatológica constatou lesões no tecido cerebral dos ratos induzidos a epilepsia, tanto nos grupos tratados como nos animais não tratados com neuroesferas. De maneira geral, as lesões observadas consistiam em necrose neuronal, áreas multifocais de hemorragia, edema e perda de mielina, exceto no grupo controle, no qual não houve a indução da epilepsia, e as neuroesferas conseguiram se diferenciar e apresentaram alta celularidade.

No grupo ABC4 foi observado a diferenciação das neuroesferas no tecido cerebral, com células apresentando morfologia astrocitóide, além da disposição em aglomerados multifocais dessas células no córtex e no plexo coróide. Ainda, evidenciou-se uma neurópila praticamente íntegra em todo o corte histológico, sendo que o encontro de pequenos focos de vacuolização foi decorrente do processo de autólise pós-morte tecidual, visto que não há comprometimento vascular e processo de gliose (Figura 7A.1; 7A.2).

No grupo A1 os animais apresentaram hemorragia intraparenquimatosa focal e microgliose na região do cerebelo, além de vacuolização de neurópila na substância branca e neurônio em degeneração (isquêmico) (Figura 7B.1; 7B.2). Essas características persistiram no seu grupo comparativo A2, porém a presença de

grandes vacúolos na neurópila foi menos intensa, embora tenham sido observadas áreas de desmielinização com maior número de oligodendrócitos e presença das neuroesferas infundidas, que apresentavam coloração levemente eosinofílica com grande núcleo central e pleomorfismo celular, semelhantes aos astrócitos gemistocíticos e protoplasmáticos (Figura 7C.1; 7C.2).

Figura 7. Fotomicrografias de cortes histológicos do encéfalo de ratos após 30 dias da infusão de neuroesferas, coradas com Hematoxilina-Eosina.

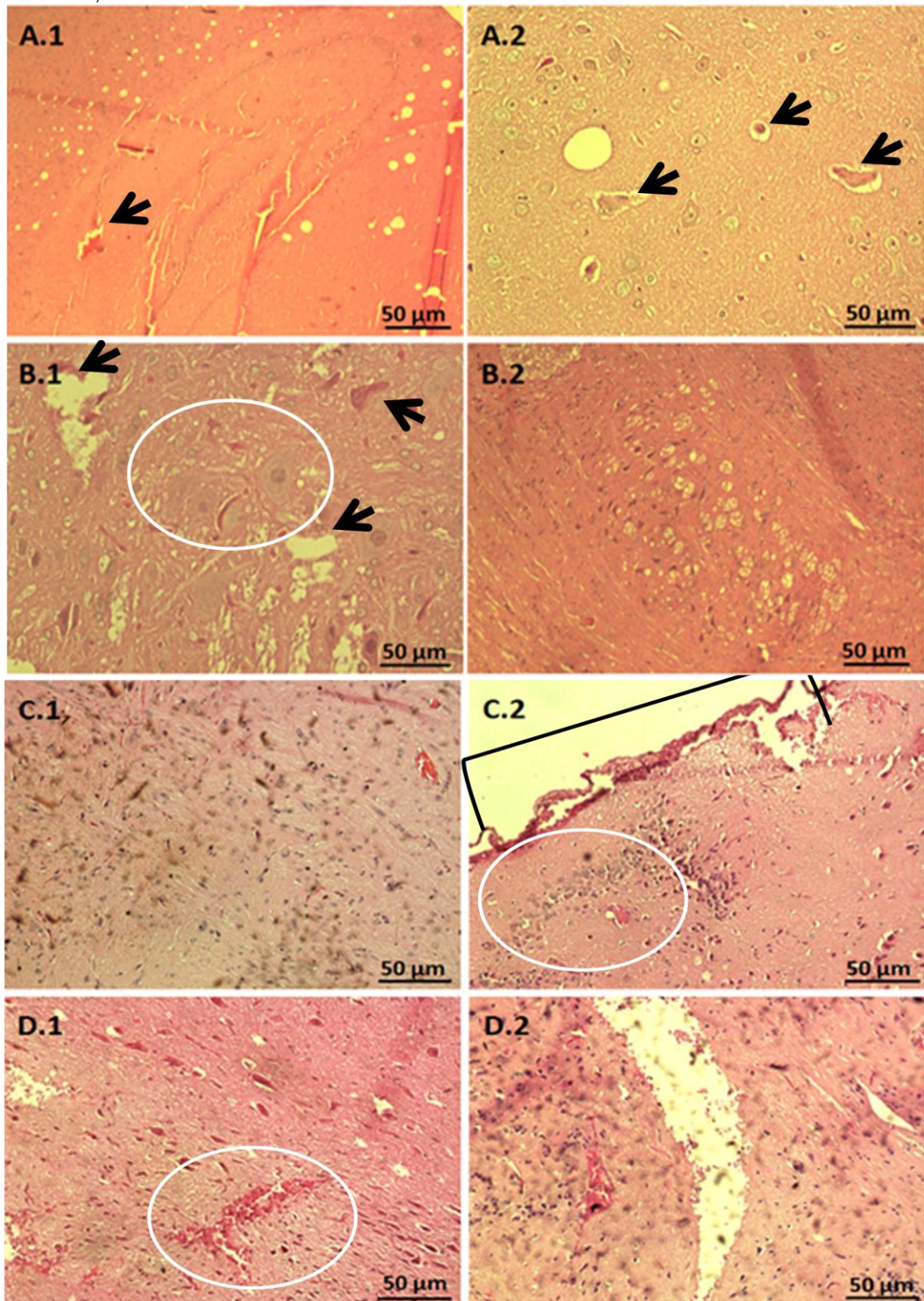


Legenda: A.1. grupo ABC4, 40x, círculo – aglomerados multifocais. A.2. grupo ABC4, 20x, círculo – aglomerados multifocais, setas - vacuolização. B.1 grupo A1, 20x, círculo – hemorragia focal, seta - microgliose. B.2 grupo A1, 40x, seta – microgliose. C.1 grupo A2, 40x, seta – vacúolos. C.2 grupo A2, 40x, círculo – área com neuroesferas, setas larga – desmielinizações, seta estreita – núcleo da célula infundida. ABC4 – Solução fisiológica + Neuroesferas, A1 – Pilocarpina + Solução fisiológica, A2 – Pilocarpina + Neuroesferas.

No grupo epiléptico induzido por PTZ, mas sem tratamento com neuroesferas, foi observado vacuolização da neurópila, tanto da substância branca (indicativo de desmielinização) como na substância cinzenta; congestão passiva e edema do espaço de Virchow-Rubin, além de áreas difusas de hemorragia (Figura 8A.1; 8A.2). O grupo que recebeu a terapia de neuroesferas também apresentou vacuolização e hemorragia na substância branca, assim como em região próxima ao hipocampo, e apesar das células infundidas apresentarem aspectos semelhantes aos astrócitos, o microambiente não foi propício para sua completa diferenciação e se observou células mortas em uma área de necrose de liquefação (Figura 8B.1; 8B.2).

Nos animais do grupo C1 foram observadas perda de mielina em substância branca e proliferação de oligodendrócitos, áreas focais de necrose cortical, presença de grande número de neurônios isquêmicos e astrócitos gemistocíticos, além de hemorragia intraparenquimatosa multifocal (Figura 8C.1; 8C.2). O grupo C2, tratados com neuroesferas, apresentou resultados similares ao grupo C1, com hemorragia intraparenquimatosa bem proeminente e áreas difusas de necrose de liquefação associada à microgliose (Figura 8D.1; 8D.2).

Figura 8. Fotomicrografias de cortes histológicos do encéfalo de ratos após 30 dias da infusão de neuroesferas, coradas com Hematoxilina-Eosina.



Legenda: A.1. grupo B1, 10x, seta – vacuolização de neurópila. A.2. grupo B1, 40x, seta – vacuolização de neurópila. B.1 grupo B2, 40x, seta – vacuolização e hemorragia, círculo – células infundidas. B.2 grupo B2, 20x. C.1 grupo C1, 40x. C.2 grupo C1, 20x, círculo – oligodendrócitos, colchete – hemorragia multifocal. D.1 grupo C2, 40x, círculo - hemorragia. D.2 grupo C2, 20x. B1 – Pentilenotetrazol + Solução fisiológica, B2 – Pentilenotetrazol + Neuroesferas, C1 – Picrotoxina + Solução fisiológica, C2 – Picrotoxina + Neuroesferas.

5.4 Discussão

O sistema nervoso central é mais susceptível aos danos causados pelas espécies reativas de oxigênio ao considerar o seu grande consumo de oxigênio e baixo sistema antioxidante. As principais alterações nos tecidos cerebrais após o processo epiléptico são perda neuronal, gliose e degeneração vacuolar (FREITAS, 2003). A partir da análise dos resultados foram observadas essas alterações neuronais nos animais que tiveram indução de epilepsia pelos três modelos experimentais (pilocarpina, pentilenotetrazol e picrotoxina) tanto nos grupos não tratados como nos tratados com neuroesferas.

Fernandes (2013) afirmou que o desequilíbrio no estado excitação/inibição (glutamato/GABA) provocados por PIL, PTZ e PTX acarretam no influxo de cálcio e bloqueio dos canais de cloreto no tecido cerebral. Freund e colaboradores (1990) observaram que as células gliais não conseguem controlar os níveis elevados de cálcio, deixando os neurônios vulneráveis às convulsões que acarretam lesões do SNC e, conseqüentemente, morte celular. Aliado a isso, durante a fase aguda de convulsões, a elevação nos níveis de peroxidação lipídica e nitrito é citotóxico para neurônios e células da glia, assim como altera a funcionalidade das neuroesferas (FREITAS et al., 2005).

As correlações observadas entre as lesões nos cortes histológicos e os marcadores oxidativos nos permite sugerir que o processo inflamatório mais intenso nos grupos epilépticos com ou sem tratamento com neuroesferas geraram mais peroxidação oxidativa e mais atuação de GSH, SOD e CAT. Freitas e colaboradores (2005) afirmaram que o aumento de espécies reativas de oxigênio e a diminuição nos mecanismos de defesa acarretaram no desenvolvimento da injúria neuronal decorrentes da epilepsia.

Segundo Manna; Valvo; Betto (1999), a GSH atua como primeira linha de defesa antioxidante, pois ela funciona como cofator em reações de desintoxicação, além de ter poder redutor. Em nosso estudo, no grupo experimental de epilepsia por pilocarpina em que houve a infusão das neuroesferas, foi constatada a elevação significativa da GSH e das enzimas SOD e CAT quando comparado ao mesmo grupo que não teve a infusão celular, sugerindo que o sistema antioxidante das neuroesferas possam reduzir danos oxidativos gerados pela epilepsia.

Essa atuação da glutathiona reduzida, assim como de superóxido dismutase e catalase, ocorreu em menor grau nos animais dos grupos B1, B2, C1 e C2, quando comparado aos grupos A1 e A2, pois observou-se a ocorrência de vários vasos congestionados e células degeneradas, pois o estresse oxidativo contribuiu na morte de células neuronais e gliais (ARNAIZ et al., 1998). Conforme Heidari e colaboradores (2006) a PTX produz convulsão tônico-clônica generalizada que pode levar à morte na maioria dos casos, justificando assim, o grau de lesões neuronais provocadas nesses animais.

No grupo A2, apesar da congestão vascular, áreas de desmielinizações e hemorragias, as neuroesferas se mantiveram vivas e algumas em processo de diferenciação, migrando para locais de necrose, corroborando com os resultados obtidos por Carrion; Venturin; DaCosta (2009). Esse fato pode estar relacionado à atuação das enzimas antioxidantes (SOD e CAT) no controle do estresse oxidativo induzido pela pilocarpina, possibilitando um microambiente favorável para a ação das neuroesferas (MCMILLIAN et al., 1994), devido a manterem a integridade da membrana celular, evitando a degradação, dano celular e possível apoptose.

Sugere-se que a formação de radicais livres tenha sido gerada pela dose administrada de PTZ e PTX, pois a mesma pode induzir modificações no fluxo sanguíneo cerebral gerando mudanças na atividade neuronal. Desta forma, o microambiente gerado não foi propício para a completa diferenciação das neuroesferas, acarretando no aumento de áreas multifocais de hemorragia e necrose por todo o tecido. Oliveira e colaboradores (2004) sugeriram que a redução na atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase gere espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que estariam relacionadas ao efeito neurotóxico dos indutores epiléticos.

5.5 Conclusão

A terapia com neuroesferas em modelos experimentais de epilepsia foi verificada por análise do estresse oxidativo e avaliação histopatológica após 30 dias da infusão celular apresentaram potencial promissor no modelo de indução da epilepsia por pilocarpina em ratos, observando que o microambiente proporcionou viabilidade celular e processo de diferenciação às neuroesferas para a reparação das lesões ocasionadas.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI) pelo auxílio bolsa de estudo.

REFERÊNCIAS

ANGHILERI, E.; MARCONI, S.; PIGNATELLI, A.; CIFELLI, P.; GALIE, M.; SBARBATI, A.; KRAMPERA, M.; BELLUZZI, O.; BONETTI, B. Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells Developmental**, v. 17, p. 909-916, 2008.

ARNAIZ, S.L.; TRAVACIO, M.; LLESUY, S.; ARNAIZ, G. Regional vulnerability to oxidative stress in a model of experimental epilepsy. **Neurochemical Research**, v. 23, p. 1477-1483, 1998.

AZARI, H; RAHMAN, M; SHARIFIFAR, S; REYNOLDS, B.A. Isolation and expansion of the adult mouse neural stem cells using the neurosphere assay. **Journal of Visualized Experiments**, v. 45, p. 1-4, 2010.

BUM, E.N.; SCHMUTZ, M.; MEYER, C.; RAKOTONIRINA, A.; BOPELET, M.; PORTET, C.; JEKER, A.; RAKOTONIRINA, S.V.; OLPE, H.R.; HERRLING, P. Anticonvulsant properties of the methanolic extracts of *Cypeus articulatus* (Cyperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 145-150, 2001.

CARRION, M.J.M.; VENTURIN, G.T.; DACOSTA, J.C. Potencial terapêutico das células-tronco de medula óssea no tratamento da epilepsia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 112-119, 2009.

CHANCE, B.; MAEHLY, A.C. Assay catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v. 2, p. 764-768, 1955.

DRAPER, H.H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as an index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 421-431, 1990.

FABENE, P.F.; NAVARRO, M.G.; MARTINELLO, M.; ROSSI, B.; MERIGO, F.; OTTOBONI, L.; BACH, S.; ANGIARI, S.; BENATI, D.; CHAKIR, A.; ZANETTI, L.; SCHIO, F.; OSCULATI, A.; MARZOLA, P.; NICOLATO, E.; HOMEISTER, J.W.; XIA, L.; LOWE, J.B.; MCEVER, R.P.; OSCULATI, F.; SBARBATI, A.; BUTCHER, E.C.; CONSTANTIN, G. A role for leukocyte-endothelial adhesion mechanisms in epilepsy. **Nature Medicine**, v. 14, p. 1377-1383, 2008.

FERNANDES, M.J.S. Epilepsia do lobo temporal: mecanismos e perspectivas. **Estudos Avançados**, v. 27, p. 85-96, 2013.

FLOHE, L.; OTTING, F. Superoxide dismutase assays. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 93-104, 1984.

FREITAS, R.M.; Alterações comportamentais, histopatológicos e neuroquímicas em ratos adultos durante a fase aguda da convulsão induzida por pilocarpina. Fortaleza, 2003 [Dissertação de Mestrado]. Fortaleza: Faculdade de Medicina da UFC, 2003.

FREITAS, R.M.; VASCONCELOS, S.M.M.; SOUZA, F.C.F.; VIANA, G.S.B.; FONTELES, M.M.F. Oxidative stress in the hippocampus after pilocarpina induced status epilepticus in *Wistar* rats. **The FEBS Journal**, v. 272, p. 1307-1312, 2005.

FREUND, T.F.; BUZSÁKI, G.; LEON, A.; BAIMBRIDGE, K.G.; SOMOGYI, P. Relationship of neuronal vulnerability and calcium binding protein immunoreactivity in ischemia. **Experimental Brain Research**, v. 83, p. 55-66, 1990.

GREEN, L.C.; TANNENBAUM, S.R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, p.56-58, 1981.

HEIDARI, M.R.; MANDEGARY, A.; HOSSEINI, A.; VAHEDIAN, M. Anticonvulsant effect of methanolic extract of *Echium amoenum* Fisch and C.A Mey. against seizure induced by picrotoxin in mice. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 9, p. 772-776, 2006.

KANG, S.K.; SHIN, M.J.; JUNG, J.S.; KIM, Y.G.; KIM, C.H. Autologous adipose tissue-derived stromal cells for treatment of spinal cord injury. **Stem Cells and Development**, v. 15, p. 583-594, 2006.

LIMA, S.R.; GOMES, K.B. Esclerose lateral amiotrófica e o tratamento com células-tronco. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, São Paulo, v. 8, p. 531-537, 2010.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDAL, R.J. Protein measurement with follin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MANNA, L.; VALVO, L.; BETTO, P. Fetermination of oxidized and reduced glatathione in pharmaceuticals by reversed-phase high-performance liquid chromatography with dual electrochemical detection. **Journal of Chromatography A**, v. 846, p. 59-64, 1999.

MCMILLIAN, M.K.; THAI, L.; HONG, J-S.; O'CALLAGHAN, J.P.; PENNYPACKER, K.R. Brain injury in a dish: a model for reactive gliosis. **Trends in Neuroscience**, v. 17, p. 138-42, 1994.

OLIVEIRA, M.S.; FURIAN, A.F.; ROYES, L.F.F.; FIGHERA, M.R.; MYSKIW, J.C.; FIORENZA, N.G.; MELLO, C.A. Ascorbate modulates pentylenetetrazol-induced convulsions biphasically. **Neuroscience**, v. 128, p. 721-728, 2004.

OTERO, R.M. GUIMARÃES, A.G.; COELHO, P.M.P.; FREITAS, G.R. Terapia celular no acidente vascular cerebral. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 99-103, 2009.

PEREIRA, C.E.M. Contensor mecânico para ratos. **Acta Cirurgica Brasileira [serial online]**, v. 16, 2001.

RADTKE, C.; SCHMITZ, B.; SPIES, M.; KOCSIS, J.D.; VOGT, P.M. Peripheral glial cell differentiation from neurospheres derived from adipose mesenchymal stem cells. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 27, p. 817-823, 2009.

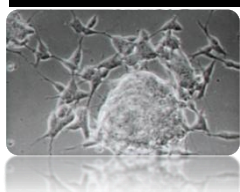
SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1988.

SMITH, M.; WILCOX, K.S.; WHITE, H.S. Discovery of antiepileptic drugs. **Neurotherapeutics**, v. 4, p. 12-17, 2007.

TRINKA, E.; COCK, H.; HESDORFFER, D.; ROSSETTI, A.O.; SCHEFFER, I.E.; SHINNAR, S.; SHORVON, S.; LOWENSTEIN, D.H. A definition and classification of status epilepticus – Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. **Epilepsia**, v. 56, p. 1515-1523, 2015.

TURSKI, W.A.; CAVALHEIRO, E.A.; SCHWARZ, M.; CZUCZWAR, S.J.; KLEINROK, Z.; TURSKI, L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: a behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behavioural Brain Research**, v. 9, p. 315-335, 1983.

VEZZANI, A.; GRANATA, T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. **Epilepsia**, n. 46, p. 1724-1743, 2005.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho demonstrou por meio das análises do estresse oxidativo e histopatológica, o potencial terapêutico das CTN na terapia da epilepsia, contribuindo com o desenvolvimento tecnológico de processos que tratem ou minimizem quadros epiléticos em modelos experimentais.

Em estudo prospectivo sobre a utilização das CTN como terapêutica da epilepsia, foram observados que os pedidos de depósito de patentes e publicação de artigos científicos são reduzidos nessa área, possivelmente refletindo o pouco investimento nacional em pesquisas, inovação e desenvolvimento de tecnologias, aliado aos entraves ético-religiosos nessa temática.

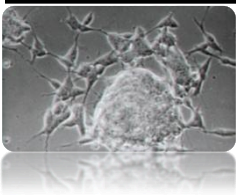
Os protocolos de isolamento e cultivo de células-tronco neurais progenitoras da região subventricular do encéfalo de ratos; de induções da epilepsia pelos fármacos pilocarpina, pentilenotetrazol e picrotoxina; de marcação por Qtracker[®] 655 Cell Labeling Kit das células a serem rastreadas após infusão nos animais; assim como o volume celular empregado na infusão por via sistêmica nos ratos mostraram ser satisfatórios, visto que foram observadas as lesões cerebrais e as neuroesferas nessas regiões por meio da análise histopatológica. Aliado a isso, esses protocolos são práticos e de possível reprodução.

Quanto à análise neuroquímica, os resultados sugerem que a exposição dos animais com epilepsia às neuroesferas, exceto os induzidos por pilocarpina, provocou o aumento de prooxidantes devido a diminuição na atividade das enzimas CAT e SOD que induziu o estresse oxidativo nas áreas cerebrais. Esse fato pode está relacionado à dose do indutor epilético administrada no animal, gerando um microambiente oxidativo e dificultando o desenvolvimento das neuroesferas no encéfalo.

Em relação à análise histopatológica foi observado que geralmente as neuroesferas infundidas migravam para locais de malácia e necrose no encéfalo, conseguindo se diferenciar nos animais epiléticos, principalmente nos induzidos por pilocarpina. Assim, mostrou ser uma estratégia promissora para a melhora ou cura da epilepsia, contribuindo para o desenvolvimento de novos tratamentos alternativos.

Para confirmar a relação entre dose do fármaco indutor de epilepsia e redução do estresse oxidativo nas áreas lesionadas, novos estudos podem contribuir para o

estabelecimento de padrões que melhore as condições do microambiente cerebral e consequentemente intensifique a diferenciação e regeneração das áreas lesionadas no encéfalo de ratos pelas neuroesferas.



ANEXO

Anexo A – Carta de aprovação no Comitê de Ética em Experimentação Animal

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br



Teresina, 31 de Janeiro de 2014.

Ilma.

Profa. Dra. MARIA ACELINA MARTINS DE CARVALHO.
Departamento: Morfofisiologia Veterinária- CCA/ UFPI

Senhora Pesquisadora

Em reunião na presente data (31 de Janeiro de 2014), a Comissão de Ética e Experimentação no Uso de Animais em Pesquisa, da Universidade Federal do Piauí, Analisou e **Aprovou** no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, sob o número **001/14**, o projeto de pesquisa intitulado "**Terapia celular com células-tronco neurais progenitoras no tratamento da epilepsia induzida em modelo experimental murino**", sob a sua responsabilidade. Informamos que no projeto **serão usados 32 Ratos** (14 machos e 18 fêmeas).

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEEA/UFPI, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei Nº11.794, 8 de outubro de 2008).

Atenciosamente,


Profa. **Ivete L. de Mendonça**
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora