

Sandra Gomes Valente

EFEITO DA REPOSIÇÃO HORMONAL NO HIPOCAMPO DE RATAS
ADULTAS CASTRADAS SUBMETIDAS AO MODELO EXPERIMENTAL
DE EPILEPSIA INDUZIDO POR PILOCARPINA

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo - Escola
Paulista de Medicina para
obtenção do Título de Doutor
em Ciências

São Paulo

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Sandra Gomes Valente

EFEITO DA REPOSIÇÃO HORMONAL NO HIPOCAMPO DE RATAS
ADULTAS CASTRADAS SUBMETIDAS AO MODELO EXPERIMENTAL
DE EPILEPSIA INDUZIDO POR PILOCARPINA

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo - Escola
Paulista de Medicina para
obtenção do Título de Doutor
em Ciências

Orientadora: Profa. Dra. Débora Amado Scerni

São Paulo

2005

Valente, Sandra Gomes

Efeito da reposição hormonal no hipocampo de ratas adultas castradas submetidas ao modelo experimental de epilepsia induzido por pilocarpina. -- São Paulo, 2005.136p

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina.

Título em inglês: Effect of hormonal replacement therapy in the hippocampus of the castrated adult female rats in the pilocarpine-induced epilepsy.

1. Pilocarpina 2. Castração 3. 17 β -estradiol 4. Acetato de medroxiprogesterona 5. hipocampo

Esta tese foi realizada na Disciplina de Neurologia Experimental do Departamento de Neurologia e Neurocirurgia da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, durante o curso de pós-graduação em Neurologia, com o auxílio financeiro das entidades CNPq, CAPES, FAPESP, PRONEX E FADA.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE NEUROLOGIA E NEUROCIRURGIA

Chefe de Departamento: Profa. Dra. Débora Amado Scerni

Coordenador do Curso de Pós- Graduação: Prof. Dr. Esper Abrão
Cavalheiro

Sandra Gomes Valente

EFEITO DA REPOSIÇÃO HORMONAL NO HIPOCAMPO DE RATAS
ADULTAS CASTRADAS SUBMETIDAS AO MODELO EXPERIMENTAL
DE EPILEPSIA INDUZIDO POR PILOCARPINA

Presidente da banca: **Profa. Dra. Débora Amado Scerni**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Iscia Teresinha Lopes Cendes

Prof. Dr. Carlos Fernando Mello

Prof. Dr. Luis Eugênio Araújo de Moraes Mello

Prof. Dr. Ivaldo Silva

SUPLENTES

Profa. Dra. Maricília Silva Costa

Prof. Dr. Marcelo Giovedi Funke

Aprovada em: / /

Aos meus pais **Adhemar** e **Shirley**,
pela presença constante, apoio e amor incondicional
em todos os momentos da minha vida.

Obrigada.

Amo vocês.

À Deus, que me proporcionou a vida e que me guia pelos caminhos da fé e acima de tudo, respeito ao próximo.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer em primeiro lugar, aos meus pais, Adhemar e Shirley, que sempre estiveram presentes em todos os momentos da minha vida com exemplos de amor, dedicação e respeito ao próximo.

À minha orientadora Profa. Dra. Débora Amado Scerni, por ter apoiado e acreditado no meu potencial, mostrando cada passo até a conquista de mais um trabalho.

À Profa. Dra. Maria da Graça Naffah-Mazzacoratti que sempre esteve presente, dando conselhos e colaborando com o seu inestimável saber científico.

Ao Prof. Dr. Esper Abrão Cavalheiro que com seu entusiasmo contagia a todos.

Ao Prof. Dr. Vilnei Mattioli Leite pela oportunidade que me deu de seguir na carreira científica, me acolhendo carinhosamente como bióloga de seu laboratório, após o término de mais esta jornada.

À Profa. Dra. Maria José da Silva Fernandes e Profa. Dra. Margareth Rose Priel pela colaboração sempre que necessário.

Aos Profs. Drs. Ricardo Mario Arida e Fúlvio Alexandre Scorza pela amizade e acima de tudo exemplos de vida.

Aos demais docentes dos laboratórios da Disciplina de Neurologia Experimental.

Aos membros do Conselho do Departamento de Neurologia e Neurocirurgia, do qual fiz parte e com quem aprendi muito pela seriedade e dedicação que têm por esta Universidade.

À D. Hilda, que sempre esteve presente nos momentos de alegria e aflição, colaborando em todos eles como profissional e acima de tudo como amiga.

Aos Profs. Drs. Edmund Chada Baracat e Manoel Simões, pelo auxílio e colaboração.

Aos funcionários desta Disciplina que sempre estiveram presentes, dispostos a ajudar.

Aos amigos que passaram por esta Disciplina deixando muita saudade.

Aos amigos que sempre estiveram presentes e que compartilharam todos os momentos desta fase da minha vida. Obrigada pelo apoio e ajuda.

Às funcionárias do laboratório de Endocrinologia, em especial à Walkiria Lopes Miranda, por me receberem com carinho e atenção.

Aos meus irmãos Nilton e Shirlene, por estarem sempre presentes e dispostos a ajudar.

Aos meus sobrinhos Leonardo, Eduardo e Carolina, motivos de orgulho e que sempre estiveram ao meu lado, me fazendo sorrir.

Aos meus cunhados Gerson pela amizade e colaboração e Roseli.

Aos meus amigos Tiago Gurgel e Silvio César Pretti que me auxiliaram na coleta de material e dados.

À minha amiga Marcela Fernandes, minha companheira em muitos trabalhos realizados e muitos que ainda virão.

Aos meus amigos Leonardo C. Faria e Viviane B. Marques, por quem tenho grande carinho e com quem dividi muitos momentos da minha vida.

Aos animais utilizados neste trabalho que deram suas vidas em troca do meu conhecimento. À vocês o meu profundo respeito.

E também ao CAPES (do qual fui bolsista), CNPq, FADA, PRONEX e FAPESP, sem as quais não teríamos auxílio financeiro para desenvolver os trabalhos.

*"De repente, do riso fez o pranto
E das mãos espalmadas fez-se o espanto
De repente, não mais que de repente
Fez-se do triste o que se fez amante
E de sozinho o que se fez contente
Fez-se do próximo o distante
Fez-se da vida uma aventura errante
De repente, não mais que de repente."*

Vinicius de Moraes

ÍNDICE

Dedicatória.....	vii
Agradecimentos.....	ix
Lista de figuras.....	xv
Lista de abreviatura.....	xix
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1 – Epilepsia.....	2
1.2 – <i>status epilepticus</i>	5
1.3 – Modelos experimentais de epilepsia.....	8
1.3.1 – Abrasamento (kindling).....	8
1.3.2 – Ácido Caínico (AK).....	10
1.3.3 – Pilocarpina (PILO).....	11
1.4 – Epilepsia e disfunção hormonal	14
1.5 – Hormônios esteróides e susceptibilidade às crises.....	17
1.5.1 – Envolvimento hormonal através do modelo de epilepsia induzido por pilocarpina.....	18
1.6 – Biossíntese dos hormônios esteróides.....	19
1.7 – Mecanismos de ação dos hormônios esteróides.....	20
1.8 – Estrogênio e sistema nervoso central.....	23
1.8.1 – Receptores de estrogênio no sistema nervoso central.....	26
1.9 – Progestágenos e SNC.....	28
2. OBJETIVOS.....	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 – Animais e grupos de estudo.....	34
3.2 – Castração.....	36
3.3 – Estudo colpocitológico.....	36
3.4 – Administração de pilocarpina.....	37
3.5 – Observação contínua através de sistema de vídeo.....	37
3.6 – Terapia de reposição hormonal.....	38

3.7 – Análise histológica dos cérebros.....	38
3.7.1 – Método de neo-Timm.....	39
3.7.2 – Método de Nissl.....	40
3.8 – Imunohistoquímica.....	40
3.8.1 – Imunohistoquímica “free floating”	41
3.9 – Quantificação celular.....	42
3.9.1 – Quantificação celular em cortes corados com a técnica de Nissl.....	42
3.9.2 – Quantificação celular em cortes corados com a técnica de imunohistoquímica.....	44
3.10 – Quantificação de fibras.....	44
3.11 – Análise estatística.....	46
4. RESULTADOS.....	49
4.1 – Confirmação de atrofia genital após a castração.....	49
4.2 – Análise comportamental após administração de pilocarpina.....	50
4.3 – Frequência de crises.....	51
4.4 – Análise da coloração de neo-Timm.....	53
4.5 – Análise da coloração de Nissl.....	57
4.5.1 – Quantificação celular pela técnica de Nissl.....	61
4.6 – Análise da imunohistoquímica para parvalbumina.....	63
4.6.1 – Quantificação das células marcadas com parvalbumina.....	69
4.6.1.1 - Quantificação celular na camada molecular...72	
4.6.1.2 – Quantificação celular na camada granular.....	74
4.6.1.3 – Quantificação celular no hilo do giro dentado.76	
4.6.2 – Quantificação de fibras reativas à parvalbumina pela técnica de imunohistoquímica.....	78
5. DISCUSSÃO.....	81
6. RESUMO.....	96
7. SUMMARY.....	98
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** - Mecanismos de ação e os efeitos dos esteróides sexuais na excitabilidade neuronal.....23
- TABELA 2** - Representação sumária dos procedimentos efetuados durante o estudo, em todos os grupos.....47
- TABELA 3** - Análise da coloração de neo-Timm, através da escala subjetiva proposta por Holmes e cols., (1999).....57
- TABELA 4** - Representação da imunomarcção das células coradas pela parvalbumina.....69
- TABELA 5** - Representação da imunomarcção das fibras coradas pela parvalbumina.....70
- TABELA 6** - Análise comparativa da imunomarcção das células coradas pela parvalbumina nos animais dos grupos experimentais, com relação aos animais do grupo controle estro.....71
- TABELA 7** - Análise comparativa da imunomarcção das fibras coradas pela parvalbumina nos animais dos grupos experimentais, com relação aos animais do grupo controle estro.....71

TABELA 8 - Densidade de células imunomarcadas pela parvalbumina na camada molecular do giro dentado, entre os animais dos grupos controle.....73

TABELA 9 - Densidade de células imunomarcadas pela parvalbumina na camada granular do giro dentado, entre os animais dos grupos controle.....75

TABELA 10 - Densidade de células imunomarcadas pela parvalbumina no hilo do giro dentado, entre os animais dos grupos controle.....77

TABELA 11 - Densidade de fibras imunomarcadas pela parvalbumina no hilo do giro dentado, entre os animais dos grupos controle.....79

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Representação esquemática da região CA1 do hipocampo que foi dividido em três porções denominadas CA1a, CA1b e CA1c. Foi utilizada para a quantificação celular pela técnica de Nissl a porção CA1b.....43

FIGURA 2 - Representação esquemática da região CA3 do hipocampo onde foi realizada a quantificação celular pela técnica de Nissl.....43

FIGURA 3 - Representação esquemática da região do giro dentado que foi utilizada para a quantificação das células imunomarcadas por parvalbumina.....44

FIGURA 4 - Representação esquemática da região do giro dentado que foi utilizada para a quantificação das fibras imunomarcadas por parvalbumina.45

FIGURA 5 - Gráfico representando a média da frequência semanal de crises nos animais que receberam pilocarpina.....53

FIGURA 6 - Fotomicrografia de corte coronal de hipocampo, corado pela técnica de neo-Timm.....55

FIGURA 7 - Fotomicrografia de corte coronal de hipocampo, na região do giro dentado, corado pela técnica de neo-Timm.....56

FIGURA 8 - Fotomicrografia de corte coronal de hipocampo, na região do giro dentado, corado pela técnica de Nissl.....	59
FIGURA 9 - Fotomicrografia de corte coronal de hipocampo, na região do giro dentado, corado pela técnica de Nissl.....	60
FIGURA 10 - Densidade celular em CA1 e CA3, em cortes corados pela técnica de Nissl.....	62/63
FIGURA 11 - Fotomicrografia de imunomarcção para parvalbumina na formação hipocampal.....	64
FIGURA 12 - Fotomicrografia de imunomarcção para parvalbumina na região CA1 do hipocampo.....	66
FIGURA 13 - Fotomicrografia de imunomarcção para parvalbumina na região CA3 do hipocampo.....	67
FIGURA 14 - Fotomicrografia de imunomarcção para parvalbumina no hilo do giro dentado.....	68
FIGURA 15 - Densidade de células imunomarcadas pela parvalbumina na camada molecular do giro dentado, entre os grupos tratados.....	73
FIGURA 16 - Densidade de células imunomarcadas pela parvalbumina na camada granular do giro dentado, entre os grupos tratados.....	75

FIGURA 17 - Densidade de células imunomarcadas pela parvalbumina no hilo do giro dentado, entre os grupos tratados.....77

FIGURA 18 - Densidade de fibras imunomarcadas pela parvalbumina no hilo do giro dentado, entre os grupos tratados.....79

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC – Complexo Avidina-Biotina
Ach - Acetilcolina
ACTH – Hormônio Adrenocorticotrófico
BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
c DNA – Ácido desoxirribonucléico complementar
CA – Corno de Amon (*cornus Ammonis*)
CA1 – Região 1 do Corno de Amon
CA3 – Região 3 do Corno de Amon
Cl⁻ - Íon Cloreto
cm - centímetro
DAB - Diaminobenzidina
ELT – Epilepsia do Lobo Temporal
ER – Receptor do Estrogênio de Membrana
ER α - Receptor alfa do Estrogênio
ER β - Receptor beta do Estrogênio
g - grama
GABA – Ácido Gama Amino-Butírico
GABA_A – Ácido Gama Amino-Butírico tipo A
GAD – Ácido Glutâmico Descarboxilase
GAP-43 – Proteína de Crescimento Axonal
GLU - Glutamato
GnRH - Hormônio Liberador de Gonadotrofina
h - horas
HCl – Ácido Clorídrico
HRE – Elemento de Resposta Hormônio-Específico
Ig G – Imunoglobulina G
IHQ - Imunohistoquímica
ILAE – International League Against Epilepsy

i.p – intra peritoneal

KA – Ácido Caínico

Kg - kilograma

LH – Hormônio Luteinizante

M - Molar

mg – miligrama

ml - mililitros

mm – milímetros

mm² – milímetros quadrados

NMDA – N-metil-D-aspartato

PBS – Tampão Fosfato Salina

pH – Potencial Hidrogeniônico

PILO – Pilocarpina

PtyP – Proteína Fosforilável no Resíduo de Tirosina

PTZ - Pentilenotetrazol

PV - Parvalbumina

RNA – Ácido Ribonucléico

RNA m – Ácido Ribonucléico Mensageiro

s.c – sub-cutâneo

SE – *status epilepticus*

SNC – Sistema Nervoso Central

°C – graus Celsius

µg – micrograma

µm – micrômetro

µl - microlitro

RESUMO

O modelo experimental de epilepsia, induzido por pilocarpina, em fêmeas inicialmente descrito por Amado e cols., (1993). Após esses achados, vários estudos continuaram a ser efetuados na tentativa de se obter um conhecimento maior do envolvimento hormonal no fenômeno epileptogênico. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo, estudar a função dos hormônios sexuais no modelo de epilepsia induzido por pilocarpina, em ratas castradas. Utilizamos como grupo de estudos: (a) animais controles (estro, metaestro, diestro, proestro e castradas), (b) animais experimentais, que receberam pilocarpina e foram estudados na fase crônica do modelo (intacta crônica e castrada crônica) e (c) animais castrados, que na fase crônica do modelo foram submetidas à terapia de reposição hormonal (castrada crônica tratada com acetato de medroxiprogesterona, castrada crônica tratada com 17β -estradiol e castrada crônica tratada com acetato de medroxiprogesterona + 17β -estradiol. Pudemos verificar que todos os animais castrados tiveram atrofia genital após 4 dias do procedimento cirúrgico. Além disso, todos os animais que receberam pilocarpina apresentaram crises espontâneas e recorrentes na fase crônica. O estudo da distribuição hipocampal de parvalbumina mostrou que a marcação para esta proteína sofre flutuações durante as fases do ciclo estral e apresenta maior marcação no grupo de ratas castradas que receberam acetato de medroxiprogesterona + 17β -estradiol. Em relação à frequência de crises o melhor tratamento após a castração foi aquele onde houve reposição de acetato de medroxiprogesterona + 17β -estradiol. Entretanto, animais que receberam a reposição somente com acetato de medroxiprogesterona também tiveram redução do número de crises. Além disso, o tratamento hormonal também foi capaz de estabilizar o brotamento supragranular

de fibras musgosas, mostrando a importância desses hormônios no desenvolvimento da epilepsia em fêmeas.

1- INTRODUÇÃO

1.1 - EPILEPSIA

O conceito de possessão, "ser tomado subitamente", é o centro da associação histórica entre religião e epilepsia. As culturas da Antigüidade acreditavam que os distúrbios mentais estavam associados a interferências sobrenaturais e na Grécia antiga eram chamadas de "doença sagrada" (CARRAZANA e cols., 1999). Naquela época acreditava-se que os portadores de epilepsia possuíam características espirituais próprias, sendo passíveis de comunicação direta com os deuses (SAVER & RABIN, 1997). O tratamento dava ênfase á medidas dietéticas, além de banhos de imersão e alguns rituais. Apesar deste aspecto eminentemente espiritual, Hipócrates já acreditava em alterações orgânicas, que mais tarde foram associadas à epilepsia. O conceito de cérebro, corpo e mente ainda não havia atingido o estágio de divisão pragmática, que caracterizou os trabalhos de Galeno e Vesálio.

Do ponto de vista semiológico, Hipócrates fez observações quanto à natureza dos "ataques", dividindo-os em dois grupos: aqueles com perda de consciência imediata e aqueles precedidos por auras. Sua idéia de fisiopatologia partia da interação entre corpo e natureza, influência das estações e dos ventos, além do regime alimentar. Em seus trabalhos era contestada a hipótese de uma doença causada pelos deuses (HIPPOCRATES *apud*, 1952).

Os aspectos morfológicos foram descritos por Sommer (1880) que sugeriu que a esclerose hipocampal seria a causa das crises. Neste mesmo ano, Pfleger descreveu que as lesões encontradas no

hipocampo seriam decorrentes de distúrbios circulatórios ou metabólicos locais, relacionados às crises (CENDES & KOBAYASHI, 2000), e o aspecto macroscópico de endurecimento e redução volumétrica das estruturas mesiais do lobo temporal em pacientes portadores de epilepsia foi descrito pela primeira vez por Bouchet & Cazauvieilh (1825).

Epilepsia não é uma doença específica ou uma única síndrome. Compreende uma ampla categoria de sintomas complexos, decorrentes de funções cerebrais alteradas que podem ser secundárias a um grande número de processos patológicos (GUERREIRO e cols., 2000).

Sabe-se que a epilepsia tem múltiplas etiologias. Entre as suas causas podemos citar os tumores, seqüelas de infecções, anormalidades do desenvolvimento cortical, alterações genéticas e distúrbios degenerativos. Admite-se epilepsia como um grupo de doenças que têm em comum crises epilépticas que ocorrem na ausência de condição tóxica-metabólica ou febril.

A classificação das crises baseia-se simplesmente nas características semiológicas dos eventos, os quais deixam de apresentar qualquer conotação anatômica ou fisiopatológica (LÜDER e cols., 1998). Engel (2001), de acordo com a nova proposição do ILAE (Classificação Internacional das Crises Epilépticas) deste mesmo ano, mostra que a classificação passa a ser uma lista dos diferentes tipos de crises que são agora consideradas entidades diagnósticas.

As crises epilépticas podem ser divididas em três subgrupos, considerando: (1) crises isoladas ou auto-limitadas (crises generalizadas ou crises focais), (2) crises contínuas, configurando o *status epilepticus* (*status epilepticus* generalizado ou *status epilepticus* focal) e (3) crises

reflexas onde os fatores precipitantes podem desencadear crises focais ou generalizadas.

Crises epilépticas são eventos clínicos que refletem disfunção temporária de um conjunto de neurônios de parte do cérebro (crises focais) ou de áreas mais extensas envolvendo simultaneamente os dois hemisférios cerebrais (crises generalizadas). Os sintomas de uma crise dependem das partes do cérebro envolvidas na disfunção (GUERREIRO e cols., 2000).

A crise epiléptica é causada por descargas elétricas anormais excessivas e transitórias das células nervosas, resultantes de correntes elétricas que são fruto da movimentação iônica através da membrana celular. Crises epilépticas são sintomas comuns de doenças neurológicas agudas ou secundárias às doenças clínicas como hipoglicemia, hipocalcemia, entre outras, e neste caso, não são consideradas epilepsia (GUERREIRO e cols., 2000).

A forma mais comum de síndrome epiléptica é a epilepsia do lobo temporal (ELT), que atinge cerca de 40% de todos os casos de epilepsia (HAUSER & KURLAND, 1975). A ELT vem sendo reconhecida como uma síndrome específica, devido à sua alta prevalência e à freqüente refratariedade ao tratamento medicamentoso (ENGEL, 1989).

De maneira geral, a ELT se caracteriza pela presença de crises focais, apresentando ou não generalização secundária (SHORVON, 1990). Os principais sintomas são gerados predominantemente pelo acometimento de estruturas mesiais do lobo temporal, sendo esta a forma mais comum de epilepsia em adulto (ENGEL, 1989). A sua origem pode estar ligada a um processo cerebral já cicatrizado ou a uma patologia atual ativa (SHORVON, 1990).

O padrão histológico mais freqüentemente observado em tecidos de pacientes com epilepsia do lobo temporal é a chamada esclerose do Corno de Amon (*cornus Ammonis, CA*), caracterizada por acentuada perda de neurônios piramidais do hipocampo, acompanhada de gliose (WOLF & WIESTLER, 1993).

O aumento da susceptibilidade do tecido nervoso às crises epilépticas tem sido relacionado a uma anormalidade no sistema de neurotransmissão do SNC, através de um aumento na transmissão excitatória, ou por uma diminuição na transmissão inibitória, ou por ambos os mecanismos (MELDRUM, 1984).

Estudos neuropatológicos, realizados em pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial, associada à esclerose hipocampal, têm demonstrado a presença de um brotamento axonal exuberante de circuitos excitatórios e de uma alteração na expressão de receptores glutamatérgicos (BABB e cols., 1989; BABB e cols., 1991; BLUMCKE e cols., 1995; BLUMCKE e cols., 1996; MATHERN e cols., 1996; MATHERN e cols., 1999).

Por outro lado, nas crises epilépticas de origem límbica, a relação entre o ácido gama amino butírico (GABA) e as crises epilépticas já é bastante conhecida. Estudos farmacológicos, bioquímicos e fisiológicos têm detectado evidências de que um aumento da função GABAérgica pode diminuir a susceptibilidade do tecido cerebral às crises. Quando há diminuição dos níveis cerebrais deste neurotransmissor, pode haver um aumento da excitabilidade tecidual, induzindo atividade epiléptica (MELDRUM e cols., 1989; MATHERN e cols., 1995).

1.2 - STATUS EPILEPTICUS

As primeiras descrições de *status epilepticus* foram feitas, provavelmente, em escrituras Babilônicas e datam de 600 - 700aC, em placas denominadas "SAKIKKU", que era a descrição de todas as doenças diagnosticadas na época (LOWENSTEIN, 1999). A frase *état de mal*, a antecessora do termo moderno *status epilepticus*, era utilizada para denominar os pacientes portadores de epilepsia que ficavam internados nos hospitais de Paris e apenas em 1868, Trousseau incluiu as descrições de *status epilepticus* como parte da literatura sobre epilepsia (SHORVON, 1994).

Desiré Bourneville (1876) publicou um artigo em que descrevia as características que retratavam o *status epilepticus* com descrições clínicas detalhadas. Muitas outras descrições surgiram, culminando em uma descrição clínica e patológica do *status epilepticus* por Clark & Prout (1903/04), e que 40 anos mais tarde foi usada por Wilson, que postulou que o *status epilepticus* é uma crise em que "o sono pós-convulsivo de um ataque é rapidamente interrompido pelo desenvolvimento de um próximo" (WILSON, 1940).

A definição oficial do *status epilepticus* foi produto da reunião do "Tenth Marseilles Colloquium" em 1962 e foi adaptada em 1964 pelo mesmo grupo. Segundo a Classificação Internacional das Crises Epilépticas (ILAE), do mesmo ano, ficou postulado que: *status epilepticus* é uma crise que persiste por um período de tempo suficiente ou é repetida suficientemente para produzir uma fixa e durável condição epiléptica" (ILAE, 1964).

Atualmente, *status epilepticus* é definido como uma condição caracterizada por crises de longa duração. É um importante problema clínico (LOWENSTEIN, 1999) e apesar de décadas de pesquisas clínicas e experimentais, tem-se obtido poucos progressos no sentido de prevenir o início do *status epilepticus*, assim como na adequação do tratamento, que nem sempre é bem sucedido, levando este quadro a ser associado as altas taxas de mortalidade e morbidade (DELORENZO e cols., 1987, DELORENZO e cols., 1992).

Para conhecer melhor as alterações causadas por esta condição, muitos modelos experimentais envolvendo a administração de substâncias convulsivantes têm demonstrado que o padrão de lesão cerebral se assemelha àquele encontrado em humanos. Por isso, os modelos de *status epilepticus* em animais são grandes avanços para o entendimento e prevenção das seqüelas neuropatológicas associadas às crises prolongadas (GRUENTHAL, 1998).

Durante o *status epilepticus* ocorrem diversas mudanças na circuitaria cerebral, que seriam responsáveis pelas crises espontâneas recorrentes, que surgem após um período silencioso (livre de crises). Vários fatores parecem estar envolvidos nesta mudança. Sloviter (1991) propôs a hipótese das células em cesto dormentes, sugerindo que uma crise prolongada levaria à morte de células musgosas do hilo do giro dentado, eliminando as aferências excitatórias desses neurônios para as células em cesto (GABAérgicas), que ficariam dormentes, ou seja, sem a ativação mediada pelas células musgosas. Com a perda parcial da inibição, associada às aferências excitatórias, descargas excessivas seriam geradas, levando progressivamente as células do hilo à morte e, em longo prazo, a uma condição epiléptica.

Existe outra hipótese que associa a hiperexcitabilidade, na epilepsia, com a reorganização hipocampal. Assim, os axônios das células granulares do giro dentado emitiriam projeções para o próprio campo de dendritos, fazendo assim um circuito excitatório reverberante. Tanto em animais epiléticos, quanto em pacientes portadores de epilepsia do lobo temporal associada à esclerose hipocampal, existe a presença de um brotamento axonal exuberante de circuitos excitatórios, denominado de brotamento supragranular de fibras musgosas. Este rearranjo seria então, o resultado da eliminação das sinapses decorrentes da morte das células musgosas da região do hilo, que seriam substituídas por axônios das células granulares, que por serem ricas em zinco podem ser visualizadas pelo método de Timm. (TAUCK & NADLER, 1985).

No entanto, a hipótese do brotamento supragranular das fibras musgosas vem sendo contestada. Longo & Mello (1997; 1998) discordam que o brotamento seja o gerador de crises, uma vez que eles inibiram o desenvolvimento do brotamento das fibras musgosas com a administração de cicloheximida (inibidor de síntese protéica) sem inibir o aparecimento das crises epiléticas. Mais recentemente, Williams e cols., (2002), demonstraram que não há o bloqueio do brotamento supragranular das fibras musgosas, nem a remissão das crises epiléticas em animais cuja síntese protéica tenha sido inibida pela cicloheximida, tornando esse assunto bastante polêmico.

Para um melhor entendimento do processo pelo qual a epilepsia se desenvolve, os modelos animais se tornaram indispensáveis, pois mimetizam a epilepsia humana, sendo uma forma rápida e fácil de obter informações relativas à epileptogênese.

1.3 - MODELOS EXPERIMENTAIS DE EPILEPSIA

Os modelos experimentais de epilepsia têm contribuído para um melhor entendimento da fisiopatologia desta síndrome. Desta maneira, aqueles modelos que reproduzem a epilepsia do lobo temporal (ELT) humana são considerados muito úteis. Pesquisas realizadas nesses modelos de ELT fornecem diversos dados comportamentais e eletroencefalográficos, assim como apontam a presença de lesões hipocâmpais, compatíveis com a esclerose mesial observada em humanos (AVANZINI & FARIELLO, 1997; ENGEL, 1996; LOTHMAN e cols., 1995; ISOKAWA, 1997).

Alguns dos modelos experimentais de epilepsia do lobo temporal mais utilizados são o do abrasamento, do ácido cáinico e da pilocarpina.

1.3.1 - ABRASAMENTO (Kindling)

O modelo conhecido como Abrasamento (Kindling), foi descrito por GODDARD (1967) e se assemelha à epilepsia parcial complexa humana. Ele observou que a estimulação elétrica repetitiva e de baixa intensidade, aplicada em certas estruturas cerebrais, levava ao aparecimento progressivo de crises comportamentais e eletrográficas, que crescem em complexidade e se alastram, induzindo crises motoras generalizadas e uma permanente susceptibilidade a crises epilépticas. Este modelo é, sobretudo, um modelo de plasticidade nervosa ligada à epilepsia, que confere grande validade quanto à extrapolação dos

achados em animais, para o ser humano. Os parâmetros de estimulação foram definidos por GODDARD e cols., (1969) e obtenção do abrasamento varia de acordo com as estruturas estimuladas e com a espécie animal.

A evolução do processo de abrasamento segue um padrão característico bem definido e tem sido estudado por diferentes pesquisadores (RACINE, 1978 ; RACINE e cols., 1975). Animais submetidos ao abrasamento podem desenvolver convulsões clônicas com quedas, que duram vários segundos. Em outros, podem aparecer crises espontâneas, mas esse aspecto é muito discutido, considerando-se que essas crises desaparecem após períodos longos sem estimulação elétrica (McNAMARA e cols., 1993). Estudos realizados em animais que foram submetidos ao abrasamento evidenciaram alterações eletrofisiológicas variadas tais como, alterações de circuitos inibitórios (CHAUDIEU e cols.,1987; TUFF e cols.,1983), alterações na expressão e função dos receptores do tipo NMDA (GILBERT, 1988; JONES, 1989), respostas sinápticas anormais (YAMADA, 1991) e alterações nos mecanismos extracelulares de tamponamento de íons potássio extracelular (GEULA e cols., 1988; HEINEMANN e cols.,1990).

As alterações estruturais e funcionais persistem por um longo período e são compatíveis com a epilepsia do lobo temporal (ELT). Porém, essas alterações não são tão evidentes como as observadas em outros modelos de ELT (SUTULA, 1990).

O abrasamento pode também ser obtido através de estimulação química repetida, utilizando-se drogas como fluorotil, pentilenotetrazol (PTZ), lidocaína, cocaína e álcool (PRINCHARD e cols., 1969; MASON & COOPER, 1972).

1.3.2 - ÁCIDO CAÍNICO (AK)

Shinozaki e cols., (1970), estudando os efeitos fisiológicos de certos anti-helmínticos, demonstraram o efeito neurotóxico de um análogo do neurotransmissor glutamato (GLU) no sistema nervoso central (SNC) de mamíferos, principalmente no hipocampo (OLNEY e cols., 1979; COYLE e cols., 1980; FISHER e cols., 1989). O ácido caínico (KA - em japonês - o fantasma do mar), foi isolado da alga *Digenea simplex* (TAKEMOTO, 1978). Posteriormente SHINOZAKI & KONISHI (1970), descreveram o ácido caínico como uma potente neurotoxina, de ação excitatória muito potente, produzindo descargas neuronais prolongadas, que culminam em *status epilepticus* (SE) e é capaz de lesar corpos celulares e dendritos. Apesar da injeção não lesar as fibras de passagem, pode-se observar que são lesados corpos celulares de núcleos cerebrais distantes do local da injeção, que pode ser explicada pela intensa atividade epiléptica (BEN-ARI e cols., 1980). Esta conclusão parte do princípio de que a administração de drogas anticonvulsivantes reduz ou elimina as crises, evitando lesões à distância, sem afetar as lesões locais (BEN-ARI e cols., 1979; BEN-ARI e cols., 1980).

Nadler e cols. (1978) observaram que a injeção intraventricular de ácido caínico produz crises comportamentais, acompanhadas de lesão cerebral, que se assemelha à epilepsia do lobo temporal em humanos. O *status epilepticus* é seguido por um período silencioso, onde a única alteração observada é um comportamento agressivo, com posterior período crônico caracterizado pela presença de crises espontâneas e recorrentes (CAVALHEIRO e cols., 1982).

O dano neuronal induzido pela aplicação sistêmica (BEN ARI e cols., 1981; SPERK e cols., 1983) ou local (BEN ARI, 1978; CAVALHEIRO e cols., 1983) de ácido caínico é mediado por mecanismos excitotóxicos induzidos por ativação de determinados receptores dos aminoácidos excitatórios (COYLE, 1987). Esta ação excitatória também foi verificada por LUCAS & NEWHOUSE (1976). Embora o modelo do ácido caínico tenha sido amplamente utilizado nos últimos anos, sendo considerado um bom modelo de epilepsia do lobo temporal, apresenta limitações pois pode ocorrer remissão das crises espontâneas.

1.3.3 - PILOCARPINA (PILO)

Dentre os modelos de epilepsia, o modelo da pilocarpina tem sido amplamente usado em função da facilidade técnica e, principalmente, pelas semelhanças fisiopatológicas encontradas com a epilepsia do lobo temporal humana.

Desde o início do século passado, neurologistas como, LANGLEY (1901) e LANGLEY & KATO (1915), já admitiam o envolvimento de mecanismos colinérgicos na epilepsia. Mais tarde, na primeira metade do século (SJOSTRAND, 1937; MILLER e cols., 1938; CHATFIELD & DEMPSEY, 1943; BRENNER & MERRITT, 1942) vários autores demonstraram experimentalmente, durante o eletrocorticograma a ação convulsivante da acetilcolina (ACh) e da fisostigmina, um inibidor da acetilcolinesterase, enzima responsável pela hidrólise da acetilcolina. A possível relação da ACh com o fenômeno epiléptico foi confirmada em estudos onde a administração cerebral de ACh, seus análogos e precursores ou inibidores de acetilcolinesterase, resultava em intensa atividade epiléptica (GROSSMAN, 1963; MACLEAN & DELGADO, 1953).

TURSKI e cols., (1983), demonstraram que a pilocarpina, um alcalóide de origem vegetal extraído das folhas do *Pilocarpus pennatifolius* e do *Pilocarpus jaborandi*, age sobre receptores muscarínicos colinérgicos e é um potente agente convulsivante, que após injeção intra-amigdaliana ou sistêmica, em altas doses, provoca lesões por todo o prosencéfalo. Posteriormente, através de injeção sistêmica, foi observado que a pilocarpina resulta em uma série de alterações comportamentais (TURSKI e cols., 1986).

A injeção sistêmica de altas doses de pilocarpina (300 a 380mg/kg) produz alterações comportamentais e eletrográficas, indicativas de atividade epiléptica duradoura, tanto em ratos machos (TURSKI e cols., 1983; LEITE e cols., 1990) quanto em fêmeas normais (AMADO e cols., 1998) e castradas (VALENTE e cols., 2002) e em camundongos (TURSKI e cols., 1984; CAVALHEIRO e cols., 1996).

Imediatamente após a administração deste agonista colinérgico, os animais apresentam automatismos faciais associados à salivação moderada, acinesia e tremores generalizados, que progridem para crises motoras límbicas, onde os animais apresentam salivação intensa, clonia das patas dianteiras e finalmente queda, podendo em alguns casos chegar a crises tônicas. Estas crises límbicas culminam em *status epilepticus* duradouro e ao final deste período, os animais tornam-se irresponsivos aos estímulos ambientais. Estes episódios caracterizam a fase aguda do modelo (TURSKI e cols., 1983).

Leite e cols., (1990) melhor caracterizaram os períodos silencioso e crônico deste modelo. O período silencioso ocorre após a recuperação dos animais e é caracterizado pela ausência de alterações

comportamentais e eletrográficas. Já no período crônico, que se inicia a partir da primeira crise espontânea, se mantém durante toda a vida do animal (LEITE e cols., 1990). As crises da fase crônica se iniciam com automatismos faciais e são seguidas de clonia dos membros anteriores, elevação do corpo com apoio nas patas posteriores e perda de equilíbrio, seguido por crise clônica generalizada, com duração aproximada de 40 a 60 segundos (LEITE e cols., 1990; CAVALHEIRO e cols., 1991).

TURSKI e cols. (1983b) observaram que os animais que apresentaram *status epilepticus* após o tratamento com pilocarpina, apresentaram um padrão de lesão cerebral difusa, provocado pelas crises. Estas lesões resultam em alterações neuropatológicas permanentes, detectáveis no córtex olfatório, complexo amigdalóide, tálamo, substância negra, formação hipocampal e neocórtex. Dentre estas estruturas, o hipocampo é a região cerebral mais sensível aos efeitos neuropatológicos, desencadeados pela ação epileptiforme, resultante da ativação colinérgica (TURSKI e cols., 1986). Foi observada intensa degeneração neuronal nas células piramidais do hipocampo, principalmente em CA1 e CA3 (TURSKI e cols., 1983b). Após o período silencioso, os animais entram na fase crônica, e apresentam extensa degeneração neuronal e intensa proliferação glial. Ocorre o brotamento de axônios das células granulares (fibras musgosas) da camada granular para os neurônios da camada molecular interna do giro dentado, o qual é chamado de brotamento supragranular (MELLO e cols., 1993), formando circuitos reverberantes.

LEMOS & CAVALHEIRO (1992), demonstraram uma correlação entre a duração do SE, perda neuronal no hipocampo e reorganização sináptica com o surgimento de crises espontâneas e recorrentes. Estes

autores demonstraram que era necessário um período de 30 minutos de SE para que houvesse o desenvolvimento de crises recorrentes, na fase crônica. Observaram ainda que a intensidade da reorganização sináptica apresentava relação direta com a frequência de crises espontâneas e, sugeriram que a perda neuronal na região do hilo do giro dentado poderia ser o fator desencadeante do processo de reorganização sináptica das fibras musgosas.

Alterações neuroquímicas puderam ser também observadas durante as fases do modelo. A taxa de utilização de noradrenalina estava aumentada enquanto que a de dopamina estava diminuída nas três fases do modelo (CAVALHEIRO e cols., 1992; CAVALHEIRO e cols.,1994). Os níveis hipocampais de glutamato estavam reduzidos durante a fase aguda sugerindo aumento da liberação deste neurotransmissor. Observou-se aumento na concentração hipocampal de diferentes prostaglandinas (NAFFAH-MAZZACORATTI e cols.,1995) sugerindo aumento de produção do ácido araquidônico e conseqüente alteração na transdução do sinal de membrana. A ação do glutamato sobre o receptor NMDA também promove a produção de GAP-43, que está relacionada com o brotamento supragranular das fibras musgosas, que modificará a plasticidade hipocampal (NAFFAH-MAZZACORATTI e cols., 1999).

Segundo CAVALHEIRO & BENTIVOGLIO (1991), houve diminuição da concentração de calbindina e parvalbumina no hipocampo destes animais durante os períodos silencioso e crônico.

1.4 - EPILEPSIA E DISFUNÇÃO HORMONAL

A incidência de portadores de epilepsia na população geral é bastante elevada, mas com incidência bastante variável nos diferentes países (YACUBIAN, 1999). Considerando a população geral de portadores de epilepsia, destaca-se o contingente feminino, por este apresentar particularidades inerentes ao sexo, tais como o ritmo hormonal cíclico e a gestação (AMADO, 1996). Vários estudos têm indicado uma grande influência dos hormônios sexuais nos fenômenos epiléticos (DIAMANTOPOULOS e col., 1986; HERZOG e col., 1986; ROSCIZEWSKA e col., 1986; WOOLEY e cols. 1992). Em mulheres com epilepsia são comuns as disfunções reprodutivas e distúrbios endócrinos. Fertilidade reduzida (WEBBER e cols., 1986), diminuição do desejo sexual (MORRELL, 1991) e da resposta sexual (MORRELL, 1994) também foram descritas. Estes distúrbios são particularmente comuns em mulheres com epilepsia do lobo temporal (HERZOG, 1989; HERZOG, 1995). Segundo Morrel (1991), a incidência de disfunções sexuais, ocorre entre 14 - 66% dos portadores de epilepsia e na menopausa, cerca de 20% das mulheres apresentam sua primeira crise (MORREL, 1999).

Durante várias décadas tem sido relatado que as crises têm relação com os hormônios e existem relatos sobre os efeitos proconvulsivantes do estrogênio (CRAIG, 1966; BACKSTROM e cols. 1984), enquanto que a progesterona apresenta efeito inibitório sobre a atividade epilética (HALL, 1977). Conseqüentemente, a frequência de crises mostra uma correlação positiva, estatisticamente significativa, entre a razão estradiol/ progesterona plasmática (BACKSTROM, 1976) e varia com as diferenças na secreção endócrina fisiológica, durante as várias fases do ciclo menstrual (LAIDLAW, 1956; KLEIN & HERZOG, 1997). Determinações séricas do hormônio luteinizante (LH) confirmam

alterações na proporção de progesterona (ROSCIZEWSKA e cols., 1985), e levantam a hipótese de que o déficit lúteo poderia ser responsabilizado pelo decréscimo na secreção da progesterona. Soma-se a esses dados, a ocorrência de um maior número de ciclos anovulatórios, detectados pela análise do padrão cito-hormonal dos esfregaços vaginais (ROSCIZEWSKA e cols., 1986; AMADO e cols., 1998). Esse conjunto de observações poderia responder pelo menor índice de fertilidade, encontrado nas mulheres portadoras de epilepsia (GRUDZINSKA e cols., 1979; CUMMINGS e cols., 1995).

Além disso, disfunções endócrinas e reprodutivas, caracterizadas por ciclos anovulatórios são comuns em mulheres com epilepsia, em especial a síndrome do ovário policístico e amenorréia hipotalâmica (HERZOG e cols., 1986). Embora os ciclos anovulatórios não tenham sido relacionados com a frequência de crises, eles foram mais observados em mulheres com epilepsia do lobo temporal do que em mulheres com epilepsia generalizada primária (HERZOG e cols., 1986).

Estudos recentes têm mostrado influências recíprocas entre excitabilidade neuronal e liberação hormonal. Os hormônios reprodutivos podem influenciar a excitabilidade neuronal por mecanismos específicos que alteram o metabolismo celular e a transmissão neural (HERZOG, 1995). Alterações endócrinas e reprodutivas são freqüentemente relatadas na mulher com epilepsia do lobo temporal, assim como em ratas nos diferentes modelos experimentais de crises límbicas. Segundo Edwards e cols., (1999), o estradiol diminui o limiar pós-descarga na amígdala e facilita a aquisição de crises por abrasamento e a progesterona parece ter um efeito inibitório após o aumento do limiar pós-descarga na amígdala e diminui a aquisição de abrasamento.

Muitas investigações sugerem que os hormônios, particularmente os esteróides sexuais, influenciam a probabilidade da expressão de crises. A literatura sobre o efeito dos hormônios na expressão de crises tem sido revista, com particular atenção às alterações estabelecidas na fisiopatologia das epilepsias, desencadeadas por eventos endócrinos tais como o ciclo ovulatório e menstrual, gestação e menopausa (MORRELL, 1992).

Sabe-se que o estradiol aumenta a densidade dos espinhos dendríticos e de sinapses excitatórias nos neurônios piramidais da região CA1 hipocampal (WOOLLEY & McEWEN, 1993; WOOLLEY & McEWEN, 1994), enquanto que a progesterona diminui a densidade de espinhos dendríticos na região CA1 do hipocampo e de sinapses excitatórias (WOOLLEY & McEWEN, 1993). Ou seja, esteróides ovarianos podem alterar a susceptibilidade à atividade epiléptica. O estradiol diminui o limiar para crises convulsivas, enquanto este efeito é revertido pela progesterona (BACKSTROM e cols., 1984; BUTERBAUGH, 1987a, BUTERBAUGH, 1987b, BUTERBAUGH, 1989; HERZOG, 1991).

Durante a década passada, com o avanço da neurociência, foi possível relacionar quais os caminhos levam o estrogênio a interferir nas funções cognitivas das mulheres (SHERWIN, 1996).

O hipocampo é uma estrutura do cérebro que está relacionada com a memória e o aprendizado e contém receptores de estrogênio (PFAFF, 1980). O estrogênio aumenta a colina acetil transferase, uma enzima que sintetiza a acetilcolina, que é um neurotransmissor, que parece ser crítico na aquisição da memória (BARTUS e cols., 1982). Em ratas submetidas á castração bilateral, a densidade de espinhos dendríticos das células piramidais de CA1 do hipocampo sofrem uma diminuição significativa (GOULD e cols., 1990), mas este efeito pode ser

prevenido através de terapia de reposição hormonal com estradiol (SILVA e cols., 2003).

Woolley e cols (1990) descrevem que a densidade de espinhos dendríticos e o número de sinapses em CA1 flutuam durante o ciclo estral normal. Em uma tarde de proestro a densidade de espinhos dendríticos está aumentadas em 30% com relação a uma tarde de estro, 24 horas mais tarde.

1.5 – HORMÔNIOS ESTERÓIDES E SUSCEPTIBILIDADE ÀS CRISES

Já sabemos que os hormônios, particularmente os hormônios esteróides sexuais, influenciam a probabilidade de ocorrência de crises (BEYENBURG e cols., 2001).

Do ponto de vista clínico, o desenvolvimento de certas síndromes epilépticas, como crises de ausência ou epilepsia mioclônica juvenil têm correspondência com alterações no balanço hormonal durante a puberdade (BEYENBURG e cols., 2001).

MORREL (1992, 1999) e HERZOG (1999 b, c) descreveram que, em mulheres, a frequência de crises sofre influências durante vários períodos de sua vida como: puberdade, ciclo menstrual (período pré-menstrual e pré ovulatório), gestação, perimenopausa e menopausa, mas os mecanismos pelos quais os hormônios modulam a vulnerabilidade para as crises ainda não estão bem esclarecidos.

Muitos pesquisadores, há décadas, têm observado que os hormônios esteróides influenciam a frequência de crises. LOGOTHETIS e cols. (1959) observaram o impacto dos estrogênios na exacerbação das crises em mulheres e este dado foi confirmado depois por estudos

experimentais, que o estrogênio tem efeito pró-convulsivante (LOGOTHETIS & HARNER, 1960; STITT & KINNARD, 1968). HERZOG e cols. (1997) observaram que em mulheres há um aumento das crises no período perimenstrual, afirmando a hipótese de que a diminuição fisiológica da progesterona e seus metabólitos exercem efeitos convulsivos e que as crises catameniais podem ser atribuídas às propriedades dos esteróides (REDDY & ROGAWSKI, 2000).

Hoje em dia já se sabe que alterações nas concentrações dos esteróides podem ser responsáveis por alterações de humor, enxaqueca e aumento da vulnerabilidade às crises (BEYENBURG e cols., 2001).

1.5.1 – ENVOLVIMENTO HORMONAL ATRAVÉS DO MODELO DE EPILEPSIA INDUZIDO POR PILOCARPINA

Alguns trabalhos com fêmeas foram importantes para esclarecer o papel do envolvimento dos hormônios sexuais femininos no modelo de epilepsia induzido por pilocarpina. Amado e cols (1993) deram início a este estudo e puderam observar que o rearranjo das eferências contendo GnRH e a perda das suas ramificações terminais podem ocorrer em cérebros epiléticos. As modificações nesta circuitaria hipotalâmica poderia causar as mudanças no ciclo estral, observadas nos animais epiléticos, devido ao envolvimento das vias contendo GnRH nas alterações endócrinas e reprodutivas, também observadas em humanos com epilepsia do lobo temporal. Dando seqüência a esta investigação, AMADO (1996) observou que, após a injeção de pilocarpina há ocorrência de alterações hormonais e estruturais nas gônadas, hipófise e hipotálamo, que contribuem para a seqüência dos eventos epiléticos, que se seguem após a injeção de pilocarpina. Em 1998, AMADO & CAVALHEIRO puderam observar que fêmeas epiléticas

apresentam diminuição na freqüência de crises durante a gestação e lactação. VALENTE e cols (2002) sugeriram que os hormônios reprodutivos femininos podem ter um efeito protetor no SNC, pois a castração facilita o processo epileptogênico. Além disso, em fêmeas epiléticas, que foram castradas, há redução na freqüência de crises, quando as mesmas recebem reposição hormonal de estrogênios conjugados eqüino. Morfologicamente, apresentam um quadro de melhora tanto na diminuição da perda celular como no grau de brotamento de fibras musgosas (PEREIRA Jr, 2001). Outro achado importante é o de que vias intracelulares, relacionadas com a fosfotirosina (PtyP) podem ser moduladas por hormônios sexuais no cérebro de fêmeas durante o *status epilepticus*. Essas alterações também podem acontecer nas diferentes fases do ciclo estral de fêmeas normais, sugerindo que os hormônios sexuais são muito importantes na plasticidade sináptica (SARTORELLI, 2001). Todos estes dados sugerem que os hormônios sexuais femininos têm grande influência, tanto no desenvolvimento do modelo quanto no período crônico do mesmo. Entretanto, muitos esclarecimentos são ainda necessários para a compreensão deste envolvimento.

1.6 - BIOSÍNTESE DOS HORMÔNIOS ESTERÓIDES

Os hormônios esteróides são sintetizados a partir do colesterol por uma série de enzimas, que agem de acordo com a síntese direta de um ou vários esteróides em uma célula. O colesterol é um esteróide que modula a fluidez da membrana dos eucariontes, é transportado por lípidos orgânicos na forma de partículas lipoprotéicas e é precursor das cinco principais classes de hormônios esteróides.

O primeiro estágio na síntese do hormônio esteróide é a formação da pregnenolona, precursora de todos os hormônios esteróides, à partir do hormônio corticotrófico (ACTH), que estimula esta conversão.

A progesterona é sintetizada a partir da pregnenolona. Em seguida são sintetizados cortisol, corticosterona e aldosterona.

A síntese de androgênios começa à partir da progesterona, que é clivada e forma androstenediona, que por sua vez dá origem a testosterona. Os estrogênios são sintetizados a partir dos androgênios, sendo que a estrona deriva da androstenediona e o estradiol é formado a partir da testosterona.

1.7 - MECANISMOS DE AÇÃO DOS HORMÔNIOS ESTERÓIDES

Os hormônios são classicamente definidos como mensageiros químicos que: (1) são secretados no fluxo sanguíneo por glândulas endócrinas, (2) percorrem o corpo através do sistema circulatório, (3) se ligam aos receptores em células alvo específicas, localizadas a alguma distância do seu sítio de secreção, e (4) exercem funções fisiológicas regulatórias sobre essas células alvo.

O estradiol e a progesterona são secretados pelos ovários e são liberados dentro do sistema circulatório. A secreção é controlada por células do hipotálamo e hipófise através de alças de retroalimentação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (WOOLLEY & SCHWARTZKROIN, 1998). Atuam na célula alvo através de difusão pela membrana da célula e se associam às proteínas receptoras específicas, expressas pela célula alvo. As duas vias de ação dos hormônios são: (1) entram na célula, migram para o núcleo e agem como reguladores da transcrição e moduladores da expressão gênica e (2) agem na membrana da célula, regulando diretamente os canais iônicos, dependentes de ligantes (SANTOS, 1991).

Segundo Melcangi & Panzica (2001), o sistema nervoso (central e periférico) tem sido classicamente considerado alvo para os hormônios esteróides produzidos pelas glândulas esteroidogênicas, pois muitas das funções cerebrais parecem ser dependentes da ação destes hormônios. Durante décadas, este mecanismo endócrino clássico tem sido amplificado pelo conceito de que muitos esteróides podem ser sintetizados no sistema nervoso. No entanto, é difícil discriminar os efeitos dos esteróides, sua síntese e a ativação enzimática dos metabólitos dos esteróides circulantes. Muitos pesquisadores têm concentrado atenção para o papel dos esteróides neuroativos associados às disfunções como estresse, envelhecimento e neurodegeneração. Por outro lado, o potencial terapêutico dos esteróides neuroativos como agentes neuroprotetores tem sido avaliado no sistema nervoso central e periférico.

Os esteróides regulam importantes funções neuronais incluindo a organização dos circuitos neurais durante o desenvolvimento e a regulação da organização das sinapses no adulto. Os hormônios esteróides podem promover a sobrevivência e diferenciação dos corpos celulares e células da glia, regulando a sinaptogênese, prevenindo a eliminação de sinapses, induzindo o crescimento axonal e dendrítico, e tem participação durante a regeneração do sistema nervoso (ARNOLD, 1990; JONES, 1994; SCHUMACHER, 1996). Os receptores dos hormônios esteróides são membros de uma grande família de fatores de transcrição nuclear, ativados por ligantes, que incluem os androgênios, estrogênios, glicocorticóides, e receptores de progesterona. A ligação do esteróide resulta na dissociação de "heat-shok protein" (*proteínas que respondem ao calor – proteínas de estresse*), dimerização do receptor e ligação do elemento de resposta hormônio específico (HRE), para produzir um complexo transcricional ativo que induz a ativação ou repressão dos genes alvo. Os receptores esteróides são regulados por fosforilação. Evidências recentes sugerem que a expressão dos receptores de

esteróides pode ser regulada por neurotrofinas, tais como o BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro), e que os esteróides também podem regular a expressão de fatores tróficos e de seus receptores (TORAN-ALLERAND, 1996; HUSSIEN e cols., 1997).

O mecanismo de ação dos esteróides acontece pela modulação da atividade de uma variedade de receptores de neurotransmissores, como do tipo GABA_A, que podem ser modulados positiva ou negativamente (COVEY e cols., 2001), aumentando ou diminuindo a duração e a frequência da abertura dos canais (MELLON e cols., 2001) ou NMDA (N-metil-D-aspartato), agindo em diferentes regiões do receptor e aumentando o cálcio intracelular ou ainda em canais iônicos de superfície, regulando a abertura dos canais de cálcio, e como consequência, aumentando a sua concentração intracelular (MAJEWSKA, 1992; MELLON, 1994; LAMBERT e cols., 1995; JOELS, 1997; RUPPRECHT & HOLSBOER, 1999a, b).

O cérebro não é somente alvo para a ação dos neuroesteróides, ele pode também ser responsável pela indução da síntese de esteróides a partir do colesterol (MELLON e cols., 2001).

No cérebro dos vertebrados, as células da glia são os maiores sítios de formação e metabolismo dos neuroesteróides (BAULIEU, 1998) e recentemente, foi demonstrado que os neurônios também podem sintetizar os esteróides neuroativos (TSUTSUI e cols., 2000).

Os principais mecanismos de ação e os principais efeitos dos esteróides sexuais neuroativos na excitabilidade neuronal foram resumidos por HERZOG (1999b); RUPPRECHT & HOLSBOER (1999a) e MORREL (1999) e são demonstrados a seguir:

	ESTRADIOL	PROGESTERONA
Sítios específicos dos receptores	Primariamente hipotalâmico e límbico	Primariamente hipotalâmico e límbico
Metabólitos ativos no SNC	Catecolestrogênicos*	Alopregnenolona
Modulação dos receptores de membrana	GABA, NMDA, cainato e serotonina	GABA, NMDA, nicotínicos, acetilcolina, glicina, serotonina, cainato, oxitocina e sigma 1
Efeitos na excitabilidade neuronal	<ul style="list-style-type: none"> -inibição da síntese de GABA -diminui o número de subunidades dos receptores GABA_A -induz a formação de espinhos dendríticos -reduz o limiar eletroconvulsivo -cria novos focos epilépticos quando aplicado topicamente -aumenta a severidade e duração das crises induzidas quimicamente -ativa focos epilépticos pré-existent 	<ul style="list-style-type: none"> -aumenta a síntese de GABA -aumenta o número de subunidades do receptor GABA_A -inibe crises induzidas por abstração, lesão focal e retirada do álcool -induz sedação e anestesia

Tabela 1 - Mecanismos de ação e os efeitos dos esteróides sexuais na excitabilidade neuronal (modificado por HERZOG, 1999b; RUPPRECHT & HOLSBOER, 1999a; MORREL, 1999)

*catecolestrogênicos são compostos químicos com duas faces ativas que permitem interação tanto com catecolaminas como na via dos estrogênicos no hipotálamo; modulam a síntese de GnRH, pois altera o tônus noradrenérgico e dopaminérgico; são formados localmente no sistema nervoso central pela hidroxilação dos carbonos 2 e 4 (C2 e C4) do estradiol e podem atuar nos receptores noradrenérgicos, fornecendo uma vasta atuação dos esteróides.

1.8 - ESTROGÊNIO E SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O estrogênio diminui o limiar para as crises, pois potencializa o glutamato e bloqueia a neurotransmissão GABAérgica (SMITH e cols., 1988; SMITH 1989; MURPHY e cols., 1998; WOOLLEY & SCHWARTZKROIN, 1998; WOOLLEY, 1999). Em neurônios hipocampais, potencializa a resposta pós sináptica glutamatérgica (WOOLLEY, 1999), além de agir nos neurônios do sistema límbico (WOOLLEY, 2000).

Estudos clínicos têm descrito um freqüente decréscimo na eficácia cognitiva, incluindo a memória, em mulheres climatéricas (HALBREICH, 1997). A administração de estrogênio melhora as funções cognitivas (CALDWELL & WATSON, 1952; HACKMAN & GALBRAITH, 1977; CAMPBELL & WHITEHEAD, 1977; FEDOR-FREYBERGH, 1977) por exercer um efeito positivo especialmente na aquisição de memória. Isso foi observado pela diminuição do tempo para realização de alguns testes, que um grupo de mulheres, que recebiam reposição hormonal, era submetido (HACKMAN & GALBRAITH, 1977; FEDOR-FREYBERGH, 1977; SHERWIN, 1988; SHERWIN & PHILLIPS, 1990; PHILLIPS & SHERWIN, 1992). Um recente estudo mostra que os estrogênios parecem ser muito ativos no córtex pré-frontal, influenciando funções que são dependentes desta área do cérebro. Em particular, foi demonstrado que, as mulheres que fazem reposição hormonal com estrogênio, têm a capacidade de realizar com mais facilidade os testes de memória verbal e espacial do que as que não usam (DUFF & HAMPSOM, 2000).

O estrogênio age potencializando os efeitos colinérgicos por induzir a síntese e ativação da colina acetil transferase (COYLE e cols., 1983; HENDERSON & BUCHWALTER, 1994; LAWRENCE & SAHAKIAN, 1995). Além disso, parece ser importante na manutenção das projeções colinérgicas dos neurônios do hipocampo e córtex. A terapia de

reposição hormonal com estrogênio pode aumentar o *status* funcional destes neurônios, assim como reduzir os déficits cognitivos associados com a diminuição colinérgica muscarínica. Em humanos, podem atrasar o declínio nas funções basais colinérgicas associada ao envelhecimento e doença de Alzheimer e por meio disso, reduzir o risco e a severidade da demência, relacionada ao Alzheimer em mulheres na pós-menopausa (GIBBS & AGGARWAL, 1998).

Existem numerosos relatos dos efeitos positivos do estrogênio no humor e comportamento de mulheres na pós-menopausa. O estrogênio parece afetar vários sistemas cerebrais por determinar mudanças na concentração local de neurotransmissores (GENAZZANI e cols., 2002). O estrogênio modula os sistemas dopaminérgicos e noradrenérgicos no hipotálamo e regiões extra hipotalâmicas do cérebro, controlando movimento e comportamento, tanto em animais como em humanos (GENAZZANI e cols., 2002). Evidências de que o estrogênio modula o sistema catecolaminérgico surge do fato de que, em ratas, o aumento nos níveis de estrogênio na fase proestro do ciclo estral determina um aumento no "turnover" da norepinefrina e dopamina (ETGEN & KARKANIAS, 1994; ALONSO-SOLEIS e cols., 1996).

A maioria dos estudos mostra que mulheres com depressão climatérica podem se beneficiar da terapia de reposição hormonal com estrogênios conjugados (GENAZZANI e cols., 1989; DITKOFF e cols., 1991; DALY e cols., 1993; LIMOUZIN-LAMOTHE e cols., 1994)

A capacidade do estrogênio em modular os sistemas GABAérgicos no hipotálamo de roedores, foi primeiramente demonstrado por Ondo e cols. (1982). Mais recentemente, papéis similares para o estrogênio na modulação dos sistemas GABAérgicos no hipocampo e no tronco encefálico tem sido descritos (WEILAND, 1992; GRATTAN e cols., 1996; MURPHY e cols., 1998a). Embora muitos estudos têm demonstrado a

habilidade do estrogênio em alterar a frequência das correntes GABAérgicas pós-sinápticas inibitórias (MURPHY e cols., 1998a), outros experimentos têm mostrado que ratas castradas e que recebem subsequente reposição de estrogênio podem alterar as subunidades dos receptores GABA, limitando sua taxa de síntese (WEILAND, 1992; HERBISON e cols., 1995; HERBISON & FÉNELON, 1995; McCARTHY e cols., 1995). No entanto, o crescente número de novos estudos dá suporte ao papel do estrogênio na modulação dos sistemas GABAérgicos no hipotálamo, tronco encefálico e hipocampo, mas poucos estudos têm examinado a associação entre a expressão de receptores de estrogênio e os fenótipos GABAérgicos em outras regiões do cérebro. Com a identificação, em 1996, do receptor beta do estrogênio (ER- β) e a subsequente localização destes receptores no córtex, amígdala, tronco encefálico e regiões hipocampais, envolvidos com a memória e processos altamente cognitivos, a necessidade de identificar os fenótipos destes receptores de estrogênio que as células carregam, tornou-se necessária (KUIPER e cols., 1996; SHUGHRUE e cols., 1997; SHUGHRUE & MERCHENTHALER, 2001).

1.8.1 - RECEPTORES DE ESTROGÊNIO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Os estrogênios são uma importante classe de hormônios esteróides e estão envolvidos em uma série de comportamentos, processos neuroendócrinos e fisiológicos tanto no desenvolvimento quanto em organismos adultos (LI e cols., 1997). O receptor do estrogênio foi clonado na década de 80 por Walter e cols., (1985). Apesar dos dados sugerirem a existência de um receptor de membrana para o estrogênio (ER) (PAPPAS e cols., 1994) e isoformas do receptor do estrogênio (denominado ER- α) terem sido isoladas (SHUPNIK e cols., 1989; SKIPPER e cols., 1993), tem sido aceito que o ER- α foi o receptor de estrogênio primário, responsável por muitas das suas ações. Recentemente, um

segundo cDNA do receptor de estrogênio (ER- β) foi clonado e seqüenciado (KUIPER e cols., 1996; MOSELMAN e cols., 1996). Expressão do RNAm dos receptores de estrogênio α e β em tecido de rato revelam um amplo grau de sobreposições na distribuição destes dois genes (KUIPER e cols., 1997). Além disso, a hibridização *in situ* revela uma abundante expressão de RNAm do ER- β no hipotálamo (SHUGHRUE e cols., 1996). Muitas destas regiões hipotalâmicas também contém RNAm do ER- α (CINTRA e cols., 1986; SIMERLY e cols., 1990). Apesar da presença do RNAm sugerir que o ER- β é produzido por neurônios nestas áreas, isto é essencial para determinar onde e quando a proteína ER- β é expressa (LI e cols., 1997).

Dando suporte às evidências da modulação das funções GABAérgicas pelo estrogênio, Blurton-Jones & Tuszynski (2002) testaram a hipótese de que os

ER- β no córtex, amígdala, tronco encefálico e formação hipocampal são expressos nos interneurônios GABAérgicos. Estudos anteriores identificaram receptores alfa do estrogênio (ER- α) nos interneurônios GABAérgicos do hipotálamo de roedores e primatas (FLÜGGE e cols., 1986; THIND & GOLDSMITH, 1997). Mais recentemente, Hart e cols., (2001), por meio de imunoreatividade determinaram a co-localização dos ER- α e GAD no hipocampo dorsal de roedores adultos. No entanto, poucos estudos têm examinado a relação entre os sistemas GABAérgicos e a expressão de ER- β . Portanto, Blurton-Jones & Tuszynski (2002), examinaram a co-localização dos ER- β com a proteína ligante de cálcio associada ao GABA, a parvalbumina (PV).

Muitos estudos mostram que a PV é especificamente localizada em uma grande parte dos interneurônios GABAérgicos do córtex cerebral, amígdala, tronco encefálico e hipocampo (CELIO, 1986; KOSAKA e cols.,

1987; FREUND & ANTAL, 1988; HENDRY e cols., 1989; REN, 1991; KEMPPAINEN & PITKÄNEN, 2000; WOUTERLOOD e cols., 2000). Estes estudos têm demonstrado que cerca de 94 - 100% dos neurônios que expressam PV nestas regiões, co-expressam GABA. Célio (1986) mostrou que no córtex cerebral, 70% dos neurônios GABAérgicos expressam PV, sugerindo que as células imunorreativas a PV representam uma grande parte dos neurônios corticais GABAérgicos.

Blurton-Jones & Tuszynski (2002), utilizaram a PV para marcar os neurônios GABAérgicos de algumas regiões. Mas é importante notar, porém, que apesar da co-localização com PV em algumas regiões poder sugerir o fenótipo GABAérgico, a falta dessa co-localização não significa que não há o fenótipo GABAérgico. Outras subpopulações de células GABAérgicas têm sido identificadas, mas não pela expressão de PV, mas de calbindina ou calretinina, duas outras proteínas ligantes de cálcio (BAIMBRIDGE & MILLER, 1982; KEMPPAINEN & PITKÄNEN, 2000; WOUTERLOOD e cols., 2000).

1.9 - PROGESTÁGENOS E SNC

O efeito anticonvulsivante da progesterona tem sido observado em diversos modelos de epilepsia agudos e crônicos (JOELS, 1997; BACKSTROM & ROSCISZEWSKA, 1997; HERZOG, 1999b). Além disso, a progesterona pode ser convertida em alopregnenolona, um composto altamente neuroativo (LEPHART, 1993; MENSAH-NYAGAN e cols., 1999; STOFFEL-WAGNER e cols., 2000), que parece ser um agente anticonvulsivante mais potente do que a própria progesterona (LANDGREN e cols., 1987; FRYE, 1995; KOKATE e cols., 1999), agindo como

um potente modulador alostérico positivo do complexo receptor GABA_A (LEPHART, 1993).

A descoberta de que a facilitação ou inibição da neurotransmissão mediada pelo GABA resulta em efeitos contrários (como anticonvulsivante vs convulsivante, respectivamente), determina um importante "insight" sobre a fisiologia e farmacologia da transmissão GABAérgica central. A caracterização de sítios de alta afinidade dos moduladores alostéricos positivos e negativos dos receptores GABA_A sugerem que estes canais permeáveis ao Cl⁻, contribuem diretamente não apenas na farmacologia, mas também na fisiopatologia de uma variedade de doenças neurológicas e psiquiátricas, que são associadas às mudanças no estado emocional, padrão de sono ou excitabilidade neuronal (FOLLESA e cols., 2001).

O mecanismo molecular básico da interação da alopregnenolona e outros esteróides neuroativos sintéticos com o complexo receptor GABA_A e conseqüente intensificação das correntes de Cl⁻ induzidas pelo GABA tem sido caracterizado (MAJEWSKA e cols., 1986; LAMBERT e cols., 1995; RUPPRECHT e cols., 1999; BIGGIO e cols., 2000). Por isso, a propriedade anticonvulsivante da progesterona é atribuída aos seus metabólitos (BILTRAN e cols., 1993; FREEMAN e cols., 1993; BILTRAN e cols., 1995; PICAZO & FERNANDEZ-GUASTI, 1995; KOKATE e cols., 1999; REDDY & ROGAWSKI, 2000).

Muitos trabalhos moleculares, neuroquímicos e neurofarmacológicos verificaram que as flutuações nas concentrações de progesterona no plasma ou cérebro modulam comportamentos afetivos e emocionais. Mudanças na produção periférica ou central de progesterona têm sido detectadas durante condições fisiológicas como o estresse, gestação, ciclo menstrual e menopausa e pode regular as mudanças na função e plasticidade do receptor GABA_A, bem como

nas alterações comportamentais associadas a estas condições (BARBACCIA e cols., 1996; BARBACCIA e cols., 1997; BICIKOVA e cols., 1998; CONCAS e cols., 1998; BIGGIO e cols., 2000; SERRA e cols., 2000). Além disso, a progesterona e a alopregnenolona também podem ser importantes em uma variedade de distúrbios neurológicos e psiquiátricos, caracterizados pelas mudanças no padrão de sono e excitabilidade neuronal. A concentração de alopregnenolona no plasma ou líquido de indivíduos com depressão mostra-se diminuído (ROMEO e cols., 1998; UZUNOVA e cols., 1998; STRÖHLE e cols., 1999). Flutuações nas secreções de progesterona e alopregnenolona são provavelmente um importante determinante da expressão do gene e função do receptor GABA_A.

A utilização em longo prazo de progesterona e alopregnenolona reduzem os níveis de expressão de várias subunidades do receptor GABA_A, ao passo que a descontinuação da utilização induz um efeito contrário (SMITH e cols., 1998; FOLLESA e cols., 2000).

Em mulheres com o útero intacto que fazem terapia de reposição hormonal, a administração de progestagênios é necessária para contrabalançar a ação do estrogênio no endométrio. A progestina usada na terapia de reposição hormonal pode derivar da progesterona. Os derivados de progesterona mais comumente usados são acetatos de ciproterona, medroxiprogesterona, medrogestona, dihidrogesterona. A progesterona e seus derivados têm efeitos opostos aos do estrogênio, tendo um efeito depressor do sistema nervoso central. A ação depressora da progesterona provavelmente se deve pela atividade de metabólitos como a pregnenolona e alopregnenolona, que podem ser formados sistemicamente ou localmente pela progesterona (KARAVOLAS e cols., 1979) ou pelo colesterol (BARNES e cols., 1990). A depressão do humor pela progestina tem sido demonstrada clinicamente, onde se tem usado diferentes

combinações de estrogênios e progestinas como, estrogênios conjugados eqüino e acetato de medroxiprogesterona (SHERWIN, 1991). Em ratas castradas, a administração de acetato de noretisterona ou norgestimato aumenta a β -endorfina hipotalâmica circulante, enquanto que o acetato de medroxiprogesterona não induz mudanças significantes (GENAZZANI e cols., 1990; SPEROFF e cols., 1995), sugerindo que certos progestagênios podem influenciar o efeito dos estrogênios (GENAZZANI e cols., 1989; GENAZZANI e cols., 1990).

A progestina pode influenciar negativamente o humor por aumentar a ação inibitória do GABA pela diminuição da excitabilidade cerebral (HOLZBAUER & YODIN, 1973; BEER & BILLINGHAM, 1979).

Sabendo-se que existe uma correlação positiva entre os hormônios esteróides e o sistema nervoso central, este trabalho se faz importante para a verificação dos efeitos da reposição hormonal no modelo de epilepsia induzido por pilocarpina, uma vez que este mimetiza a epilepsia do lobo temporal em humanos.

2 - OBJETIVO

Esse trabalho tem como objetivo principal estudar a função dos hormônios sexuais em ratas epiléticas. Para tanto, será utilizado o modelo experimental de epilepsia induzido por pilocarpina em ratas castradas. Esses animais serão avaliados quanto aos efeitos de diferentes terapias de reposição hormonal, durante a fase crônica do modelo.

Serão avaliados diversos parâmetros como:

- (a) Resposta à castração, através da confirmação de atrofia genital após o procedimento cirúrgico.
- (b) Frequência de crises no período crônico antes e durante a terapia de reposição hormonal.
- (c) Análise morfológica do cérebro quanto ao possível efeito protetor dos esteróides contra os danos causados *pelo status epilepticus*.
- (d) Análise da expressão de receptores de parvalbumina no hipocampo das ratas.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

Os protocolos experimentais utilizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Paulo / Universidade Federal de São Paulo, processo nº1237/00. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento do animal, de acordo com a International Ethical Guidelines (CIOMS/OMS, 1985).

3.1 – ANIMAIS E GRUPOS DE ESTUDO:

Foram utilizadas ratas da raça Wistar albinas adultas pesando 200-250g mantidas em condições controladas com ciclo claro/escuro (12/12h), temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$, com livre acesso à água e ração por todo o período do experimento.

Os animais foram divididos com relação aos diferentes tratamentos que receberam:

a) Animais controles:

Ratas em diferentes fases do ciclo estral e ratas castradas. Ambos os grupos receberam solução salina e foram divididos em:

GRUPO CONTROLE 1 - ratas em ESTRO (E) - n=10;

GRUPO CONTROLE 2 - ratas em METAESTRO (M) - n=10;

GRUPO CONTROLE 3 - ratas em DIESTRO (D) - n=10;

GRUPO CONTROLE 4 - ratas em PROESTRO (P) - n=10;

GRUPO CONTROLE 5 - ratas castradas. Este grupo foi utilizado como controle da castração (CX) - n=10;

b) Animais experimentais:

Todos os animais foram submetidos ao modelo de epilepsia induzido por pilocarpina, desenvolveram *status epilepticus*, fase silenciosa e foram estudados na fase crônica.

GRUPO EXPERIMENTAL 1 - ratas na fase estro que receberam pilocarpina 4% (CRON) - n=10;

GRUPO EXPERIMENTAL 2 - ratas castradas que receberam pilocarpina 4%, quatro dias após o procedimento cirúrgico (CX+CRON) - n=10;

c) Animais com reposição hormonal

Com o objetivo de estudar a influência da terapia de reposição hormonal sobre a frequência de crises em ratas epiléticas, os grupos foram divididos em:

GRUPO EXPERIMENTAL 3 - ratas castradas que receberam pilocarpina 4%, quatro dias após o procedimento cirúrgico. Neste grupo foi feita reposição hormonal de acetato de medroxiprogesterona (2 mg/Kg) por via oral (CX+CRON+AMP) - n=10;

GRUPO EXPERIMENTAL 4 - ratas castradas que receberam pilocarpina 4%, quatro dias após o procedimento cirúrgico. Neste grupo foi feita reposição hormonal de 17 β -estradiol (30 μ g/kg) por via oral (CX+CRON+E2) - n=10;

GRUPO EXPERIMENTAL 5 - ratas castradas que receberam pilocarpina 4%, quatro dias após o procedimento cirúrgico. Neste grupo foi feita reposição hormonal de 17 β -estradiol (30 μ g/kg) + acetato de medroxiprogesterona (2mg/ml), por via oral (CX+CRON+E2+AMP) - n=10;

3.2 - CASTRAÇÃO:

Os animais foram anestesiados com thionembutal, (50mg/Kg, i.p.). Foi feita tricotomia no dorso do animal, seguido de assepsia local com povidine tópico e posterior incisão longitudinal, seguida de pequenas incisões na musculatura dorsal, lateralmente. Com o auxílio de uma pinça, os ovários foram identificados e ressecados por cauterização. Após este procedimento, a musculatura foi aproximada com fio categute simples 4-0 e a pele suturada com fio de nylon 3-0. Todo o material utilizado para o procedimento cirúrgico foi submetido à esterilização.

3.3 – ESTUDO COLPOCITOLÓGICO:

Todos os animais estudados neste trabalho foram submetidos ao exame colpocitológico para verificação da fase do ciclo estral. Nos animais que foram castrados foi feito exame colpocitológico para verificação da fase do ciclo estral e posterior verificação de atrofia genital. O conteúdo do conduto vaginal foi obtido por meio da introdução de conta gotas atraumático contendo solução salina que por meio de sucção se mistura ao material vaginal a ser examinado. A solução aspirada foi colocada sobre lâminas de vidro e observada em microscópio óptico à fresco.

A verificação do ciclo estral foi feita diariamente e após 3 ciclos regulares consecutivos as ratas foram utilizadas.

A avaliação da castração foi feita no quarto dia após o procedimento cirúrgico, para verificar se a retirada dos ovários foi efetiva. O padrão de leitura para atrofia genital (confirmação da castração) apresenta padrão similar à fase diestro do ciclo estral, onde se pode observar a presença quase que exclusiva de leucócitos.

3.4 – ADMINISTRAÇÃO DE PILOCARPINA:

Foi administrada pilocarpina 4% (PILO, Sigma, St Louis, MILLSTONE), (350mg/Kg, i.p.) para a indução de *status epilepticus*. Metilescopolamina (Sigma, 1mg/Kg, s.c) foi administrada 30 minutos antes da PILO para prevenir efeitos colinérgicos periféricos. Os animais castrados foram injetados após confirmação da atrofia genital e os não castrados, na fase estro do ciclo. Nos animais dos grupos controle, a PILO foi substituída por solução salina.

3.5 – OBSERVAÇÃO CONTÍNUA ATRAVÉS DE SISTEMA DE VÍDEO:

Após a injeção de pilocarpina e a recuperação dos animais, eles foram colocados em gaiolas individuais, mantidas em condições controladas com ciclo claro/escuro (12/12h), temperatura de 21°C, com livre acesso à água e comida.

Após a primeira crise espontânea, os animais foram observados por 30 dias. Foi iniciada, a terapia de reposição hormonal e observação por mais 30 dias. A observação foi realizada por 24h/dia de filmagem em sistema de vídeo-monitoração "Stellate system", em sala com ciclo claro-

escuro, sendo que no período escuro, os animais eram mantidos sob luz infravermelha, para possibilitar a visualização das crises.

3.6 – TERAPIA DE REPOSIÇÃO HORMONAL:

Os animais foram submetidos à terapia de reposição hormonal por via oral, diariamente, entre as 10:00 -11:00h da manhã, com o auxílio de uma agulha de gavagem acoplada em uma seringa de plástico descartável, que foi introduzida na boca do animal até atingir o estômago, onde o conteúdo foi injetado. Esta técnica foi utilizada para que não existisse a possibilidade de variação na dose diária.

3.7 – ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS CÉREBROS:

Ao término do período de observação (60 dias), 5/10 animais de cada grupo foram perfundidos e os cérebros retirados para posterior análise histológica através dos métodos de neo-Timm e Nissl.

Os animais foram anestesiados com thionembutal (50 mg/Kg, i.p.) e sacrificados por perfusão transcardíaca. Foi feita uma abertura na caixa torácica do animal para ser possível a exposição do coração. O ventrículo esquerdo então foi puncionado com uma agulha e as soluções infundidas foram drenadas através de uma secção do átrio direito.

Na primeira fase da perfusão os animais receberam solução de sulfeto de sódio 0.1%, seguida por solução fixadora de glutaraldeído 3%. Todas as soluções foram preparadas em solução tamponada (pH = 7.4). A infusão foi feita com o auxílio de uma bomba de perfusão. Em seguida, os cérebros foram retirados da caixa craniana com o auxílio de uma

goiva, e colocados em solução de sulfeto de sódio 0.1%, por 6 horas. Decorrido este período, foram colocados em solução crioprotetora de sacarose 30%. Os cérebros foram, então, cortados de forma seriada em secções de 20 e 40 µm de espessura em criostato. Estes cortes foram submetidos a estudo histológico por duas diferentes técnicas de coloração, descritas a seguir.

3.7.1 – MÉTODO DE NEO-TIMM:

Esta é uma modificação do tradicional método de Timm (SLOVITER, 1982), que intensifica a coloração específica de zinco, produzindo melhor visualização das fibras musgosas, permitindo fácil observação da reorganização sináptica.

Depois que os cortes de 40 µm de espessura foram montados em lâminas gelatinizadas, procedeu-se a revelação em câmara escura, onde foram imersos em uma solução reveladora à 26°C. Esta solução consiste em 240ml de goma arábica; 9,4g de citrato de sódio; 10,2g de ácido cítrico mono hidratado; 6,8g de hidroquinona e 425mg de nitrato de prata, dissolvidos em 165ml de água destilada.

Os cortes assim corados foram classificados de acordo com a escala subjetiva utilizada por Holmes e cols (1999), que aplica escala de 0-V para o brotamento de fibras musgosas supragranulares:

GRAU 0 - ausência de grânulos na região supragranular;

GRAU I – grânulos ocasionais e esparsos na região supragranular de distribuição;

GRAU II – Numerosos grânulos, distribuídos descontinuamente na região supragranular;

GRAU III - Grânulos de distribuição quase contínua na região supragranular;

GRAU IV - Densa faixa de grânulos dispostos continuamente na região supragranular ou quase contínuos; e

GRAU V - Densa banda de grânulos, laminar e contínua que rodeia toda região supragranular.

3.7.2 - MÉTODO DE NISSL:

O cresil violeta é um corante básico utilizado para evidenciar o citoplasma de neurônios. O citoplasma contém várias estruturas, inclusive os corpúsculos de Nissl (ou substância de Nissl). Esses corpúsculos são compostos, basicamente, por RNA. Essa coloração serve como indicador da viabilidade neuronal pois, quando ocorre uma lesão neuronal, esses corpúsculos podem desaparecer. Esse fenômeno é conhecido por "cromatólise".

Os cortes de 20 μ m foram recuperados em lâminas e corados com cresil violeta (técnica de Nissl), que consiste na desidratação dos cortes em banhos sucessivos de álcool em concentração decrescente, seguida da imersão em solução de cresil de violeta (0.5%) dissolvida em solução de acetato tamponado em pH 3.8. Imediatamente após, os cortes foram desidratados em diferentes concentrações de álcool, clarificados com xilol e montados com laminula com o auxílio de entellan.

3.8 – IMUNOHISTOQUÍMICA

Ao término do período de observação (60 dias), 5/10 animais de cada grupo foram perfundidos e os cérebros retirados para posterior análise histológica através da técnica de imunohistoquímica.

Os animais foram anestesiados com thionembital (50 mg/kg, i.p.) e sacrificados por perfusão transcardíaca. Foi feita uma abertura na caixa torácica do animal para ser possível a exposição do coração. O ventrículo esquerdo então foi puncionado com uma agulha e as soluções infundidas foram drenadas através de uma secção do átrio direito.

Na primeira fase da perfusão os animais receberam tampão fosfato salina (PBS), seguida por solução fixadora de paraformaldeído 4%. Todas as soluções foram preparadas em solução tamponada (pH = 7.4). A infusão foi feita com o auxílio de uma bomba de perfusão.

Em seguida, os cérebros foram retirados da caixa craniana com o auxílio de uma goiva, e colocados em solução de paraformaldeído 4%, por 6 horas. Os cérebros foram, então, cortados de forma seriada em secções de 50 µm de espessura em vibrátomo.

A imunohistoquímica é uma técnica que permite localizar receptores e proteínas celulares, e pode ser realizada de várias maneiras. Neste caso, foi utilizado o protocolo para a técnica com os cortes em "free floating".

3.8.1 - IMUNOHISTOQUÍMICA "free floating"

As fatias selecionadas foram lavadas três vezes em PBS. Após este procedimento, as fatias foram embebidas em solução de peróxido de hidrogênio 0.1% por 10 minutos para bloquear a atividade das peroxidases endógenas. Em seguida, as fatias foram incubadas em solução de soro albumina bovina 10% durante 90 minutos e mantidas à temperatura ambiente, para evitar a ligação entre os anticorpos e antígenos inespecíficos. Imediatamente após este procedimento, as fatias foram incubadas em solução de anticorpo primário (anti-parvalbumina) na concentração de 1:10 000, contendo albumina bovina 2%, sendo mantidas nesta solução "overnight" à temperatura de 4°C. Posteriormente, as fatias foram colocadas em solução contendo o anticorpo secundário (anti-mouse IgG) por um período de 90 minutos, e a seguir no ABC por 90 minutos.

Para visualizar a presença do anticorpo, as fatias foram reveladas com o cromógeno diaminobenzidina (DAB) 0.06% em tris HCl 0.05M pH 7.4 e peróxido de hidrogênio (1µl/ml). A seguir, as fatias foram montadas em lâminas gelatinizadas, desidratadas com o uso de álcool etílico absoluto, diafinizadas com xilol e cobertas com lamínulas, após a colocação de entellan. Após este procedimento, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico para visualização da expressão da marcação.

Em todos os ensaios, as fatias dos cérebros dos animais dos grupos experimentais, foram processadas juntamente com uma fatia do animal do grupo controle estro (E). Este procedimento é utilizado para posterior

comparação do padrão de marcação, evitando assim que seja feita análise inespecífica da imunomarcação.

3.9 – QUANTIFICAÇÃO CELULAR

A quantificação celular é um método pelo qual é possível verificar a perda neuronal, resultado de uma lesão cerebral, em diferentes técnicas histológicas.

3.9.1 - QUANTIFICAÇÃO CELULAR EM CORTES CORADOS COM A TÉCNICA DE NISSL

Seis cortes adjacentes (20 μm) de cérebros, corados com a técnica de Nissl foram utilizados, por animal. Foram analisadas as regiões CA1 e CA3 do corno de Amon, de ambos os hipocampos, seguindo as coordenadas estereotáticas (-3,3/-3,8 mm do Bregma).

A região CA1 foi dividida em três porções, denominadas (a), (b) e (c), e a porção (b) foi analisada (**FIGURA 1**). Na região CA3, foi analisada a porção média. A área analisada envolve 0,5 mm², o que corresponde ao aumento de 10X (**FIGURA 2**).

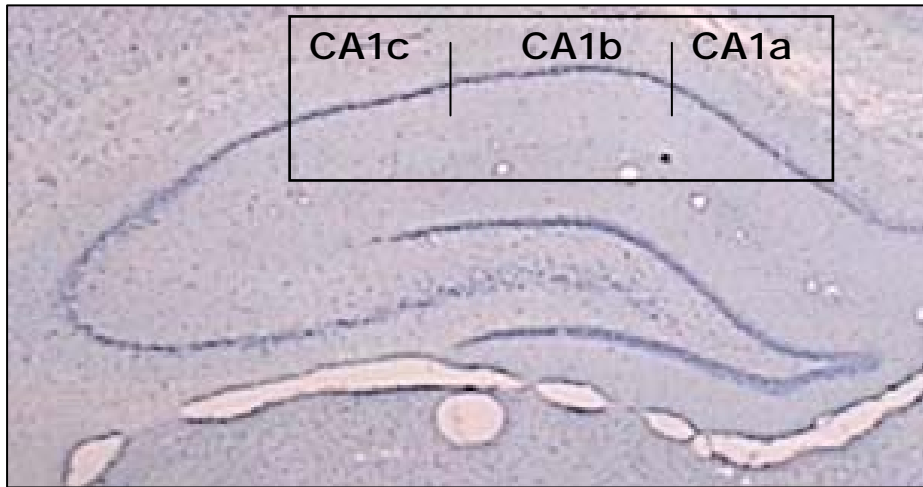


FIGURA 1 - Representação esquemática da região CA1 do hipocampo que foi dividido em três porções denominadas CA1a, CA1b e CA1c. Foi utilizada para a quantificação celular pela técnica de Nissl a porção CA1b.



FIGURA 2 - Representação esquemática da região CA3 do hipocampo onde foi realizada a quantificação celular pela técnica de Nissl.

3.9.2 - QUANTIFICAÇÃO CELULAR EM CORTES CORADOS COM A TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA

Seis cortes adjacentes de cérebros de espessura de 50 μm , imunomarcados para parvalbumina, foram utilizados por animal. Foi analisada a região do giro dentado de ambos os hipocampos, seguindo as coordenadas estereotáxicas (-3,3/-3,8 mm do Bregma) (**FIGURA 3**).

Todas as células presentes nas camadas molecular, granular e hilar do giro dentado foram consideradas.

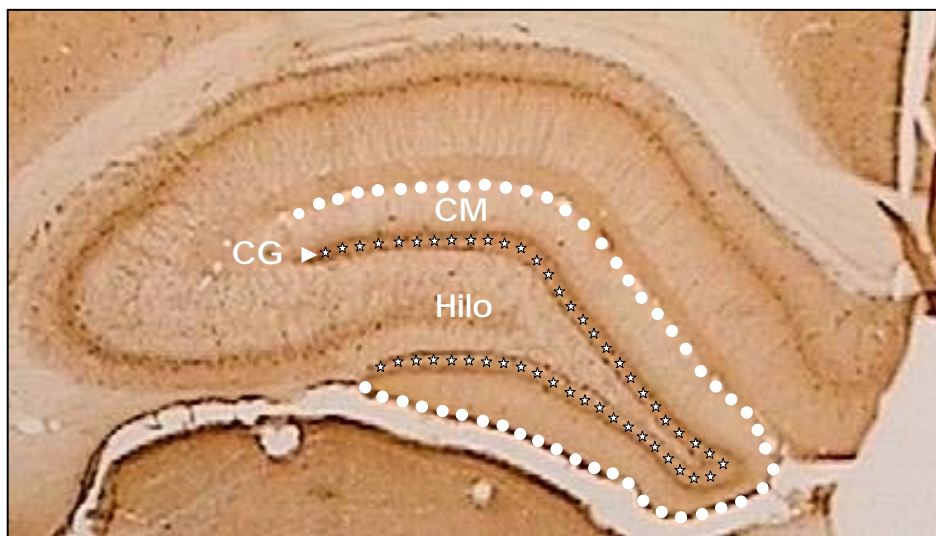


FIGURA 3 - Representação esquemática da região do giro dentado que foi utilizada para a quantificação das células imunomarcadas por parvalbumina. CM - camada molecular; CG - camada granular e HILO - região polimórfica do giro dentado.

3.10 – QUANTIFICAÇÃO DE FIBRAS

A quantificação das fibras é um método pelo qual é possível verificar a quantidade de terminais GABAérgicos, marcados pela parvalbumina.

Seis cortes adjacentes de cérebros em espessura de 50µm, imunomarcados para parvalbumina, foram utilizados por animal. Foi analisado o hilo do giro dentado de ambos os hipocampus, seguindo as coordenadas estereotáxicas (-3,3/-3,8 mm do Bregma) **(FIGURA 4)**.

A imagem do giro dentado foi capturada em um sistema de vídeo acoplado ao microscópio de luz. A imagem foi transferida para o programa de computador "Microsoft Foto Editor", onde foi delimitada uma região de 2X1cm. Esta imagem foi então transferida para outro programa, chamado "Image Tool" e a coloração foi mudada para escala de cinza para melhor visualização das fibras. O limiar de coloração das fibras foi ajustado manualmente e analisado pela diferença de intensidade de coloração. O resultado se dá pela porcentagem de área corada em branco e preto. São consideradas as regiões em preto, que contém as fibras. A área analisada envolve 0,5mm², o que corresponde ao aumento de 10X.

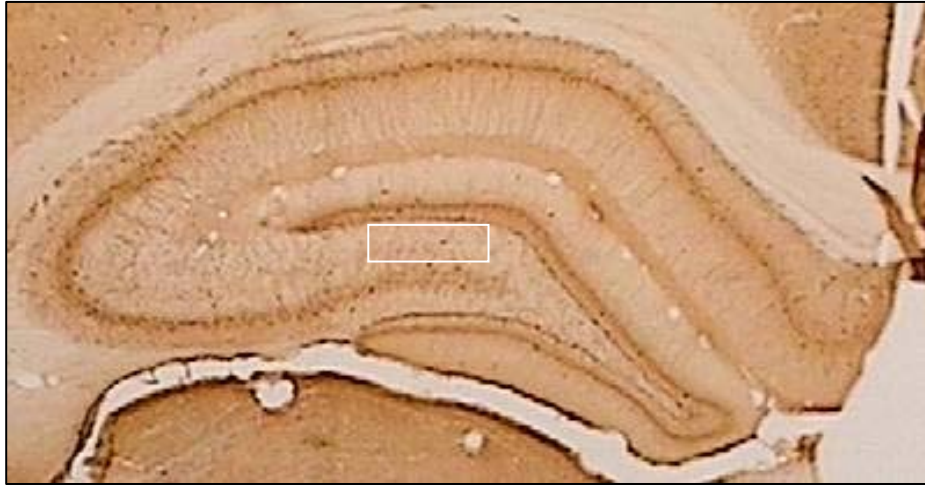


FIGURA 4 - Representação esquemática da região do giro dentado que foi utilizada para a quantificação das fibras imunomarcadas por parvalbumina.

3.11 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística deste trabalho, foi utilizado o programa Prisma 3.0.

Na comparação entre a frequência de crises foi utilizado o teste "t" de Student. Tanto para a densidade celular pela técnica de Nissl, assim como pela técnica de imunohistoquímica e densidade de fibras pela técnica de imunohistoquímica foi utilizado o teste Anova de uma via com pós teste de múltipla comparação de Tukey.

Com o intuito de facilitar a visualização do estudo, a tabela 2 apresentada a seguir, sumariza os procedimentos efetuados em cada grupo de estudo.

4- RESULTADOS

Uma vez que não houve diferença entre os grupos de animais castrados que receberam pilocarpina 4%, quatro dias após o procedimento cirúrgico e foram tratados com o veículo de diluição do hormônio (CX+CRON+VEIC) e os animais castrados que receberam pilocarpina 4%, quatro dias após o procedimento cirúrgico (CX+CRON), em todos os ensaios efetuados, eles serão, a partir de agora, considerados CX+CRON.

4.1 - CONFIRMAÇÃO DE ATROFIA GENITAL APÓS A CASTRAÇÃO

A confirmação do quadro atrófico foi realizada em 50 animais (10 animais do grupo CX, 10 animais do grupo CX+CRON, 10 animais do grupo CX+CRON+AMP, 10 animais do grupo CX+CRON+E2 e 10 animais do grupo CX+CRON+E2+AMP) através de citologia vaginal, onde foi verificada a interrupção do ciclo estral. Todos os animais que passaram pela intervenção cirúrgica tiveram a sua castração confirmada.

Na análise das lâminas foi observado um padrão de células idêntico ao período diestro do ciclo estral, isto é, presença quase que exclusiva de leucócitos no ducto vaginal, o que confirma a diminuição dos níveis de estrogênio.

4.2 - ANÁLISE COMPORTAMENTAL APÓS ADMINISTRAÇÃO DE PILOCARPINA

Após a administração da pilocarpina, os animais apresentam automotismos faciais, acinesia e tremores. Minutos após, este comportamento progrediu para crises motoras límbicas, onde os animais apresentavam salivação intensa, com clonias de patas dianteiras, apoiados sobre as patas traseiras e conseqüente queda. Essas crises motoras límbicas começavam alguns minutos após a injeção da pilocarpina ($0,8 \pm 0,5$ min nas fêmeas castradas que receberam pilocarpina e $42,7 \pm 14,4$ min nas fêmeas que receberam pilocarpina) e foram recorrentes, culminando em *status epilepticus* (em $31,8 \pm 15,5$ min nas fêmeas castradas que receberam pilocarpina e $48,8 \pm 18,4$ min nas fêmeas que receberam pilocarpina,) que durava em média 12 horas. Este período é denominado fase aguda do modelo.

Após o período agudo, os animais não respondem aos estímulos ambientais, retomando gradativamente ao seu comportamento normal, começando neste estágio a um período livre de crises que tem sido caracterizado pela normalização das alterações comportamentais e eletrográficas, o que configura o período silencioso do modelo. Este período teve a duração de $10,1 \pm 4,4$ dias nas fêmeas que foram castradas e receberam apenas pilocarpina e $49,7 \pm 12,9$ dias nas fêmeas que apenas receberam pilocarpina, confirmando os dados previamente descritos pelo nosso grupo (VALENTE e cols., 2002).

Todos os animais sobreviventes a estes dois períodos passaram a exibir crises espontâneas e recorrentes, as quais caracterizam o período crônico do modelo.

Os animais dos grupos controle, que receberam solução salina em vez de pilocarpina, não apresentaram nenhuma alteração comportamental, mesmo após a remoção dos ovários no grupo de animais castrados.

4.3 - FREQUÊNCIA DE CRISES

A análise da frequência de crises foi observada nos animais que receberam pilocarpina a partir da primeira crise espontânea (estabelecimento do período crônico do modelo), por um período de 60 dias em observações diárias por um sistema de monitoração 24 h/dia. A primeira fase consistiu em observar as crises por um período de 30 dias. Após esta fase de observação os animais castrados e crônicos (CX+CRON) foram divididos em quatro grupos e observados por mais 30 dias, sendo que um destes grupos foi considerado como controle do tratamento, uma vez que recebeu somente a solução de diluição do hormônio. Os outros três grupos foram utilizados para o estudo do tratamento com a reposição hormonal, sendo então divididos em CX+CRON+AMP, CX+CRON+E2 e CX+CRON+E2+AMP. Para os animais que receberam tratamento, a primeira fase da observação da frequência de crises foi utilizada como controle da fase posterior. Foi feita observação dos animais apenas crônicos (CRON), que foram comparados aos castrados e crônicos (CX+CRON), para verificarmos se a castração poderia interferir na frequência de crises dos animais.

Os resultados obtidos são aqui apresentados como a média semanal \pm desvio padrão da frequência de crises durante o período de observação.

Pudemos observar que não existe diferença estatística significativa quando comparamos a frequência de crises entre os animais CRON ($6,4 \pm 3,7$ crises/semana) e CX+CRON ($6,6 \pm 3,9$ crises/semana), mostrando que somente a castração não modifica o padrão de crises na fase crônica deste modelo.

Quando comparamos a frequência de crises entre os animais que receberam reposição hormonal de acetato de medroxiprogesterona, antes e durante o tratamento, pudemos verificar que existe uma diferença estatística significativa entre antes ($6,5 \pm 2,7$ crises/semana) e durante ($5 \pm 2,8$ crises/semana; $*p < 0,05$) o tratamento. Houve, portanto, uma redução do número de crises nesses animais, induzida pelo acetato de medroxiprogesterona.

Com relação a frequência de crises entre os animais que receberam reposição hormonal de 17β -estradiol, antes e durante o tratamento, pudemos verificar que não existe diferença estatística significativa quando comparados antes ($6,7 \pm 3,4$ crises/semana) e durante ($7 \pm 3,2$ crises/semana) o tratamento. Esses dados mostram, portanto, que o 17β - estradiol não modificou o padrão de crises na fase crônica.

Nos animais que receberam reposição hormonal de 17β -estradiol + acetato de medroxiprogesterona, antes e durante o tratamento, pudemos verificar que existe uma diferença estatística significativa quando comparados antes ($6,1 \pm 2,9$ crises/semana) e durante ($3,9 \pm 2,1$ crises/semana; $**p < 0,0004$) o tratamento, mostrando que a associação entre os dois hormônios é capaz de reduzir bastante o número de crises nesses animais (**FIGURA 5**).

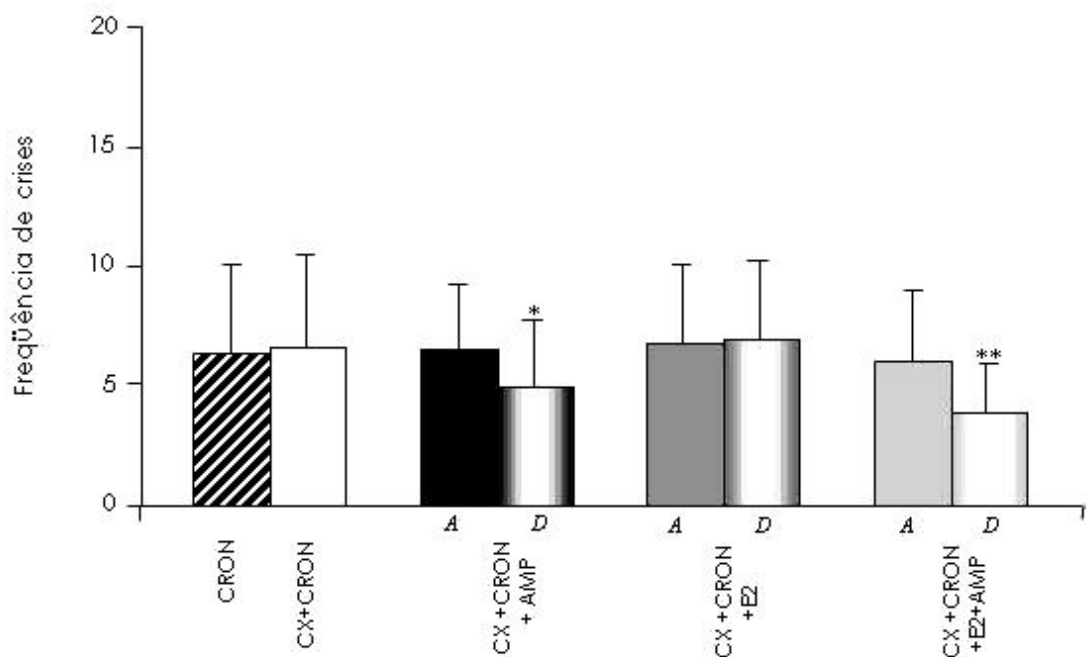


FIGURA 5 - Gráfico representando a média da frequência semanal de crises nos animais que receberam pilocarpina. (A) representa a frequência de crises antes da reposição hormonal e (D) representa a frequência de crises durante a reposição hormonal. Significância estatística: * $p < 0,05$, ** $p < 0,0004$ (teste "t" de Student).

4.4 - ANÁLISE DA COLORAÇÃO DE NEO-TIMM

A coloração de neo-Timm nas secções cerebrais, no giro dentado, foi avaliada usando-se a escala de classificação utilizada por Holmes e cols. (1999), onde foi feita uma análise subjetiva aplicando-se a escala de 0-V, como descrita anteriormente. A classificação foi feita através da avaliação do brotamento das fibras musgosas supragranulares, que foi efetuada por cinco observadores diferentes que não sabiam a que grupo as lâminas pertenciam. Os resultados obtidos representam a média das observações efetuadas.

Apresentaram grau 0, todos os animais do grupo controle, isto é, os grupos E, M, D, P e CX, onde se verificou a ausência de grânulos na região supragranular.

Foram classificados como tendo grau III os animais dos grupos CRON, CX+CRON+AMP e CX+CRON+E2+AMP, enquanto que o grupo CX+CRON+E2, foi classificado como tendo grau IV.

Os animais castrados e crônicos, sem reposição hormonal (CX+CRON) apresentaram o maior grau de brotamento supragranular de fibras musgosas (grau V).

Com estes resultados pudemos verificar que os animais castrados e crônicos apresentam um intenso brotamento de fibras musgosas, maior que o observado nos animais apenas crônicos (grau V x III), mostrando que a castração aumenta o brotamento de fibras musgosas.

Já os animais tratados com 17β -estradiol apresentam um brotamento menor que o grupo castrado, sem reposição hormonal (grau IV x V). Aqueles animais tratados com acetato de medroxiprogesterona e com 17β -estradiol + medroxiprogesterona apresentam um brotamento ainda menor que os animais castrados (grau III x V), similar ao padrão observado nos animais crônicos não castrados (grau III x III). Neste caso, o tratamento com a reposição de acetato de medroxiprogesterona e de 17β -estradiol + medroxiprogesterona parece ter interrompido o desenvolvimento do brotamento supragranular no nível III, valor similar ao verificado nos animais crônicos não castrados (**FIGURAS 6 e 7 e TABELA 3**)

Grupos	Gradação subjetiva de Holmes e cols. (1999)
E	0
M	0
D	0
P	0
CX	0
CRON	III
CX+CRON	V
CX+CRON+AMP	III
CX+CRON+E2	IV
CX+CRON+E2+AMP	III

TABELA 3 - Análise da coloração de neo-Timm através da escala subjetiva proposta por Holmes e cols. (1999).

4.5 - ANÁLISE DA COLORAÇÃO DE NISSL

Os cortes histológicos submetidos à coloração de Nissl mostram que os animais dos grupos controles (E, M, D, P e CX) mantiveram preservadas as características morfológicas do hipocampo, sem alterações e perda celular significantes.

Os animais dos grupos experimentais apresentaram uma visível perda celular e alteração da morfologia do hipocampo, sendo que para

o grupo CRON, notou-se uma desestruturação celular em CA3, e visível dispersão das células no hilo do giro dentado.

No hipocampo dos animais CX+CRON, pode-se notar que tanto CA1, quanto CA3 e o giro dentado apresentam desestruturação da citoarquitetura e que havia dispersão celular em CA3 e hilo.

Nos animais CX+CRON+AMP, a região do giro dentado e CA3 apareceram alteradas morfológicamente, com visível dispersão celular, assim como no hilo do giro dentado.

Entretanto, a citoarquitetura do hipocampo pareceu mais preservada nos animais do grupo CX+CRON+E2, porém pode-se observar que o giro dentado apresenta-se alterado morfológicamente, com uma visível dispersão celular, assim como na região do hilo. Nos animais do grupo CX+CRON+E2+AMP, o hipocampo manteve sua morfologia básica. No entanto, foi visível a dispersão celular em CA3 e no hilo do giro dentado, assim como alteração na morfologia do giro dentado (**FIGURAS 8 e 9**).

4.5.1 - QUANTIFICAÇÃO CELULAR PELA TÉCNICA DE NISSL

Os cortes histológicos dos cérebros dos animais dos grupos controle (E, M, D, P e CX), assim como dos grupos experimentais (CRON, CX+CRON, CX+CRON+AMP, CX+CRON+E2 e CX+CRON+E2+AMP) foram analisados em microscopia óptica e as células das regiões CA1 e CA3 foram quantificadas, seguindo as descrições feitas em métodos.

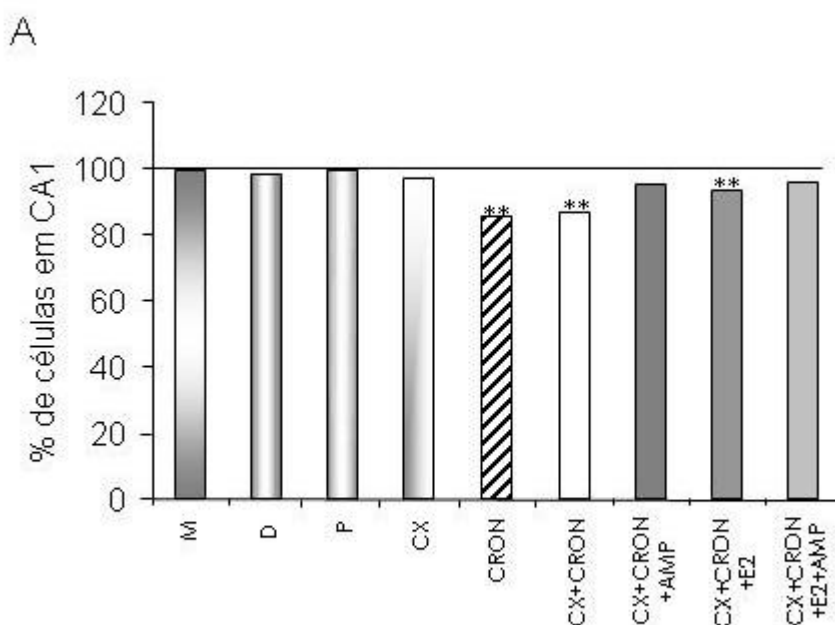
Foi utilizado como controle a quantificação das células das regiões CA1 e CA3 dos animais do grupo estro (E) onde foi encontrado $103,3 \pm 8,3$ células/região em CA1 e $74,7 \pm 10,4$ células/região em CA3, o que foi considerado como 100% de celularidade.

Na região CA1 pudemos verificar que há uma considerável perda neuronal nos animais dos grupos experimentais CRON ($88,5 \pm 8,1$ células/região, $**p < 0,001$) e CX+CRON ($89,8 \pm 7,6$ células/região, $**p < 0,001$), o que equivale a 85,7% e 86,9% respectivamente, quando comparado ao grupo controle.

Já nos animais que receberam os tratamentos, pudemos verificar que a perda neuronal foi menos intensa, uma vez que para os animais do grupo CX+CRON+AMP a densidade celular encontrada foi de $98,5 \pm 3,5$ células/região, $p > 0,05$ (95,4%), para os animais do grupo CX+CRON+E2 foi de $96,3 \pm 8,7$ células/região, $**p < 0,001$ (93,2%) e para os animais do grupo CX+CRON+E2+AMP foi de $98,9 \pm 4,6$ células/região, $p > 0,05$ (95,8%) **(FIGURA 10 - painel A)**.

Na região CA3, pudemos verificar que nos animais dos grupos experimentais CRON um número de células de $41,2 \pm 8,2$ células/região, $**p < 0,001$ e para o grupo CX+CRON $41,3 \pm 5,7$ células/região, $**p < 0,001$, o que equivale a 54,1% e 54,3% respectivamente, quando comparados com o controle.

Nos grupos que receberam os tratamentos hormonais, pudemos verificar que a perda neuronal foi menos intensa, uma vez que para os animais do grupo CX+CRON+AMP a densidade celular encontrada foi de $61,3 \pm 10,1$ células/região, $**p < 0,001$ (80,5%), para os animais do grupo CX+CRON+E2 foi de $57,6 \pm 14,2$ células/região, $**p < 0,001$ (75,7%) e para os animais do grupo CX+CRON+E2+AMP foi de $65,8 \pm 13,6$ células/região, $*p < 0,01$ (86,6%) (**FIGURA 10 - painel B**).



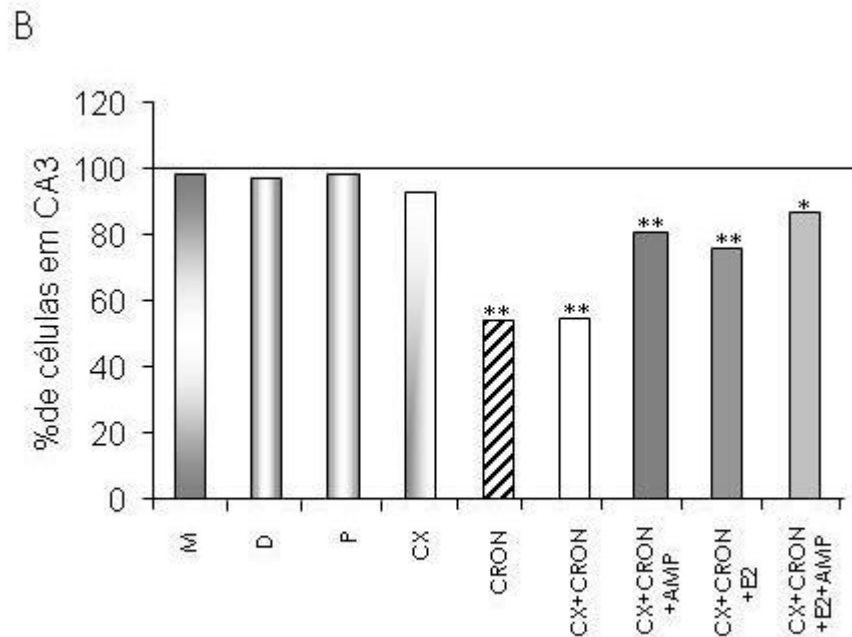


FIGURA 10 - Densidade celular em CA1 (A) e CA3 (B) em cortes corados pela técnica de Nissl. O grupo salina estro (E) representa 100% do número de células. Significância estatística: * $p < 0,01$ e ** $p < 0,001$ (ANOVA com pós teste Tukey's Multiple Comparison).

4.6 - ANÁLISE DA IMUNOHISTOQUÍMICA PARA PARVALBUMINA

Os cortes histológicos submetidos a imunohistoquímica mostram que os animais dos grupos controle (E, M, D e CX) apresentam pouca imunomarcagem para parvalbumina. Houve, entretanto, uma maior imunorreatividade para parvalbumina nos animais do grupo (P). Houve flutuações na imunorreatividade contra a parvalbumina nas diferentes regiões da formação hipocampal, mostrando uma ciclicidade na expressão desta proteína nas diferentes fases do ciclo estro (**FIGURA 11 - painéis A, B,C,D e E**).

Já nos animais dos grupos experimentais (CRON, CX+CRON, CX+CRON+AMP, CX+CRON+E2 e CX+CRON+E2+AMP) pode-se notar um aumento considerável na imunomarcacão, tanto para fibras quanto para células e este aumento parece ser alterado pelo tratamento aos quais os animais foram submetidos (**FIGURA 11 - painéis F,G,H,I e J**).

Com relação às células, foi possível verificar que nos animais do grupo CRON, na região CA1 houve pouca imunomarcacão (**FIGURA 12**), enquanto que no hilo, foi possível verificar maior imunomarcacão (**FIGURA 14**), quando comparados com os animais do grupo controle estro (E). Para os animais do grupo CX+CRON, houve pouca imunomarcacão na região CA1(**FIGURA 12**), com maior intensidade em CA3 (**FIGURA 13**) e intensa marcação no hilo, em relação aos animais do grupo controle estro (E) (**FIGURA 14**).

Nos animais do grupo CX+CRON+AMP foi possível verificar maior imunomarcacão na região do giro dentado, com intensa imunomarcacão nas regiões CA3 e hilo, quando comparados aos animais do grupo controle estro (E). Já nos animais do grupo CX+CRON+E2 houve maior imunomarcacão nas regiões CA3 e hilo, enquanto que nos animais do grupo CX+CRON+E2+AMP houve maior imunomarcacão nas regiões CA1, CA3 e giro dentado e intensa marcação na região do hilo, quando comparados aos animais do grupo controle (E).

Em relação às fibras imunomarcadas para parvalbumina, houve maior imunomarcacão na região CA1 nos animais dos grupos CRON, CX+CRON e CX+CRON+AMP, e intensa imunomarcacão nos animais do grupo CX+CRON+E2+AMP, quando comparados ao grupo controle estro (E). Na região CA3, foi possível verificar aumento na imunomarcacão nos

animais dos grupos CX+CRON+AMP e CX+CRON+E2+AMP, em relação aos animais do grupo controle estro (E).

Já na região do hilo, houve maior imunomarcacão nos animais dos grupos CX+CRON e CX+CRON+E2 e intensa imunomarcacão nos animais dos grupos CRON, CX+CRON+AMP e CX+CRON+E2+AMP, quando comparados aos animais do grupo controle estro (E).

4.6.1-QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS MARCADAS COM PARVALBUMINA

Os cortes histológicos dos cérebros dos animais dos grupos controle (E, M, D, P e CX), assim como dos grupos experimentais (CRON, CX+CRON, CX+CRON+AMP, CX+CRON+E2 e CX+CRON+E2+AMP) foram analisados em microscopia óptica e as células das camadas molecular e granular do giro dentado, assim como do hilo foram quantificadas seguindo as descrições feitas anteriormente.

Foi feita análise subjetiva da imunomarcacão para parvalbumina nas células das regiões CA1, CA3, giro dentado e hilo, assim como das fibras em CA1(*stratum radiatum*), CA3 (*stratum radiatum*) e hilo em todos os grupos de estudo (**TABELA 4 e 5**).

		GRUPOS	REGIÕES			
			CA1	CA3	Giro dentado	Hilo
Controles	Ratas em estro (E)	++	+	++	+	
	Ratas em metaestro (M)	+	+	++	+	
	Ratas em diestro (D)	+	-	+	+	
	Ratas em proestro (P)	+++	+++	++	+++	
	Ratas castradas (CX)	++	+++	++	++	
Experimentais	Ratas em fase crônica (CRON)	+	+	++	++	
	Ratas castradas e fase crônica (CX+CRON)	+	++	++	+++	
	Ratas castradas e fase crônica+ acetato de medroxiprogesterona (CX+CRON+AMP)	++	+++	+++	+++	
	Ratas castradas e fase crônica +17 β -estradiol (CX+CRON+E2)	++	++	++	++	
	Ratas castradas e fase crônica +17 β -estradiol + acetato de medroxiprogesterona (CX+CRON+E2+AMP)	+++	++	+++	+++	

TABELA 4 - Representação da imunomarcção das células coradas pela parvalbumina. Legenda: (-) ausência de marcação, (+) pouca marcação, (++) muita marcação e (+++) intensa marcação.

		GRUPOS	REGIÕES		
			CA1	CA3	Hilo
Controles	Ratas em estro (E)	+	+	+	
	Ratas em metaestro (M)	+	+	+	
	Ratas em diestro (D)	+	-	-	
	Ratas em proestro (P)	+++	+++	+++	
	Ratas castradas (CX)	+++	+++	+	
Experimentais	Ratas em fase crônica (CRON)	++	+	+++	
	Ratas castradas e fase crônica (CX+CRON)	++	+	++	
	Ratas castradas e fase crônica+ acetato de medroxiprogesterona (CX+CRON+AMP)	++	++	+++	
	Ratas castradas e fase crônica +17 β -estradiol (CX+CRON+E2)	+	+	++	
	Ratas castradas e fase crônica +17 β -estradiol + acetato de medroxiprogesterona (CX+CRON+E2+AMP)	+++	++	+++	

TABELA 5 - Representação da imunomarcção das fibras coradas pela parvalbumina. Legenda: (-) ausência de marcação, (+) pouca marcação, (++) muita marcação e (+++) intensa marcação.

Em seguida foi feita análise comparativa da imunomarcagem das células e fibras imunomarcadas com relação ao grupo controle estro (TABELA 6 e 7).

GRUPOS	REGIÕES			
	CA1	CA3	Giro dentado	Hilo
E X CRON	↓	=	=	↑
E X CX+CRON	↓	↑	=	↑↑
E X CX+CRON+AMP	=	↑↑	↑	↑↑
E X CX+CRON+E2	=	↑	=	↑
E X CX+CRON+E2+AMP	↑	↑	↑	↑↑

TABELA 6 - Análise comparativa da imunomarcagem das células coradas pela parvalbumina nos animais dos grupos experimentais com relação aos animais do grupo controle estro (E).

GRUPOS	REGIÕES		
	CA1	CA3	Hilo
E X CRON	↑	=	↑↑
E X CX+CRON	↑	=	↑
E X CX+CRON+AMP	↑	↑	↑↑
E X CX+CRON+E2	=	=	↑
E X CX+CRON+E2+AMP	↑↑	↑	↑↑

TABELA 7 - Análise comparativa da imunomarcção das fibras coradas pela parvalbumina nos animais dos grupos experimentais com relação aos animais do grupo controle estro (E). Legenda: (↓) diminuição da imunomarcção, (=) imunomarcção semelhante, (↑) aumento da imunomarcção e (↑↑) aumento intenso da imunomarcção;

4.6.1.1 - QUANTIFICAÇÃO CELULAR NA CAMADA MOLECULAR

Na camada molecular do giro dentado pudemos verificar que a densidade celular sofreu flutuações durante as fases do ciclo estral. Observamos que os animais na fase proestro (P) apresentam maior imunomarcção ($7,8 \pm 1,5$ células/camada, $**p < 0,001$), sendo que em estro (E) apresentam $2,7 \pm 1,2$ células/camada, em metaestro (M) apresentam $1,8 \pm 1,3$ células/camada ($p > 0,05$) e a menor imunomarcção é verificada em diestro (D) com $1 \pm 0,6$ células/camada ($p > 0,05$). Nos animais castrados (CX) foi verificada $4 \pm 1,8$ células/camada ($p > 0,05$).

Os animais dos grupos experimentais foram comparados com os animais do grupo CX+CRON. Pudemos verificar nos animais dos grupos experimentais CRON $3,8 \pm 1,7$ células/camada (**p<0,001) e nos CX+CRON uma densidade de $2,7 \pm 1$ células/camada.

Nos animais que receberam os tratamentos, pudemos verificar que para os animais do grupo CX+CRON+AMP a densidade celular encontrada foi de $6,5 \pm 1,2$ células/camada (**p<0,01), nos animais do grupo CX+CRON+E2+AMP foi de $5,4 \pm 0,9$ células/camada (*p<0,05). Nos animais do grupo CX+CRON+E2 pudemos verificar uma menor imunomarcção ($1,6 \pm 0,9$ células/camada, p>0,05) (**TABELA 8 e FIGURA 15**).

Grupos	P	significância
E x M	>0,05	NS
E x D	>0,05	NS
E x P	<0,001	**
E x CX	>0,05	NS
M x D	>0,05	NS
M x P	<0,001	**
M x CX	>0,05	NS
D x P	<0,001	**
D x CX	<0,05	*
P x CX	<0,001	**

TABELA 8 - Densidade de células imunomarcadas pela parvalbumina na camada molecular do giro dentado entre os animais dos grupos controle. Significância estatística: NS p>0,05, *p<0,05 e **p<0,001 (ANOVA com pós teste- Tukey's Multiple Comparison).

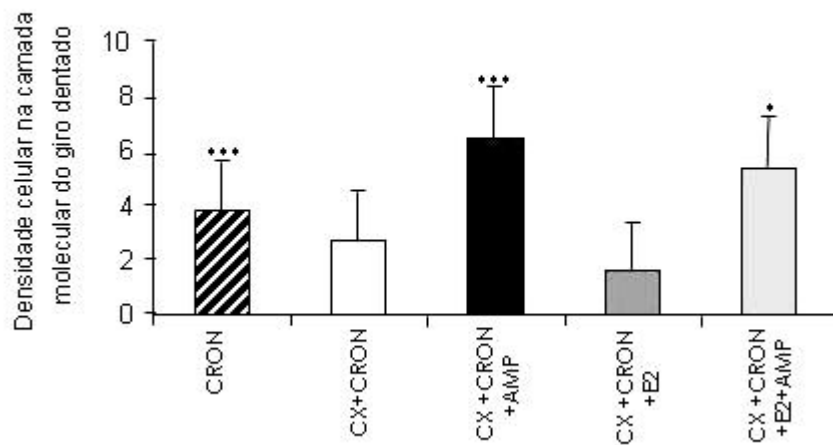


FIGURA 15 - Densidade de células imunomarcadas pela parvalbumina na camada molecular do giro dentado entre os grupos tratados. A comparação entre os grupos foi feita em relação aos animais do grupo CX + CRON. Significância estatística: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ (ANOVA com pós teste Tukey's Multiple Comparison).

4.6.1.2 - QUANTIFICAÇÃO CELULAR NA CAMADA GRANULAR

Na camada granular do giro dentado pudemos verificar que a densidade celular também sofreu flutuações durante o ciclo estral. Nos animais na fase proestro (P) pudemos verificar maior imunomarcagem ($14,5 \pm 2$ células/camada, $p > 0,05$), sendo que em estro (E) apresentam $12 \pm 3,7$ células/camada, em metaestro (M) apresentam $9,7 \pm 2,3$ células/camada ($p < 0,05$) e reduzem bruscamente em diestro (D) $2,5 \pm 0,8$ células/camada (** $p < 0,01$). Nos animais castrados (CX), foi verificado $10,5 \pm 2,9$ células/camada ($p > 0,05$).

Os animais dos grupos experimentais foram comparados com os animais do grupo CX+CRON. Pudemos verificar para os animais CRON

uma densidade de $14,5 \pm 4,3$ células/camada ($p > 0,05$) e para o grupo CX+CRON uma densidade de $11 \pm 3,7$ células/camada.

Nos grupos que receberam os tratamentos, pudemos verificar que para os animais do grupo CX+CRON+AMP a densidade celular encontrada foi de $17,8 \pm 4$ células/camada ($p > 0,05$), nos animais do grupo CX+CRON+E2+AMP foi de $17,3 \pm 2,5$ células/camada ($p > 0,05$). Nos animais do grupo CX+CRON+E2 verificamos uma menor imunomarcção ($11,5 \pm 2,8$ células/camada, $p > 0,05$) (**TABELA 9 e FIGURA 16**).

Grupos	P	significância
E x M	$>0,05$	NS
E X D	$<0,01$	**
E X P	$>0,05$	NS
E X CX	$>0,05$	NS
M X D	$>0,05$	NS
M X P	$<0,01$	**
M X CX	$>0,05$	NS
D X P	$<0,001$	***
D X CX	$<0,05$	*
P X CX	$<0,05$	*

TABELA 9 - Densidade de células imunomarcadas pela parvalbumina na camada granular do giro dentado entre os animais dos grupos controle. Significância estatística: NS $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (ANOVA com pós teste- Tukey's Multiple Comparison).

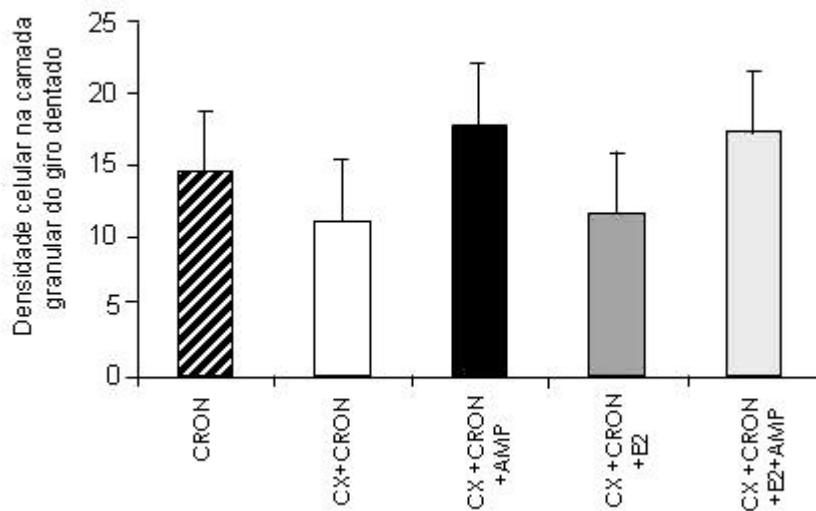


FIGURA 16 - Densidade de células imunomarcadas pela parvalbumina na camada granular do giro dentado entre os grupos tratados. A comparação entre os grupos foi feita em relação aos animais do grupo CX + CRON. Significância estatística (ANOVA com pós teste Tukey's Multiple Comparison). Não há significância estatística entre os grupos.

4.6.1.3 - QUANTIFICAÇÃO CELULAR NO HILO DO GIRO DENTADO

Na região polimórfica do giro dentado (hilo) pudemos verificar que nos animais na fase proestro (P) existe maior imunomarcagem ($28,6 \pm 3,6$ células/hilo, $**p < 0,01$), sendo que em estro (E) apresentam $9 \pm 0,8$ células/hilo, em metaestro (M) apresentam $12,8 \pm 3,8$ células/hilo ($p > 0,05$) e reduzem em diestro (D) $4,2 \pm 1,6$ células/hilo ($*p < 0,05$). Nos animais castrados (CX), foi verificado $16,8 \pm 5,4$ células/hilo ($p > 0,05$).

Os animais dos grupos experimentais foram comparados com os animais do grupo CX+CRON. Pudemos verificar para os animais CRON tiveram densidade celular de $19,8 \pm 3,6$ células/hilo ($p > 0,05$) e para os CX+CRON, $24,8 \pm 4,3$ células/hilo.

Nos animais que receberam os tratamentos, pudemos verificar que para os animais do grupo CX+CRON+AMP a densidade celular encontrada foi de $24,2 \pm 5,1$ células/hilo ($p > 0,05$), nos animais do grupo CX+CRON+E2+AMP foi de $28,7 \pm 3,9$ células/hilo ($p > 0,05$). Nos animais do grupo CX+CRON+E2 verificamos uma menor imunomarcagem ($19,5 \pm 3,7$ células/hilo, $p > 0,05$) (TABELA 10 e FIGURA 17).

Grupos	P	significância
E x M	$\geq 0,05$	NS
E x D	$\leq 0,05$	*
E x P	$\leq 0,01$	**
E x CX	$\geq 0,05$	NS
M x D	$\geq 0,05$	NS
M x P	$\leq 0,001$	***
M x CX	$\geq 0,05$	NS
D x P	$\leq 0,001$	***
D x CX	$\leq 0,01$	**
P x CX	$\geq 0,05$	NS

TABELA 10 - Densidade de células imunomarcadas pela parvalbumina no hilo do giro dentado entre os animais dos grupos controle. Significância estatística: NS $p > 0,05$, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (ANOVA com pós teste- Tukey's Multiple Comparison).

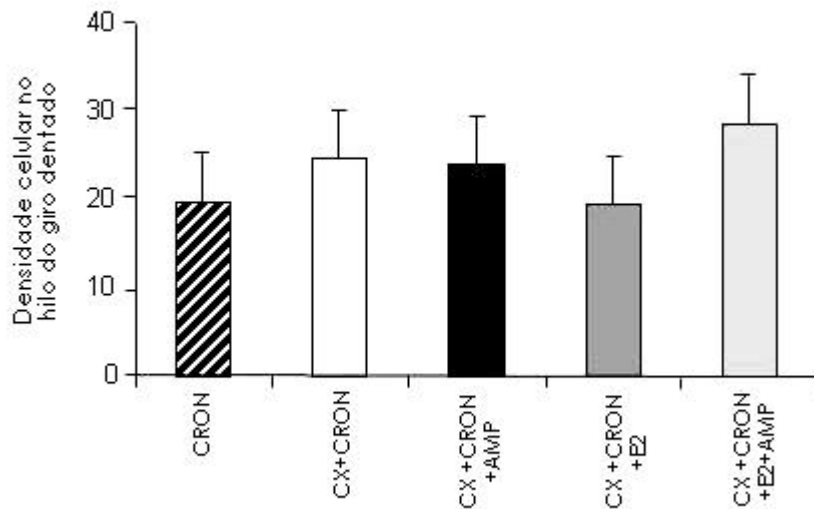


FIGURA 17 - Densidade de células imunomarcadas pela parvalbumina no hilo do giro dentado entre os grupos tratados. A comparação entre os grupos foi feita em relação aos animais do grupo CX + CRON. Não há significância estatística entre os grupos. (ANOVA com pós teste Tukey's Multiple Comparison).

4.6.2-QUANTIFICAÇÃO DE FIBRAS REATIVAS À PARVALBUMINA PELA TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA

Na região do hilo pudemos verificar que a densidade de fibras sofreu modificações, conforme as flutuações do ciclo estral. Nos animais na fase proestro (P), pudemos observar maior imunomarcacão ($35,7 \pm 6,5$ fibras/hilo, $**p < 0,001$), sendo que na fase de estro (E) verificou-se $14,4 \pm 2,1$ fibras/hilo, em metaestro (M) 11 ± 2 fibras/hilo ($p > 0,05$) e reduzem em diestro (D) $9,2 \pm 1,8$ fibras/hilo ($*p < 0,01$). Nos animais castrados (CX), foi verificado $10,6 \pm 1,7$ fibras/hilo ($p > 0,05$).

Os animais dos grupos experimentais foram comparados com os animais do grupo CX+CRON. Pudemos verificar para os animais CRON uma densidade de $26,4 \pm 3,7$ fibras/hilo ($p > 0,05$) e para os animais do grupo CX+CRON uma densidade de $23,9 \pm 1,9$ fibras/hilo.

Nos grupos que receberam os tratamentos, pudemos verificar que o maior aumento na densidade de fibras foi encontrado nos animais do grupo CX+CRON+E2+AMP ($35,1 \pm 6,7$ fibras/hilo, $*p < 0,001$), seguido pelos animais do grupo CX+CRON+AMP ($27,6 \pm 3,7$ fibras/hilo, $p > 0,05$). Os animais do grupo CX+CRON+E2 apresentaram $22,7 \pm 3,1$ fibras/hilo ($p > 0,05$) (**TABELA 11 e FIGURA 18**).

Grupos	P	significância
E x M	$>0,05$	NS
E x D	$<0,01$	*
E x P	$<0,001$	**
E x CX	$>0,05$	NS
M x D	$>0,05$	NS
M x P	$<0,001$	**
M x CX	$>0,05$	NS
D x P	$<0,001$	**
D x CX	$>0,05$	NS
P x CX	$<0,001$	**

TABELA 11 - Densidade de fibras imunomarcadas pela parvalbumina no hilo do giro dentado entre os animais dos grupos controle. Significância estatística: NS $p > 0,05$, $*p < 0,01$ e $**p < 0,001$ (ANOVA com pós teste- Tukey's Multiple Comparison).

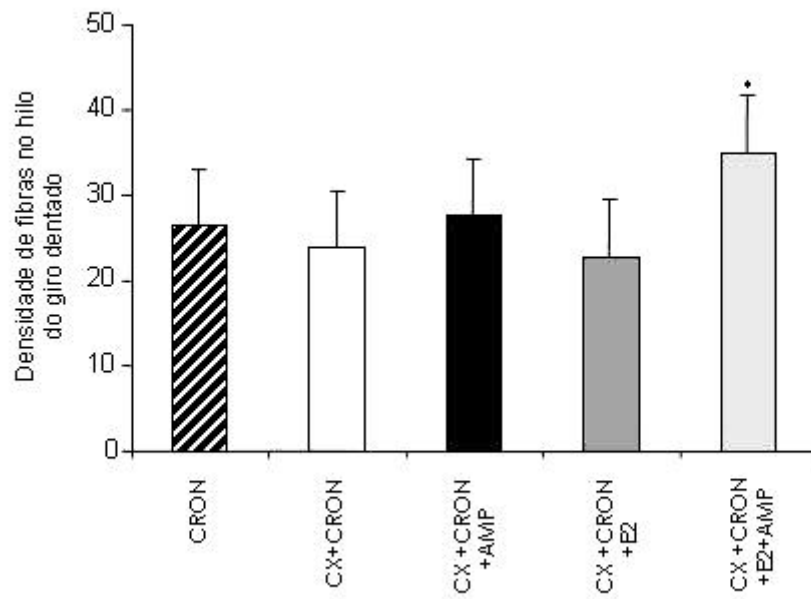


FIGURA 18 - Densidade de fibras imunomarcadas pela parvalbumina no hilo do giro dentado entre os grupos tratados. A comparação entre os grupos foi feita em relação aos animais do grupo CX + CRON. Significância estatística: * $p < 0,001$ (ANOVA com pós teste Tukey's Multiple Comparison).

5 - DISCUSSÃO

Dentre os modelos experimentais que mimetizam a epilepsia do lobo temporal em humanos, o da pilocarpina é o que mais se assemelha às crises parciais complexas de humanos, com a particularidade de não haver remissão das crises durante a vida do animal (LEITE e cols., 1990; CAVALHEIRO e cols., 1991).

O estudo em fêmeas foi iniciado por Amado e cols. (1993) e desde o princípio tem fornecido importantes achados em relação ao envolvimento hormonal na gênese epiléptica, confirmando os achados de estudos clínicos que demonstram que as mulheres sofrem alterações no quadro epiléptico durante toda sua vida, em função do perfil hormonal, seja na puberdade, ciclo menstrual, gestação, climatério e menopausa (MORREL, 1992, 1999; HERZOG, 1999a,b,c).

Em função destes dados, optamos por utilizar animais castrados para que pudéssemos verificar apenas o papel da pilocarpina durante a indução do *status epilepticus* para posteriormente avaliarmos a influência dos hormônios sexuais femininos durante a fase crônica desse modelo. Utilizamos, então, terapia de reposição hormonal para verificarmos se os hormônios são capazes de melhorar o quadro de perda neuronal e o intenso brotamento de fibras musgosas, que foram observados anteriormente por Valente e cols. (2002).

A opção pela injeção da pilocarpina quatro dias após o procedimento cirúrgico para castração seguiu a descrição de Silva (1999). Este autor verificou que após este período, nos esfregaços

vaginais, são observados poucos elementos epiteliais, muito muco e leucócitos, ou seja, sugerindo um quadro atrófico que comprova a diminuição dos níveis de estrogênio, caracterizando o hipoestrogenismo. Segundo Silva e cols., (2003), após 12 dias do procedimento cirúrgico, há perdas neuronais na região CA1 do hipocampo (*stratum radiatum*) que podem se tornar definitivas, portanto, irreversíveis mesmo com a posterior administração de estrogênio. No entanto, não foi encontrado no referido estudo alterações qualitativas na densidade sináptica, ou seja, as junções sinápticas possuíam a mesma morfologia encontrada nos animais do grupo controle (SILVA e cols., 2003).

No presente trabalho, os achados a partir da citologia vaginal nos deram a confirmação de que os animais castrados apresentavam atrofia genital e que após a reposição hormonal o útero se apresentava epitelizado, demonstrando efetividade do tratamento.

Segundo vários autores (WEHBA e cols., 1988; BARACAT e cols., 1991 e RODRIGUES de LIMA e cols., 1995) durante o período do climatério, ou seja, no início da falência ovariana, onde se instala a insuficiência estro-progestiva, podem ocorrer diversas alterações regressivas, inclusive no SNC, que podem ser corrigidas por terapia hormonal substitutiva. No entanto, no caso de mulheres, a reposição hormonal não deve ser utilizada de forma aleatória, mas sim individualizada.

Neste trabalho, a determinação da dose ideal de hormônio, utilizada para a terapia de reposição hormonal em ratas por via oral (gavagem), foi determinada segundo o protocolo de Allen-Doisy (1923), que consiste na verificação de atrofia genital após a castração, seguida de reposição com 17β -estradiol, por via oral, com doses que variam de 0,1 a 100 μ g/animal. Após quatro dias, outro esfregaço vaginal foi

realizado, onde pudemos verificar o aparecimento de grande quantidade de células queratinizadas com a dose de 30 μ g/animal, o que demonstra uma ação estrogênica adequada (BARACAT & SIMÕES, 1998).

Para a determinação da dose ideal do acetato de medroxiprogesterona, foi utilizado o teste de Clauberg (1930). O teste consiste em repor inicialmente, após verificação de atrofia genital, a dose determinada anteriormente de 17 β -estradiol (30 μ g/animal) durante quatro dias. Em seguida, do quinto ao oitavo dia, foi administrada doses variáveis (1 a 10mg/animal, por gavagem) de acetato de medroxiprogesterona. Após este período, através de avaliação colpocitológica, pudemos verificar a presença de leucócitos, muco e células epiteliais (das três camadas uterinas) com a dose de 2mg/animal. Segundo Baracat & Simões (1998), estes dados confirmam o efeito positivo do teste de Clauberg.

Segundo a descrição do modelo de epilepsia induzido por pilocarpina (TURSKI e cols., 1983; LEITE e cols., 1990), a dose da droga pode variar de 300-380mg/kg. No entanto, neste trabalho foi padronizada a dose de 350mg/kg, para que este parâmetro não influenciasse na análise dos resultados.

No entanto, a latência para a obtenção da primeira crise após a injeção de pilocarpina varia, quando estudada em animais de diferentes sexos e idades. Nos machos, a primeira crise aparece entre 15-25 minutos (CAVALHEIRO, 1995), em fêmeas castradas entre 0,8-1,3 minutos e em fêmeas intactas entre 28-56 minutos (VALENTE e cols., 2002). Em fêmeas castradas, pudemos notar que a remoção dos ovários permitiu facilitação para o desenvolvimento da primeira crise.

A latência para o *status epilepticus* também sofre modificações dependentes do grupo de animais estudados. Em machos, o *status epilepticus* se inicia entre 50-60 minutos após a injeção de pilocarpina (CAVALHEIRO, 1995). Em fêmeas castradas se inicia entre 16-47 minutos e em fêmeas intactas entre 30-67 minutos (VALENTE e cols., 2002). Existe, então, uma similaridade entre a latência para o *status epilepticus* entre machos e fêmeas normais e a castração facilita a evolução das crises parciais para o *status epilepticus*.

A duração do período silencioso também é modificada dependendo dos animais estudados. Em machos, ela tem duração média de $14,8 \pm 3,0$ dias (CAVALHEIRO, 1995). Em fêmeas castradas, ela tem duração média de $10,12 \pm 4,45$ dias e em fêmeas epiléticas intactas de $49,67 \pm 12,9$ dias (VALENTE, 2000). Em fêmeas intactas, o período silencioso é mais longo do que o observado em machos e fêmeas castrados. Cavalheiro e cols., (1994) observaram que neste período há um desequilíbrio entre excitação e inibição, que pode refletir no grau de brotamento das fibras musgosas, uma vez que este é iniciado 4 dias após o *status epilepticus* (MELLO e cols., 1993). Em fêmeas intactas o brotamento das fibras musgosas aparece em menor grau e a latência para a primeira crise espontânea está aumentada. Pudemos ainda verificar que a retirada dos hormônios sexuais femininos, pela castração, facilita a obtenção da primeira crise espontânea e deixa o cérebro mais susceptível ao brotamento das fibras musgosas, uma vez que estes animais apresentam um maior grau de brotamento (VALENTE, 2000).

Arida e cols., (1999) estabeleceram o perfil das crises em ratos machos epiléticos que não foram submetidos a nenhum tratamento. Foi observado que estes animais apresentam maior frequência de crises no

período diurno, no qual os animais estão dormindo, e a frequência de crises aumenta a partir dos primeiros 15 dias após o estabelecimento do período crônico, com tendência a estabilização a partir da quinta quinzena (75 dias) de observação.

Em relação à frequência de crises em ratas epiléticas, foi visto por Valente (2000), que apesar de ter sido observada um aumento discreto na frequência de crises nas fêmeas que foram castradas ($5,4 \pm 2,7$ crises/semana), quando comparados as fêmeas intactas ($4,5 \pm 2,6$ crises/semana), essa diferença não foi significativa entre os grupos. Além disso, as crises são mais frequentes no período claro, o que confirma os achados de Arida e cols., (1999), previamente descritos.

Dando continuidade ao trabalho com fêmeas e com o intuito de verificar o papel dos hormônios na gênese da epilepsia, Pereira Jr (2001), utilizou ratas epiléticas que foram submetidas à castração na fase crônica do modelo e que foram submetidas à terapia de reposição hormonal com estrogênios conjugados eqüino. Foi verificado que os animais tratados com o hormônio apresentaram diminuição na frequência de crises durante o período de tratamento ($5,4 \pm 3,1$ crises/semana), quando comparados aos animais do grupo que recebeu apenas o veículo de diluição do hormônio ($8,1 \pm 3,2$ crises/semana). O efeito da reposição hormonal pode então ser confirmado, uma vez que o veículo de diluição do hormônio é inócuo não devendo, portanto, alterar a frequência de crises.

No presente trabalho, pudemos observar que a frequência de crises entre as fêmeas crônicas intactas ($6,4 \pm 3,7$ crises/semana) e as fêmeas castradas e crônicas ($6,6 \pm 3,9$ crises/semana) não apresentaram diferença significativa, quando comparadas entre si, o que confirma o

dado anteriormente descrito por Valente (2000), de que apenas a castração não modifica o padrão de crises na fase crônica do modelo.

O efeito da terapia de reposição hormonal no cérebro parece ser influenciado pelo tipo de reposição e pela duração do tratamento, entre outros fatores. Diferentes regimes ou vias de administração dos hormônios podem exercer diferentes efeitos na função cerebral (GENAZZANI e cols., 2002).

No presente trabalho, os animais castrados e crônicos que receberam somente reposição de 17β -estradiol também não apresentaram diferença significativa na frequência de crises durante o tratamento ($7 \pm 3,2$ crises/semana). Já nos animais castrados e crônicos que receberam reposição de acetato de medroxiprogesterona, a frequência de crises durante o tratamento foi reduzida para $5 \pm 2,8$ crises/semana, e nos animais castrados e crônicos, que receberam reposição de 17β -estradiol + acetato de medroxiprogesterona, a frequência de crises reduziu para $3,9 \pm 2,1$ crises/semana. Estes dados vão de encontro com os achados anteriores de que a progesterona tem papel anticonvulsivante na epilepsia, podendo diminuir o disparo neuronal (SMITH e cols., 1987), reduzindo as descargas epileptiformes, e elevando o limiar para as crises em muitos modelos de epilepsia (WOOLLEY & TIMIRAS, 1962; LANDGREN e cols., 1978; NICOLETTI e cols., 1985; LANDGREEN e cols., 1987).

Okasaki e cols., (1995) marcaram as células granulares do giro dentado e suas fibras com biocitina e puderam confirmar que o brotamento das fibras musgosas, forma um circuito excitatório recorrente aberrante após o *status epilepticus*, e a formação de conexões sinápticas recorrentes entre as células granulares do giro dentado pode

ter uma implicação importante para a fisiologia hipocampal e para a geração e propagação das crises. O efeito da reorganização sináptica na função hipocampal na epilepsia depende, em parte, do balanço entre a nova inervação das células granulares e dos interneurônios inibitórios (OKASAKI e cols., 1995). No entanto, existe uma dúvida muito discutível com relação ao que acontece no hipocampo, na epilepsia, seja em humanos ou animais. A questão é se a epilepsia é causa ou consequência do dano hipocampal. Há muitas controvérsias a esse respeito. No entanto, para Kalvianen & Salmenpera (2002), o dano nas estruturas do lobo temporal pode ser a união de ambas as coisas.

Lemos & Cavalheiro (1995), estudando a fase aguda do modelo de epilepsia induzido por pilocarpina, utilizando diazepam + pentobarbital para bloquear o *status epilepticus*, puderam verificar que o padrão de coloração de neo-Timm tem relação direta com a duração do *status epilepticus*. O grau do brotamento de fibras musgosas aumenta com o tempo, após o insulto epileptogênico, e atinge um platô após 100 dias da indução do *status epilepticus* e não aparecem nos animais controles, mesmo após o envelhecimento (MELLO e cols., 1993).

Em fêmeas castradas e epiléticas, o grau de brotamento de fibras musgosas é muito mais intenso do que em fêmeas intactas e epiléticas, onde o brotamento acontece com menor intensidade (VALENTE e cols., 2002). Isto mostra que, com a retirada dos hormônios reprodutivos, o processo ligado ao brotamento das fibras musgosas é intensificado, mostrando assim o papel importante dos hormônios na evolução desse processo.

Pereira Jr (2001), estudando o papel da reposição hormonal com estrogênios conjugados equino em fêmeas, que foram castradas durante

o período crônico do modelo, pode verificar que quando os animais epiléticos são castrados e recebem o hormônio, o grau de brotamento das fibras musgosas permanece similar ao dos animais que receberam apenas pilocarpina. Em contrapartida, os animais epiléticos e castrados que foram tratados com o veículo de diluição do hormônio (propilenoglicol), o grau de brotamento das fibras musgosas ficou mais intenso. Isto mostra que o estrogênio é capaz de estabilizar o brotamento das fibras musgosas, fazendo com que o processo não evolua.

No presente trabalho pudemos confirmar que, assim como descrito anteriormente por Mello e cols., (1993), os animais que não receberam pilocarpina, não apresentam brotamento das fibras musgosas e este mesmo padrão foi verificado mesmo após a castração.

Assim, como visto anteriormente por Valente e cols., (2002), as fêmeas castradas e epiléticas apresentam um grau de brotamento de fibras musgosas muito intenso, quando comparado aos animais apenas epiléticos. No entanto, os animais que foram submetidos à reposição hormonal com 17β -estradiol apresentam brotamento das fibras musgosas, que parece ser em um grau intermediário entre o das fêmeas castradas e epiléticas e das fêmeas apenas epiléticas (**FIGURAS 6 e 7**). Em contrapartida, nos grupos que receberam 17β -estradiol conjugado com o acetato de medroxiprogesterona, o brotamento das fibras musgosas parece ter sido estabilizado no mesmo nível em que se apresentam as fêmeas apenas epiléticas, mostrando que o desenvolvimento desse brotamento não progrediu. O mesmo pode ser visualizado nas fêmeas que receberam reposição apenas com acetato de medroxiprogesterona.

Mathern e cols., (1995; 1996) não encontraram correlação entre o brotamento de fibras musgosas e a frequência de crises. Apenas conseguiram correlacionar a densidade de brotamento, tanto em modelos animais quanto em humanos, com a perda neuronal no hilo do giro dentado. Estes achados foram confirmados mais tarde por Pitkänen e cols., (2000), que viram que a densidade de brotamento das fibras musgosas não está associada com a severidade da epilepsia. Outros achados também têm demonstrado uma dissociação entre o de brotamento de fibras musgosas e a ocorrência de crises. Estes estudos demonstram a presença de brotamento em cérebros sem que tenha havido a ocorrência de crises, tanto em humanos como em modelos animais (PITKÄNEN e cols., 2000). Além disso, o brotamento de fibras musgosas pode ser prevenido pela cicloheximida, mas mesmo assim, os animais desenvolvem epilepsia (LONGO e cols., 1997; 1998).

Estes dados vêm de encontro com os dados encontrados neste trabalho, pois apesar de ser encontrado um maior brotamento de fibras musgosas nas fêmeas castradas e epiléticas, a frequência de crises não se apresenta aumentada em relação às fêmeas apenas epiléticas e as fêmeas castradas que receberam reposição hormonal com 17 β -estradiol. No entanto, a frequência de crises está diminuída nos animais que receberam reposição de acetato de medroxiprogesterona e 17 β -estradiol + acetato de medroxiprogesterona, mas o brotamento de fibras musgosas se assemelha ao das fêmeas apenas epiléticas.

Além disso, ao contrário da epilepsia do lobo temporal em modelos experimentais, em humanos é comumente encontrado um substancial dano nas células granulares (BABB & PRETORIUS, 1993). Ao mesmo tempo, este dado indica que no cérebro epilético, o brotamento de fibras musgosas pode ser um fenômeno que ocorre em paralelo com a

ocorrência de crises, mas que não está diretamente relacionada com a geração de crises espontâneas (PITKÄNEN e cols., 2000).

Além do brotamento das fibras musgosas, a perda celular no hipocampo pode ser observada na fase crônica do modelo de epilepsia induzido por pilocarpina. De acordo com os resultados de Liu e cols., (1994), o grau de perda neuronal no modelo da pilocarpina é dose dependente e a vulnerabilidade dos neurônios do hipocampo segue a seguinte ordem: CA3>CA1>camada granular do giro dentado. Segundo esses autores, nos animais que receberam 350mg/kg, a densidade neuronal na região CA1 não sofre diminuição significativa. Já em CA3, foi observada perda neuronal de 10%. No giro dentado, não foi encontrada nenhuma alteração. Com a dose de 380 mg/kg, há redução significativa na densidade neuronal (10%) em CA1 e 25,5% em CA3. Na camada granular do giro dentado, não foi encontrada nenhuma alteração. Já com a dose de 400mg/kg, a redução na densidade neuronal foi de 33% em CA1 e 34,9% em CA3. Também não foi encontrada redução significativa nas células granulares do giro dentado.

Mello e cols., (1993), verificaram que existe correlação entre a perda celular em CA3 e a duração do período silencioso, isto é, há mais perda celular em CA3 quanto mais longo for o período silencioso.

Valente e cols., (2002) verificaram que a perda neuronal no corno de Amon é mais pronunciada em CA3, sendo que a densidade neuronal nas fêmeas castradas e epiléticas é de 49%, enquanto que nas fêmeas intactas epiléticas é de 55% em relação ao grupo controle (100%). Já em CA1, a densidade neuronal das fêmeas castradas e epiléticas é de 85%, enquanto que nas fêmeas intactas epiléticas é de 91%, quando comparadas ao grupo controle. Estes resultados sugerem que a retirada

dos hormônios reprodutivos femininos poderia estar facilitando o processo de perda neuronal nos animais que foram submetidos à castração.

O trabalho de Pereira Jr (2001) mostrou que a retirada dos hormônios reprodutivos femininos através da castração e depois de estabelecida a epilepsia, influencia o processo epileptogênico. Na fase crônica do modelo de epilepsia induzido por pilocarpina, os animais foram divididos em três grupos onde um deles permaneceu intacto (SRS), o outro foi castrado e submetido à terapia de reposição hormonal com estrogênios conjugados eqüino (SRS+CX+E) e o terceiro grupo foi castrado e submetido ao mesmo tratamento, apenas com o veículo de diluição do hormônio (SRS+CX+VEIC). Pode-se verificar que a densidade neuronal foi, para o grupo SRS, de 86% em CA1 e 53% em CA3. No grupo SRS+CX+VEIC, pudemos verificar uma densidade neuronal de 86,8% em CA1 e 53,6% em CA3 e para o grupo SRS+CX+E, 92,5% em CA1 e 74,9% em CA3, com base na densidade neuronal dos animais do grupo controle (100%). A partir destes dados pode-se verificar que os hormônios reprodutivos femininos têm um papel importante no processo epileptogênico.

Uma vez verificado que os hormônios reprodutivos femininos influenciam a epilepsia, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação do melhor esquema de terapia de reposição hormonal, a fim de melhorar o quadro de perda neuronal no hipocampo. Pudemos verificar, então, que a densidade neuronal é maior nos animais que receberam 17 β -estradiol + acetato de medroxiprogesterona, tanto em CA1 quanto em CA3, seguida da reposição hormonal apenas com acetato de medroxiprogesterona e em menor proporção com 17 β -estradiol. Foram utilizados como padrão de comparação os animais do grupo controle (estro). Desta forma pudemos verificar que a terapia de

reposição hormonal em ratas castradas é importante no processo epileptogênico, mas a sua efetividade é dependente do tipo de reposição pelo qual o animal é submetido.

Ainda na fase crônica, foi realizada imunohistoquímica contra parvalbumina, uma das proteínas ligantes de cálcio que tem sido usada para estudar as mudanças fisiológicas e patológicas dos neurônios. Tem sido sugerido que o cálcio pode estar envolvido na estimulação e exocitose das glândulas endócrinas e no funcionamento do tecido nervoso (DOUGLAS & RUBIN, 1962; TSIEN e cols., 1984). Além disso, o cálcio é indispensável para o transporte axoplasmático (HAMMERSCHLAG e col., 1975; IQBAL & OCHS, 1978) e pode também estar envolvido no aprendizado e memória (ECCLES, 1983; LYNCH & BAUDRY, 1984). Por outro lado, a elevação descontrolada na concentração de cálcio intracelular conduz a uma excessiva ativação celular e injúria que culminará em morte celular (CAMPBELL, 1983).

Sabendo-se que o estrogênio tem a capacidade de modular o sistema GABAérgico, um grande número de estudos têm confirmado o papel da associação entre os receptores de estrogênio e o fenótipo GABAérgico em algumas regiões do cérebro, como hipotálamo, hipocampo e tronco encefálico (ONDO e cols., 1982; WEILAND, 1992; GRATTAN e cols., 1996; MURPHY e cols., 1998).

Dando suporte as evidências de que a função dos receptores GABAérgicos pode ser modulada pelo estrogênio, Blurton-Jones & Tuszynski (2002) testaram a hipótese de que os receptores beta do estrogênio no córtex, amígdala, tronco encefálico e formação hipocampal são expressos nos interneurônio GABAérgicos. Então, verificaram a co-localização dos receptores beta do estrogênio em

associação com a proteína ligante de cálcio, a parvalbumina e puderam ver que a grande maioria dos neurônios que são imunorreativos ao receptor beta do estrogênio no córtex e hipocampo são inibitórios, uma vez que se co-localizam com os neurônios imunorreativos a parvalbumina.

Muitas regiões do cérebro, que sabidamente influenciam na memória e processos cognitivos exibem um número considerável de células imunomarcadas tanto para o receptor beta do estrogênio e como para a parvalbumina (BLURTON-JONES & TUSZYNSKI, 2002). A partir destes dados, e tentando explicar o papel dos hormônios reprodutivos na função GABAérgica, este trabalho teve como objetivo, testar a hipótese de Blurton-Jones & Tuszynski (2002) e verificar se o tratamento com hormônios é capaz de mudar a fisiologia hipocampal, alterando a via GABAérgica e tendo como resposta a diminuição da frequência de crises. Para verificar a presença de proteínas ligantes de cálcio (parvalbumina) foi feita imunohistoquímica em todos os grupos de estudo.

Pudemos verificar que a imunorreatividade contra a parvalbumina nas diferentes regiões da formação hipocampal sofre flutuações, mostrando uma ciclicidade na expressão desta proteína, nas diferentes fases do ciclo estral. No entanto, Blurton-Jones & Tuszynski (2002), apesar de não terem dado ênfase às variações cíclicas na expressão de receptor beta do estrogênio durante o ciclo estral, acreditam que a expressão deste receptor pode ser influenciada pelo estado hormonal.

Segundo Blurton-Jones & Tuszynski (2002), a castração não altera significativamente os níveis do receptor beta de estrogênio. No entanto, na imunohistoquímica contra a parvalbumina pudemos verificar, neste

trabalho, que em ratas castradas a imunomarcação é similar ao proestro em CA1 e CA3 e diminui no giro dentado, mostrando um padrão de marcação que chega bem próximo ao encontrado nas ratas na fase de estro.

Pudemos verificar também que em ratas epilépticas e ratas castradas e epilépticas, a imunomarcação aumenta consideravelmente com relação aos animais do grupo controle em estro. Quando os animais são submetidos ao tratamento de reposição hormonal, a imunomarcação para parvalbumina fica mais pronunciada, especialmente nos animais que receberam reposição hormonal com 17 β -estradiol e acetato de medroxiprogesterona. Desta forma, podemos confirmar os dados da literatura que mostram que os hormônios esteróides são capazes de agir no sistema nervoso central, através de ligações alostéricas nos receptores GABA_A (MELLOM e cols., 2001; FOLESSA e cols. 2001).

Gyermek e cols., (1968) já sugeriam que a progesterona e seus metabólitos apresentam propriedades sedativas e anestésicas em alguns animais e isso já tinha sido observado em humanos por Merryman e cols., (1954). Então, foi feita a relação entre o potencial sedativo da progesterona com o seu provável efeito anti-crisis.

Muitos mecanismos têm sido propostos para explicar as propriedades anti-crise da progesterona. Um dos mecanismos amplamente estudado, é a interação da progesterona com o sistema GABAérgico, através de seus metabólitos, que têm efeito modulatório e direto no complexo receptor GABA_A (BELELLI e cols., 1989; MAJEWSKA e cols., 1992; PAUL e cols., 1992; ORCHINIK e cols., 1993; LAMBERT e cols., 1995).

Pudemos verificar, então, que o melhor regime de reposição hormonal para ratas portadoras de epilepsia é aquele em que se conjuga 17β -estradiol com acetato de medroxiprogesterona. No entanto, a reposição apenas com acetato de medroxiprogesterona, também apresenta um efeito benéfico para ratas portadoras de epilepsia, porém menos pronunciado que na conjunção dos dois hormônios. Seguindo do efeito da reposição com 17β -estradiol.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, B., LEE, M. FAHNESTOCK, M. RACINE, R.J. - Long-term potentiation trains induce mossy fiber sprouting. **Brain Res 775**: 193 - 197, 1997.

ALLEN, E. and DOISY, E.A. - An ovary hormone: Preliminary report on its localization, extraction, and partial purification and action in test animals. **JAMA 81**: 819-821, 1923.

ALONSO-SOLEIS, R., ABREU, P., LOPEZ-COVIELLA, I., HERNANDEZ, G., and FAJARDO, N. - Gonadal steroids modulation of neuroendocrine transduction: a transynaptic view. **Cell Mol. Neurobiol. 3**: 357-382, 1996.

AMADO, D & CAVALHEIRO, E.A . - Hormonal and gestacional parameters in female rats submitted to the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy Res., 32**: 266-274, 1998.

AMADO, D. - Disfunção Hormonal no Modelo de Epilepsia Induzido pela Pilocarpina. **São Paulo, 1996. (Tese de Doutorado - Escola Paulista de Medicina).**

AMADO, D.; CAVALHEIRO, E.A. & BENTIVIGLIO, M. - Epilepsy and hormonal regulation: the patterns of GnRH and galanin immunoreactivity in the hypothalamus of epileptic female rats. **Epilepsy Res., 14**: 149-159, 1993.

ARIDA, R.M., SCORZA, F.A., PERES, C.A., CAVALHEIRO, E.A. - The course of untreated seizures in the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy Res.** **34**: 99-107, 1999.

ARNOLD, A.P. - Brain and Behavior in Vertebrates, **In: Hormones.** Ed. Balthazart, J. Karger, Basel, p. 82-91, 1990.

AVANZINI, G. and FARRIELLO, R. - Animal models of epilepsy. In: AVANZINI, G., REGESTA, G., TANGANELLI, P., AVOLI, M. (Eds) Molecular and cellular targets for anti-epileptic drugs. John Libbey & Company Ltda, **London**: 91-109, 1997.

BABB, T.L.; KUPFER, W.R.; PRETORIUS, J.K.; CRANDLL, P.H.; LEVESQUE, M.F. - Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. **Neuroscience**, **42**: 351-363, 1991.

BABB, T.L.; PRETORIUS, J.K.; KUPFER, W.R.; CRANDLL, P.H.- Glutamate decarboxylase-immunoreactive neurons are preserved in human epileptic hippocampus. **J. Neurosci**, **9**: 2562-2574, 1989.

BABB, T.L., PRETORIUS, J.K., MELLO, L.E., MATHERN, G.W., LEVESQUE, M.F. - Synaptic reorganization in epileptic human and rat kainate hippocampus may contribute to feedback and feedforward excitation. **Epilepsy Res. Suppl 9**: 193-202, 1992.

BABB, T.L., PRETORIUS, J.K. - Pathologic substrates of epilepsy. In: Wylie E, ed. The treatment of epilepsy: principles and practice. **Philadelphia**: Lea & Febiger, 55-70, 1993.

BACKSTROM, T. – Epileptic seizures in women related to plasma estrogen and progesterone during the menstrual cycle. **Acta Neurol. Scand.** **54**: 321-347, 1976.

BACKSTROM, T. & ROSCISZEWSKA, D. - Effects of hormones on seizures expression. In: Engel, J., Jr, Pedley, T.A. (Eds.), **Epilepsy: A comprehensive textbook**. Lippincott Raven, Philadelphia, pp. 2003-2012, 1997.

BACKSTROM, T.; ZETTERLUND, B.; BLOM, S. & ROMANO, M. – Effects of intravenous progesterone infusion on the epileptic discharge frequency in women with partial epilepsy. **Acta Neurol. Scand.**, **69**: 240-248, 1984.

BAIMBRIDGE, K.G., MILLER, J.J. - Immunohistochemical localization of calcium-binding protein in the cerebellum, hippocampal formation and olfactory bulb of the rat. **Brain Res.** **245**: 223-229, 1982.

BARACAT, E.C, HAIDAR, M.A., RODRIGUES de LIMA, G. - Síndrome do climatério: aspectos atuais. **Ars. Curand** **24**: 9-16, 1991.

BARACAT, E.C., SIMÕES, M.J. - Standardization of the dose-effects of oral estrogens and progesterons in adult rats. **9th Meeting of the North American Society**, Toronto, Canadá, 1998.

BARBACCIA, M.L., ROSCETTI, G., TRABUCCHI, M., MOSTALLINO, M.C., CONCAS, A., PURDY, R., BIGGIO, G. - Time-dependent changes in rat brain neuroactive steroids concentration and GABA_A receptor function after acute stress. **Neuroendocrinology** **63**: 166-172, 1996.

BARBACCIA, M.L., ROSCETTI, G., TRABUCCHI, M., PURDY, R., MOSTALLINO, M.C., CONCAS, A.,, BIGGIO, G. - The effects of inhibitors of GABAergic transmission and stress on brain and plasma allopregnanolone concentration. **Br. J. Pharmacol.** **120**: 1582-1588, 1997.

BARNES, A., HAJIBEIGL, A., TRENT, A., MASON, A. - Expression of steroids metabolizing enzymes by aggregation fetal brain cells in culture: a model for developmental regulation of the progesterone 5- α -reductase pathway. **Endocrinology** **127**: 500-504, 1990.

BARTUS, R.T., DEAN, R.L., BEER, B. - The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. **Science**, **217**: 408-417, 1982.

BAULIEU, E.E. - Neurosteroids: a novel function of the brain. **Psychoneuroendocrinology** **23**: 963-987, 1998.

BAULIEU, E.E. - **Recent Prog. Horm. Res.** **52**: 1-32, 1997.

BEER, A.E. and BILLINGHAM, R.E. - Maternal immunological mechanism during pregnancy. **Ciba Found Symp** **64**: 293-322. 1979.

BELELLI, D., BOLGER, M.B., GEE, K.W. - Anticonvulsant profile of the progesterone metabolites 5 α -pregnan-3 α -ol-20-one. **Eur. J. Pharmacol.** **166**: 325-329, 1989.

BEN ARI, Y.; LAGOWSKA, J.- Epileptogenic action of intra-amygdaloid injection of kainic acid. **CR Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D**, **287**: 813-816, 1978.

BEN ARI, Y.; TREMBLAY, E.; OTTERSEN, O.P. AND MELDRUM, B.S. - The role of epileptic activity in hippocampal and remote cerebral lesions induced by kainic. **Brain Res.** **191**: 79-97, 1980.

BEN ARI, Y.; TREMBLAY, E.; OTTERSEN, O.P.- Injections of kainic acid into the amygdala complex of the rat: electrographic, clinical and histological study in relation to the pathology of epilepsy. **Neuroscience**, **5**: 515-528, 1980.

BEN ARI, Y.; TREMBLAY, E.; RICHIE, D.; GHILINI, G.; NAQUET, R. - Electrography, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline or pentetrazole: metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. **Neuroscience**, **6**: 1361-91, 1981.

BEN-ARI, Y.; TREMBLAY, E.; OTTERSEN, O.P. AND NAQUET, R. - Evidence suggesting secondary epileptogenic lesions after kainic acid: pretreatment with diazepam reduces distant but not local brain damage. **Brain Res.** **165**: 362-365, 1979.

BEYENBURG, S., STOFFEL-WAGNER, B., BAUER, J., WATZKA, M., BLÜMCKE, I., BIDLINGMAIER, F. and ELGER, C.E. - Neuroactive steroids and seizures susceptibility. **Epilepsy Res.** **44**: 141-153, 2001.

BICIKOVA, M. DIBBELT, L., HILL, M., HAMPL, R., STRARKA, L. - Allopregnanolone in women with premenstrual syndrome. **Horm. Metab. Res.** **30**: 227-230, 1998.

BIGGIO, G., BARBACCIA, M.L., FOLESSA, P., SERRA, M., PURDY, R.H., CONCAS, A. - Neurosteroids and GABA_A receptors plasticity. In: D.L.

Martin, R.W. Olsen (Eds.), **GABA in the Nervous System: The View at Fifty Years**, Lippincott Williams & Williams, New York, pp. 207-232, 2000.

BITRAN, D., PURDY, R.H., KELLOGG, C.K. - Anxiolytic effect of PROG is associated with increase in cortical allopregnanolone and GABA_A receptor function. **Pharmacol. Biochem. Behav.** **45**: 423-428, 1993.

BITRAN, D., SHIEKH, M., McLEOD, M. - Anxiolytic effect of progesterone is mediated by the neurosteroid allopregnanolone at brain GABA_A receptors. **J. Neuroendocrinol.** **7**: 171-177, 1995.

BITRAN, D., FOLEY, M., AUDETTE, D., LESLIE, N., FRYE, C.A. - Activation of peripheral mitochondrial benzodiazepine receptors in the hippocampus stimulates allopregnanolone synthesis and produces anxiolytic-like effects in the rat. **Psychopharmacology** **151**: 64-71, 2000.

BLUMCKE, I.; BECK, H.; SCHEFFLER, B. e cols. – Altered distribution of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptor subunit GluR2(4) and N- methyl-D-aspartate receptor subunit NMDAR1 in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. **Acta Neuropathol (Berl)**, **92**: 576-587, 1996.

BLUMCKE, I.; WOLF, H.K.; MORRISON, J.H.; WIESTLER, O.D. – Regional distribution of the AMPA glutamate receptor subunits GluR2(4) in human hippocampus. **Brain Res.**, **682**: 239-244, 1995.

BLURTON-JONES, M & TUSZYNSKI, M.H. - Estrogen receptor-beta colocalizes extensively with parvalbumin-labeled inhibitory neurons in the cortex,

amygdala, basal forebrain, and hippocampal formation of intact and ovariectomized adult rats. **J Comp Neurol** **452**: 276-287, 2002.

BOUCHET, C. and CAZAUVIEILH, D. - De l'épilepsie considérée dans ses rapports avec l'aliénation mentale. **Arch. Gén. Méd.** **9**: 510-542, 1825.

BOURNEVILLE, D.M. - Recherches cliniques et thérapeutiques sur l'épilepsie et l'hystérie. Paris: Delahaye, 1876.

BRENNER, C. & MERRITT, H.H. - Effect of certain choline derivatives on electrical activity of the cortex. **Arch. Neurol. Psychiatr.**, **48**, 382-395, 1942.

BUTERBAUGH, G.G. - Acquisition of amygdala-kindled seizure in female rats: relationship between the effect of estradiol and intramygdaloid electrode location. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **28**: 291-297, 1987a.

BUTERBAUGH, G.G. - Estradiol replacement facilitates the acquisition of seizures kindled from the anterior neocortex in female rats. **Epilepsy Res.** **4**: 207-215, 1989.

BUTERBAUGH, G.G. - Postictal events in amygdala-kindled female rats: with and without estradiol replacement. **Exp. Neurol.**, **95**: 697-713, 1987b.

CALDWELL, B.M. & WATSON, R.I. - Evaluation of psychological effects of Sex hormones administration in aged women results of therapy after 6 months. **J. Gerontol.** **7**: 228-244. 1952.

CAMPBELL, S. & WITEHEAD, M. - Oestrogen therapy and the menopausal syndrome. **Clin. Obstet. Gynecol.** **4**: 31-47. 1977.

CASSELL, M.D., BROWN, M.W. - The distribution of Timm's stain in the nonsulphide-perfused human hippocampal formation. **J. Comp Neurol.** **222**: 461-471, 1984.

CAVALHEIRO, E.A. & BENTIVOGLIO, M.- Changes in parvalbumin and calbindin D28K immunoreactivity in rat brain following pilocarpine-induced seizures. **Exp. Brain Res.**, **20**: 131-135, 1991.

CAVALHEIRO, E.A.; FERNANDES, M.J.; TURSKI, L.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G.- Neurochemical changes in the hippocampus of rats with spontaneous recurrent seizure. In: Engel, J. Jr.; Wasterlain, C.; Cavalheiro, E.A.; Heinemann, U.; Avanzini, G. (eds.)- **Molecular Neurobiology of Epilepsy**. Elsevier,; 239-248, 1992.

CAVALHEIRO, E.A.; FERNANDES, M.J.; TURSKI, L.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G.- Spontaneous recurrent seizures in rats: amino acids and monoamine in the hippocampus. **Epilepsia**, **35**: 1-11, 1994.

CAVALHEIRO, E.A.; LEITE, J.P.; BORTOLOTTO, Z. A., TURSKI, W.A., IKONOMIDOU, C., TURSKI, L - Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. **Epilepsia**, **32**: 778-782, 1991.

CAVALHEIRO, E.A.; RICHE, D.A. AND LEGAL LA SALLE G. - Long-term effects of intrahippocampal kainic acid injection in rats: a method for

inducing spontaneous recurrent seizures. **EEG Clin. Neurophysiol.** **53**: 581-589, 1982.

CAVALHEIRO, E.A.; SANTOS, N.F. ; PRIEL, M.R.- The pilocarpine of epilepsy in mice. **Epilepsia**, **37(10)**: 1015-1019, 1996.

CAVALHEIRO, E.A., CALDERAZZO FILHO, L.S., RICHE, D., FELDBLUN, S., LEGAL LA SALLE, G. - Amygdaloid lesion increases the toxicity of intrahippocampal kainic acid injection and reduces the late occurrence of spontaneous recurrent seizures in rats. **Brain Res.** **262(2)**: 201-207, 1983.

CAVALHEIRO, E.A. - The pilocarpine model of epilepsy. **Ital. J. Neurol. Sci.** **16**: 33-37, 1995.

CAMPBELL, A.K. - Intracellular Calcium. John Wiley, Chichester, 1983.

CARRAZANA, E., de TOLEDO, J., TATUM, W., RIVAS-VASQUEZ, R., REY, G., WHEELER, S. - Epilepsy and religious experience: Voodoo possession. **Epilepsia** **40(2)**: 239-241, 1999.

CELIO, M.R. - Parvalbumin in most gamma-aminobutyric acid-containing neurons of the rat cerebral cortex. **Science** **231**: 995-997. 1986.

CENDES, F. AND KOBAYASHI E. – **Epilepsia do Lobo Temporal em: Epilepsia** C. Guerreiro, M. M. Guerreiro, F. Cendes e I.L. Lopes (eds). Lemos Editorial & Gráficos Ltda, São Paulo, SP, Brasil pp 201-213, 2000.

CHAUDIEU, I.; RONDOUIN, G.; CHICHEPORTICHE, M.; CHICHEPORTICHE, R.-
Presynaptic alteration of [3H]GABA transport in hippocampus by
amygdala kindling. **Neurosci Lett.**, **76**: 329-334, 1987.

CHATFIELD, P. and DEMPSEY, E.W. - Some effects of prostigmine and
acetylcholine on cortical potentials. **Am. J. Physiol.**, **135**: 633-640, 1942.

CINTRA, A., FUXE, K. HARFSTRAND, A., AGNATI, L.F., MILLER, L.S., GREENE,
J.L., GUSTAFSSON, J.A. - On the cellular localization and distribution of
estrogen receptors in the rat tel- and diencephalon using monoclonal
antibodies to human estrogen receptor. **Neurochem Int** **8**: 587-595,
1986.

CLAUBERG, C.W. - Zur Physiologie und Pathologie de Sexual hormone, im
Besonderen des Hormons des Corpus luteum. I. Der biologische Test für
das Luteumhormon (das spezielle Hormon des Corpus luteum) am
infantilen Kaninchen. **Zentralblatt für Gynäkologie, Leipzig** **54**: 2757-
2770, 1930.

CLARK, L., PROUT, T. – Status epilepticus: a clinical and pathological study
in epilepsy. **Am. J. Insanity**, **60**: 291-306. 1903/04.

COLLING, S.B., KHANA, M., COLLINGE, J., JEFFERYS, J.G. - Mossy fiber
reorganization in the hippocampus of prion protein null mice. **Brain
Res.** **755**: 28-35, 1997.

COMMISSION ON TERMINOLOGY OF THE INTERNATIONAL LEAGUE
AGAINST EPILEPSY (ILAE). A proposed international classification of
epileptic seizures. **Epilepsia** **5**: 297-306. 1964.

- CONCAS, A., MOSTALLINO, M.C., PORCU, P., FOLLESA, P., BARBACCIA, M.L. TRABUCCHI, M., PURDY, R.H., GRISENT, P., BIGGIO, G. - Role of brain allopregnanolone in plasticity of γ -aminobutyric acid type A receptors in rat brain during pregnancy and after delivery. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95**: 13284-13289, 1998.
- COVEY, D.F., EVERS, A.S., MENNERICK, S., ZORUMSKI, C.F. and PURDY, R.H.- Recent development in structure-activity relationships for steroid modulator of GABA_A receptors. **Brain Res. Rev. 37**: 91-97, 2001.
- COYLE, J.T.- Kainic acid: insights into excitatory mechanisms causing selective neuronal degeneration. **Ciba Found Symp, 126**: 186-203, 1987.
- COYLE, J.T. , BIRDS, S.J., EVANS, R.H. - Excitatory amino acid neurotoxin: selectivity, specificity, and mechanism of action. Based on NRP one-day Conference Held. June 30, 1980. **Neurosci. Res. Program. Bull, 19**: 1-427, 1981.
- COYLE, J.T., PRICE, D.L., DELONG, M.R. - Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. **Science. 219**: 1184-1190, 1983.
- CRAIG, C.R. - Anticonvulsant activity of steroids: separability of anticonvulsant from hormonal effects. **J. Pharmacol. Exp. Ther. 153**: 337-353, 1966.
- CUMMINGS, L.N.; GIUDICE, L. AND MORRELL, M.J. - Ovulatory function in epilepsy. **Epilepsia, 36**: 353-357, 1995.
- DALY, E., GRAY, A., BARLOW. - Measuring the impact of menopausal symptoms on quality of life. **Br. Med. J. 307**: 836-840, 1993.

DELORENZO, R.J., TOWNE, A. R., PELLOCK, J.M. AND KO, D. – Status epilepticus in children, adults, and the elderly. **Epilepsia** **33 (Suppl. 4)**: S15-S25, 1992.

DELORENZO, R.J., TOWNE, A.R., KO, D. AND DRISCOLL, S. – Mortality and seizures duration in status epilepticus [Abstract]. **Ann. Neurol.**, **22**: 132, 1987.

DIAMANTOPOULOS, N and CUNRINE, P.K. - The effect of puberty on the course of epilepsy. **Arch. Neurol.** **43**: 873-876, 1986.

DITKOFF, E.C., CRARY, W.G., CRISTO, M. and LOBO, R.A. – Estrogen improves psychological function in asymptomatic post-menopausal women. **Obstet. Gynecol.** **78**: 991-995, 1991.

DOUGLAS, W.W. & RUBIN, R.P. - The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. **J. Physiol.** **159**: 40-57, 1962.

DUFF, S.J., HAMPSON, E.A. - Beneficial effect of estrogen on working memory in postmenopausal women taking hormone replacement therapy. **Horm. Behav.** **38(4)**: 262-276, 2000.

ECCLES, J.C. - calcium in long term potentiation as a model for memory. **Neuroscience** **10**: 1071-1081, 1983.

EDWARDS, E.H.; BURNHAM, W.M.; MENDONÇA, A.; BOWLBY, D. A. & MacIUSKY, N. J. - Steroid hormones affect limbic afterdischarge thresholds and kindling rates in adults female rats. **Brain Res.**, **838**: 136-150, 1999.

ENGEL, J.Jr. – Epileptic syndromes. In: Seizure and Epilepsy. Philadelphia: **F.A. Davis Company**: 340-379, 1989.

ENGEL, J. Jr. - Introduction to temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Res. 26**: 141-150, 1996.

ENGEL, J.Jr. ILAE Commission Report. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: Report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. **Epilepsia 42 (6)**: 796-803, 2001.

ETGEN, A. M. & KARKANIAS, G.B. - Estrogen regulation of noradrenergic signaling in the hypothalamus. **Psychoneuroendocrinology 19**: 603-610, 1994.

FEDOR-FREYBERGH, P. - The influence of oestrogen on well being and mental performance in climateric and post-menopausal women. **Acta Obstet Gynaecol. Scand. 64**: 5-69, 1977.

FISHER, R.S. – Animal models of epilepsies. **Brain Res.**, **14**: 245-278, 1989.

FLÜGGE, G., OERTEL, W.H, WUTTKE, W. - Evidence for estrogen-receptive GABAergic neuron in preoptic/anterior hypothalamic area of the rat brain. **Neuroendocrinology 43**: 1-5, 1986.

FOLLESA, P., CONCAS, A., PORCU, P., SANNA, E., SERRA, M., MOSTALLINO., M.C., PURDY, R.H. BIGGIO, G. - Role of allopregnanolone in regulation of GABA_A receptor plasticity during long-term exposure to and withdrawal from progesterone. **Brain Res Rev 37**: 81-90, 2001.

FOLLESA, P., SERRA, M., CAGETTI, E., PISU, M.G., PORTA, S., FLORIS, S., MASSA, F., SANNA, E., BIGGIO, G. - Allopregnanolone synthesis in cerebellar granule cells: role in regulation of GABA_A receptor expression and function during progesterone treatment and withdrawal. **Mol. Pharmacol.** **57**: 1262-1270, 2000.

FREEMAN, E., PURDY, R.H., COUTIFARIS, K.R., PAUL, S.M. - Anxiolytic metabolites of progesterone: correlation with mood and performance measures following oral progesterone administration to healthy female volunteers. **Neuroendocrinology** **58**: 478-484, 1993.

FREUND, T.F., ANTAL, M. - GABA-containing neurons in the septum control - inhibitory interneurons in the hippocampus. **Nature** **336**: 170-173, 1988.

FRYE, C.A. - The neurosteroid 3 α , 5 α -THP has anti-seizures and possible neuroprotective effects in an animal model of epilepsy. **Brain Res.** **696**: 113-120, 1995.

GEE, K.W., McCAULEY, L.D., LAN, N.C. - **Critic. Rev. Neurobiol.** **9**: 207-227, 1995.

GENAZZANI, A. R., PETRAGLIA, F., CLEVA, M. - Norgestimate increases pituitary and hypothalamic concentration of immunoreactive beta-endorphin. **Contraception** **5**: 605-613, 1989.

GENAZZANI, A.R., MONTELEONE, P. & GAMBACCIANI, M. - Hormonal influence on the central nervous system. **Maturitas** **43 (Suppl. 1)**: S11-S17, 2002.

GENAZZANI, A.R., PETRAGLIA, F., MERCURI, N. - Effect of steroids hormones and antihormone on hypothalamic beta-endorphin concentration in intact and castrated female rats. **J. Endocrinol. Invest.** **13**: 91-96, 1990.

GEULA, C.; JARVIE, P.A.; LOGAN, T.C.; SLEVIN, J.T.- Long-term enhancement of K⁺- evoked release of L-glutamate in entorhinal kindled rats. **Brain Res.**,**442**: 368-372, 1988.

GIBBS, R.B. & AGGARWAL, P. - Estrogen and basal forebrain cholinergic neuron: implication for brain aging and Alzheimer's disease-related cognitive decline. **Horm. Behav.** **34(2)**: 98-111, 1998.

GILBERT, M.E.-The NMDA-receptor antagonist, MK-801, suppresses limbic kindling and kindled seizure. **Brain Res**, **463**: 90-99, 1988.

GODDARD, G.V. -Development of epileptic seizure through brain stimulation at low intensity. **Nature**, **214**: 1020-1021, 1967.

GODDARD,G.V.; MCINTYRE, D.C.; LEECH, C.K.- A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. **Exp. Neurol.**, **25**: 295-330, 1969.

GOULD, E., WOOLLEY, C.S., FRANKFURT, M. – Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cell in adulthood. **J. Neurosci.** **10**: 1286-1291, 1990.

GRATTAN, D.R., ROCCA, M.S., STRAUSS, K.I., SAGRILLO, C.A., SELMANOFF, M., MCCARTHY, M.M. - GABAergic neuronal activity and mRNA levels for both forms of glutamic acid decarboxylase (GAD65 and GAD67) are reduced in the diagonal band of Broca during the afternoon of proestrus. **Brain Res. 733**: 46-55, 1996.

GROSSMAN, S.P.- Chemically induced epileptiform seizures in the cat. **Science, 142**: 409-411, 1963.

GRUDZINKA, B.; KAZIBUTOWSKA, Z.; MIERZWA, E.; PIERZCHATA, K.; ROSCIZEWSKA, D. & ZAWISKA, L. – Rozrodczość w populacji kobiet chorych na padaczkę. **Neur. Neurochir. Pol., 13(5)**: 497-502, 1979.

GRUENTHAL, M. - Electroencephalographic and histological characteristics of a model of limbic status epilepticus permitting direct control over seizures duration. **Epilepsy Research 29**: 221-232, 1998.

GUERREIRO, C.A.M.; GUERREIRO, M.M.; CENDES, F. E LOPES-CENDES, I.- **Considerações gerais em: Epilepsia**. Carlos A.M. Guerreiro, Marilisa M. Guerreiro, Fernando Cendes, Iscia Lopes Cendes (eds) Lemos Editorial, São Paulo, SP p. 1-10, 2000.

GYERMEK, L., IRIARTE, J., CRABBLE, P. - Structure-activity relationship of some steroidal hypnotic agents. **J. Med. Chem. 11**: 117-125, 1968.

HACKMAN, B.W. & GALBRAITH, D. - Six month study of oestrogen therapy with piperazine oestrone sulfate and its effects on memory. **Curr. Med. Res. Opin. (suppl.)**: 21-27, 1977.

- HALBREICH, U.- Role of estrogen in postmenopausal depression. **Neurology 48 (Suppl. 7):** S16-S20, 1997.
- HALL, S.M.- Treatment of menstrual epilepsy with a progesterone-only oral contraceptive. **Epilepsia, 18:** 235-236, 1977.
- HAMMERSCHLAG, R., ANAT, D.R., CHIU, A.G. - Mechanism of axonal transport: a proposed role calcium ions. **Science 188:** 273-275, 1975.
- HART, S.A., PATTON, J.D., WOOLLEY, C.S. - Quantitative analysis of ER alpha and GAD colocalization in the hippocampus of the adult female rats. **J. Comp. Neurol 440:** 144-155, 2001.
- HAUSER, W.A. & KURLAND, L.T.- The epidemiology of epilepsy in Rochester, Minnesota, 1935 though 1937. **Epilepsia, 16:** 1-66, 1975.
- HEINEMANN, U.; STABEL, J.; RAUSCHE, G.- Activity-dependent ionic changes and neuronal plasticity in rat hippocampus. **Prog. Brain Res., 83:** 197-241, 1990.
- HENDRY, S.H., JONES, E.G., EMSON, P.C., LAWSON, D.E., HEIZMANN, C.W., STREIT, P. - Two classes of cortical GABA neurons defined by differential calcium binding protein immunoreactivities. **Exp Brain Res 76:** 467-472, 1989.
- HENDERSON, V.W. & BUCHWALTER, J.G. - Cognitive deficits in men and women with Alzheimer disease. **Neurology 44:** 90-96, 1994.

HERBISON, A.E., FÉNELON, V.S. - Estrogen regulation of GABAA receptor subunit mRNA expression in preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis of female rat brain. **J. Neurosci 15**: 2328-2337, 1995.

HERBISON, A.E., AUGOOD, S.J., SIMONIAN, S.X., CHAPMAN, C. - Regulation of GABA transporters activity and mRNA expression by estrogen in rat preoptic area. **J. Neurosci 15**: 8302-8309, 1995.

HERZOG, A.G. - A hypothesis to integrate partial seizures of temporal lobe origin and reproductive disorder. **Epilepsy Res. 3**: 151-159, 1989.

HERZOG, A.G. - Progesterone therapy in women with complex partial and secondary generalized seizures. **Neurology, 45**: 1660-0662, 1995.

HERZOG, A.G. - Progesterone therapy in women with epilepsy: a 3-year follow-up. **Neurology 52**: 1917-1918, 1999a.

HERZOG, A.G. - Psychoneuroendocrine aspects of temporolimbic epilepsy. Part I. Brain, reproductive steroids and emotions. **Psychosomatics 40**: 95-101, 1999b.

HERZOG, A.G. - Psychoneuroendocrine aspects of temporolimbic epilepsy. Part II. Epilepsy and reproductive steroids. **Psychosomatics 40**: 102-108, 1999c.

HERZOG, A.G., KLEIN, P., RANSIL, B.J. - Three patterns of catamenial epilepsy. **Epilepsia 38**: 1082-1088, 1997

HERZOG, A.G. - Reproductive endocrine considerations and hormonal therapy for women with epilepsy. **Epilepsia, 32**: 827-833, 1991.

HERZOG, A.G.; SEIBEL, M.M.; SCHOMER, D.L.; VAITUKAITIS, J.L. GESCHWIND, N. - Reproductive endocrine disorders in women with partial seizures of temporal lobe origin. **Arch Neurol.** **43**: 341-346, 1986.

HIPPOCRATES. On the sacred disease. In: U.o. Chicago (eds) 10 - Hippocrates and Galen. Chicago: **Encyclopedia Britannica**: 154-160, 1952.

HOLZBAUER, M. & YODIN, M.B.H. - The oestrous cycle and monoamine oxidase activity. **Br J. Pharmacol.** **48**: 600-608, 1973.

HUSSEIN, A. e cols., - **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **94**: 1521-1526, 1997

ISOKAWA, M. - Preservation of dendrites with the presence of reorganized mossy fiber collateral in hippocampal dentate granule cells in patients with temporal lobe epilepsy. **Brain Res.** **744**: 339-343, 1997.

IQBAL, Z. and OCHS, S. - Fast axoplasmic transport of a calcium-binding protein in mammalian nerve. **J. Neurochem.** **31**: 409-418, 1978.

JOELS, M. - Steroids hormones and excitability in the mammalian brain. **Front. Neuroendocrinol.** **18**: 2-48, 1997.

JONES, S.M.; JOHNSON, K.M. - Effects of amygdaloid kindling on NMDA receptor functional and regulation. **Exp. Neurol.**, **106**: 52-60, 1989.

JONES, K.J. - Ann. N. Y. Acad. Sci. 743: 141-164, 1994.

KALVIAINEN R, and SALMENPERA T. - Do recurrent seizures cause neuronal damage? A series of studies with MRI volumetry in adults with partial epilepsy. **Prog Brain Res.135:** 279-95, 2002.

KARAVOLAS, H.J., HODGES, D.R., O'BREIN, D.J., MACKENZIE, K.M. - In vivo uptake of (3H)-progesterone and (3H)-5 α -dihydroprogesterone by rat brain and pituitary and effects of estradiol and time: tissue concentration of progesterone itself or specific metabolites? **Endocrinology 104:** 1418-1425, 1979.

KEMPPAINEN, S., PITKÄNEN, A. - Distribution of parvalbumin, calretinin, and calbindin-D (28K) immunoreactivity in the rat amygdaloid complex and colocalization with gamma-aminobutyric acid. **J. Comp Neurol. 426:** 441-467, 2000

KLEIN, P. & HERZOG, A. G. – **Endocrine aspects of partial epilepsy.** In: Pretel S.; Knigge, K.M.; Prasad, A. eds. MCH and seizures: neuromolecular and neuroendocrine aspects. Trivandrum, India: Research Signpost, 1997.

KOKATE, T.G., BANKS, M.K., MAGEE, T., YAMAGUCHI, S. and ROGAWSKI, M.A. - Finasteride, a 5 α -reductase inhibitor, blocks the anticonvulsant activity of progesterone in mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther. 288:** 679-684, 1999.

KOKATE, T.G., SVENSSON, B.E., ROGAWSKI, M.A. - **J. Pharmacol. Exp. Ther. 270:** 1223-1229, 1994.

KOSAKA, T., KATSUMARU, H., HAMA, K., WU, J.Y., HEIZMANN, C.W. - GABAergic neurons containing the Ca²⁺ - binding protein

parvalbumin in the rat hippocampus and dentate gyrus. **Brain Res** **419**: 119-130, 1987.

KUIPER, G.G., ENMARK, E., PELTO-HUIKKO, M. NILSSON, S., GUSTAFSSON, J.A. - Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proc Natl Acad Sci USA** **93**: 5925-5930, 1996.

KUIPER, G.G., CARLSSON, B., GRADIEN, K., ENMARK, E., HAGGBLAD, J., NILSSON, S., GUSTAFSSON, J.A. - Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . **Endocrinology** **138**: 863-870, 1997.

LAIDLAW, J. - Catamenial epilepsy. **Lancet**, **271**: 1235-1237, 1956.

LAMBERT, J.J., BELELLI, D., HILL-VENNIG, C., PETERS, J.A. – Neurosteroids and GABA_A receptors function. **Trends Pharmacol. Sci.** **16**: 295-303, 1995.

LANDGREN, S., AASLY, J., BÄCKSTRÖM, T., DUBROVSKY, B., and DANIELSSON, E. - The effects of progesterone and its metabolites on the interictal epileptiform discharge in the cat's cerebral cortex. **Acta Physiol. Scand.** **131**: 33-42, 1987.

LANDGREN, S., BACKSTRON, T., KALISTRATOV, G. - The effects of progesterone on the spontaneous interictal spike evoked by the application of penicillin to the cat's cerebral cortex. **J. Neurol. Sci.** **36**: 119-133, 1978.

LANGLEY, J.N. – Observations on the physiological action of extracts of the supra-renal bodies. **J. Physiol. (Lond.)**, **27** : 237-256, 1901.

LANGLEY, J.N. & KATO, T. – The physiological action of physostigmine and its action on denervated skeletal muscle. **J. Physiol.(Lond.)**, **49**: 410-431, 1915.

LAWRENCE, A.D. & SAHAKIAN, B.J. - Alzheimer disease, attention, and the cholinergic system. **Alzheimer Dis. Assoc. Disord.** **9(2)**: 43-49, 1995.

LEITE, J.P.; BORTOLOTTI, Z.A.; CAVALHEIRO, E.A.- Spontaneous recurrent seizures in rats: and experimental model of partial epilepsy. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, **14**: 511-517, 1990.

LEMOS, T. & CAVALHEIRO, E.A. - Reorganização sináptica e ocorrência de crises espontâneas em ratos. **J. Liga Bras. Epil.**, **5** : 135-138, 1992.

LEMOS, T. & CAVALHEIRO, E.A. - Suppression of pilocarpine-induced *status epilepticus* and the late development of epilepsy in rats. **Exp. Brain Res.** **102**: 423-428, 1995.

LEPHART, E.D. - Brain 5 α -reductase: cellular, enzymatic, and molecular perspective and implications for biological function. **Mol. Cell. Neurosci.** **4**: 473-484, 1993.

LI, X., SCHWARTZ, P.E., RISSMAN, E.F. - Distribution of estrogen receptor- β -like immunoreactivity in rat forebrain. **Neuroendocrinology** **66**: 63-67, 1997.

LIU, Z., NAGAO, T., DESJARDINS, G.C., GLOOR, P., AVOLI, M. - Quantitative evaluation of neuronal loss in the dorsal hippocampus in rats with long-term pilocarpine seizures. **Epilepsy Res.** **17**: 237-247, 1994.

LIMOZIN-LAMOTHE, M., MAIRON, N., LEGAL, J. - Quality of life after the menopause: influence of hormones replacement therapy. **Am J Obstet Gynecol 170**: 618-624, 1994.

LOGOTHETIS, J. and HARNER, R. - Electro cortical activation by estrogens. **Arch. Neurol. 3**: 290-297, 1960.

LOGOTHETIS, J., HARNER, R., MORRELL, F. and TORRES, F. - Thre role of estrogens in catamenial exacerbation of epilepsy. **Neurology 9**: 352-360, 1959.

LONGO, B.M. AND MELLO, L.E.M.- Blokade of pilocarpine or kainate-induced mossy fiber sprouting by cycloheximide does not prevent subsequent epileptogenesis in rats. **Neurosci. Letters 226**: 163-166, 1997.

LONGO, B.M. AND MELLO, L.E.M. Supragranular mossy fiber sprouting is not necessary for spontaneous seizures in the intrahippocampal kainate model of epilepsy in the rat. **Epilepsy Res. 32**: 172-182, 1998.

LOTHMAN, E.W., REMPE, D.A., MANGAN, P.S. - Changes in excitatory neurotransmission in the CA1 region and dentate gyrus in a chronic model of temporal lobe epilepsy. *J. Neurophysiol.* 74: 841-848, 1995.

LOWENSTEIN, D.H. – Status epilepticus: an overview of the clinical problem. **Epilepsia, 40(Suppl.1)**: S3-S8, 1999.

LUCAS, D.R. and NEWHOUSE, J.P. - The toxic effects of sodium glutame on the inner layer of the retina. **Archs. Opthal. 58**: 193-204, 1976.

LÜDERS, H, ACHARYA, J., BAUMGARTNER, C., BENBADIS, S., BLEASEL, A . BURGESS, R., DINNER, D.S., EBNER, A . FOLDARY, N., GELLER, E., HAMER, H., HOLTHAUSEN, H., KOTAGAL, P., MORRIS, H., MEENCKE, H.J.,

NOACHTAR, S., ROSENOW, F., SAKAMOTO, A . STEINHOFF, B.J., TUXHORN, I. and WYLLIE E. - Semiological seizures classification. **Epilepsia** **39**: 1006-1013, 1998.

LYNCH, G., and BAUDRY, M. - The biochemistry of memory: a new and specific hypothesis. **Science** **224**: 1057-1063, 1984.

MACLEAN, P.D. & DELGADO, J.M.R.- Electrical and chemical stimulation of frontotemporal portion of limbic system in the walking animal. **Electroenceph. Clin. Neurophysiol.**, **5**: 91-100, 1953.

MAJEWSKA, M.D. – Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of GABA_A receptor. Mechanism of action and physiological significance. **Prog. Neurobiol.** **38**: 379-395, 1992.

MASON, C.R. AND COOPER, R.M. - A permanent change in convulsive threshold in normal and brain damage rats with repeated small doses of pentylenetetrazol. **Epilepsia** **13**: 663-74, 1972.

MATHERN, G.M.; BABB, T.L., PRETORIUS, J.K. AND LEITE, J.P.- Reactive synaptogenesis and neuron density for neuropeptide Y, somatostatin, and glutamate decarboxylase immunoreactivity in the epileptogenic human fascia dentate. **J. Neurosci.****15**: 3990-4004, 1995.

MATHERN, G.M.; BABB, T.L., MISCHEL, P.S. - Childhood generalized and mesial temporal epilepsies demonstrate different amounts and patterns of hippocampal neuron loss and mossy fiber synaptic reorganization. **Brain** **119**: 965-987, 1996.

MATHERN, G.W.; LEITE, J.P.; BABB, T.L. e cols.- Aberrant hippocampal mossy fiber sprouting correlates with greater NMDAR2 receptor staining. **Neuroreport**, **7**: 1029-1035, 1996.

MATHERN, G.W. ; PRETORIUS, J.K.; MENDONZA, D. e cols. - Hippocampal N-methyl-d-aspartate receptor subunit mRNA levels in temporal lobe epilepsy patients. **Ann Neurol**, **46**: 343-358, 1999.

McCARTHY, M.M., KAUFMAN, L.C., BROOKS, P.J., PFAFF, D.W., SCHWARTZ-GIBLIN, S. - Estrogen modulation of mRNA levels for two forms of glutamic acid decarboxylase (GAD) in female rat brain. **J Comp Neurol**. **360**: 685-697, 1995.

McNAMARA, J.O.; BONHAUS, D.W.; SHIN, C.- Epilepsy. Models, Mechanisms, and Concepts. **University Press, Cambridge**, 1993.

MELCANGI, R.C. & PANZICA, G. – introduction. **Brain Res. Rev.** **37**: 1-2, 2001.

MELDRUM, B.S- Amino acid neurotransmitters new approaches to anticonvulsivant drug action. **Epilepsia**: 140-149, 1984.

MELDRUM, B.S. - GABAergic mechanisms in the pathogenesis and treatment of epilepsy. **Br. J Clin Pharmacol.** **27**: S3-S11, 1989.

MELLO, L.E.A.; CAVALHEIRO, E.A.; TAN, A.M.; KUPFER, W.R.; PRETORIUS, J.K.; BABB, T.L and FINCH, D.M.- Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. **Epilepsia** **34(6)**: 985-995, 1993.

MELLON, S.H. – Neurosteroids: biochemistry, models of action, and clinical relevance. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** **78**: 1003-1008, 1994.

MELLON, S.H., GRIFFIN, L.D. and COMPAGNONE, N.A. – Biosynthesis and action of neurosteroids. **Brain Res. Rev.** **37**: 3-12, 2001.

MENSAH-NYAGAN, A., DO-REGO, J.L., BEAUHEAN, D., LUU-THE, V., PELLETIER, G. and VAUDRY, H. - Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. **Pharmacol. Rev.** **51**: 63-81, 1999.

MERRYMAN, W., BOIMAN, R., BARNES, L., ROTHCHILD, I. - Progesterone 'anesthesia' in human subjects. **J.Clin. Endocrinol. Metab.** **14**: 1567-1569, 1954.

MILLER, F.R.; STVRAKY, G.W.; WOONTON, G.A.- Effects of escrine, acetylcholine and atropine on the on the electrocorticogram. **J. Neurophysiol.**,**3**: 131-138, 1938.

MORREL, M.J. - Hormones and epilepsy through the lifetime. **Epilepsia** **33(4)**: S49-S61, 1992.

MORRELL, M. J. – Sexual dysfunction in epilepsy. **Epilepsia**, **32**: S38-S45, 1991.

MORRELL, M. P., SPERLING, M. R., STECKER, M., DICHTER, M. A. – Sexual dysfunction in partial epilepsy: a deficit in physiological sexual arousal. **Neurology** **44**: 243-247, 1994.

MORRELL, M.J. - Epilepsy in women: the science of why it is special. **Neurology** **53(1)**: S42-S48, 1999.

MOSSELMAN, S., POLMAN, J., DIJKEMA, R. - ER- β : Identification and characterization of a novel human estrogen receptor. **FEBS Lett** **92**: 49-53, 1996.

MURPHY, D.D., COLE, N.B., GREENBERGER, V., SEGAL, M. - Estradiol increases dendritic spines density by reducing GABA neurotransmission in hippocampal neurons. **J. Neurosci.** **18**: 2550-2559, 1998.

NADLER J.V.; PERRY B.W. AND COTMAN C.W. - Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. **Nature** **271**: 676-677, 1978.

NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G.; BELLISSIMO, M.I.; CAVALHEIRO, E.A.- Profile of prostaglandin levels in the rat hippocampus in pilocarpine model of epilepsy. **Neurochem In.** **27(6)**: 461-466, 1995.

NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G; ARGAÑARAZ G.A; PORCIONATTO, M.A; SCORZA, F.A; AMADO. D; SILVA, R., BELLISSIMO. M.I.; NADER, H.B. AND CAVALHEIRO, E.A.- Selective alteration of glycosaminoglycan synthesis and proteoglycan expression in rat cortex and hippocampus in pilocarpine-induced epilepsy. **Brain. Res. Bull** **50**: 229-239, 1999.

NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G.; FUNKE, M.G.; SANABRIA, E.R.G. AND CAVALHEIRO, E.A. Growth associated phosphoprotein expression is increased in the supragranular region of the dentate gyrus following pilocarpine-induced epilepsy. **Neuroscience** **91**: 485-492 , 1999.

NICOLETTI, F., SPECIALE, C., SORTINO, M.A., SUMMA, G., CARUSO, G., PATTI, F., CANONICO, P.L. - Comparative effects of estradiol benzoate, the antiestrogen clomiphene citrate, and the progestin medroxyprogesterone acetate on kainic acid-induced seizures in male and female rats. **Epilepsia** **26(3)**: 252-257, 1985.

OKASAKI, M.M., EVENSON, D.A., NADLER, J.V. - Hippocampal mossy fiber sprouting and synapse formation after status epilepticus in rats: visualization after retrograde transport of biocytin. **J. Comp. Neurol.** **352**: 515-534, 1995.

ONDO, J., MANSKY, T., WUTTKE, W. - In vivo GABA release from the medial preoptic area of diestrous and ovariectomized rats. **Exp Brain Res** **46**: 69-72, 1982.

OLNEY, J.W.; FULLER, T.; GUBAREFF, T. - Acute dendrotoxic changes in the hippocampus of kainate treated rats. **Brain Res.**, **176**: 91-100, 1979.

ORCHINIK, M., McEWEN, B.S. - Novel and classical actions of neuroactive steroids. **Neurotransmissions** **9**: 1-6, 1993.

PAPPAS, T.C., GAMETCHU, B., WATSON, C.S. - Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded ligand binding. **FASEB J.** **9**: 404-410, 1994.

PAUL, S.M., PURDY, R.H. - Neuroactive steroids **FASEB J.** **6**: 2311-2322, 1992.

PEREIRA Jr., M. - O efeito do estrogênio sobre a epilepsia do lobo temporal farmacologicamente induzida - **São Paulo, 2001 (Tese de Mestrado - Escola Paulista de Medicina).**

PFAFF, D.W. - Estrogen and brain function. **New York:** Springer-Verlag, 1980.

PHILLIPS, S., SHERWIN, B.B. - Effects of estrogen on memory function in surgically menopausal women. **Psychoneuroendocrinology 17:** 177-187, 1992.

PICAZO, O., FERNÁNDEZ-GUASTI, A. - Anti-anxiety effects of progesterone and some of its reduced metabolites: an evaluation using the burying behavior test. **Brain Res. 680:** 135-141, 1995.

PITKÄNEN, A., NISSINEN, J., LUKASIUK, K., JUTILA, L., PALJÄRVI, L., SALMENPERÄ, T., KARKOLA, K., VAPALAHTI, M., YLINEN, A. - Association between the density of mossy fiber sprouting and seizures frequency in experimental and human temporal lobe epilepsy. **Epilepsia 41(Suppl. 6):** S24-S29, 2000.

PRATT, W.B., TOFT, D.O. - **Endocrine Rev. 18:** 306-360, 1997.

PRICHARD, J.; GALLAGHER, B.E AND GLASER, G. - Experimental seizure-threshold testing with fluorothyl. **J. Pharmacol. Exp. Ther. 166:** 170-178, 1969.

RACINE, R.- Kindling: the first decade. **Neurosurgery, 3:** 234-252, 1978.

RACINE, R., TUFF, L.; ZAIDE, J.- kindling, unit discharge patterns and neuronal plasticity. **Can. J. Neurol. Sci.**, 2: 395-405, 1975.

REDDY, D.S. and ROGAWSKI, M.A. - Enhanced anticonvulsant activity of ganaxolone after neurosteroid withdrawal in a rat model of catamenial epilepsy. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 294: 909-915, 2000a.

REDDY, D.S. and ROGAWSKI, M.A. - Chronic treatment with the neuroactive steroid ganaxolone in the rat induces anti-convulsant tolerance to diazepam but not to itself. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 295: 1241-1248, 2000b.

REN, J.Q. - Stereological analysis of GABAergic neurons and calcium binding protein parvalbumin-containing neurons in the somatosensory cortex. **Fukuoka Igaku Zasshi** 82: 659-670, 1991.

RODRIGUES de LIMA, G., BARACAT, E.C. - Síndrome do climatério. **In: Ginecologia Endócrina.** (1Ed) Atheneu, São Paulo, p. 253-267, 1995.

ROMEO, E., STRÖHLE, S., SPALLETTA, G., di MICHELE, F., HERMANN, B., HOLSBOER, F., PASINI, A., RUPPRECHT, R. - Effects of antidepressant treatment on neuroactive steroids in major depression. **Am. J. Psychiatry** 155: 910-913, 1998.

ROSCIZEWSKA, D.; BUTNER, B.; GUZ, I. & ZAWISZA, L. - Ovarian hormones, anticonvulsant drugs and seizures during the menstrual cycle in women with epilepsy. **J. Neurol. Neurosurg. Psych.**, 49: 47-51, 1986.

ROSCIZEWSKA, D.; DUDKIEWICZ, J. & BLECHARZ, A. - Poziom hormonu luteinizującego (LH) w surowicy krwi w cyklu miesięcznym u kobiet

leczonych z powodu padaczki. **Neur. Neurochir. Pol.**, **19**: 205-210, 1985.

RUPPRECHT, R. & HOLSBOER, F. – Neuroactive steroids: mechanism of action and neuropharmacological perspectives. **Trends Neurosci.** **22**: 410-416, 1999a.

RUPPRECHT, R. and HOLSBOER, F. - Neuropsychopharmacological properties of neuroactive steroids. **Steroids** **64**: 83-91, 1999b.

SANTOS, O V. B. – Determinação imunohistológica de receptores de estrogênio em material fixado: avaliação crítica em carcinomas ductais de mama – **São Paulo, 1991. (Tese de Doutorado – Escola Paulista de Medicina).**

SARTORELLI, J.C - Modificação da expressão de proteínas fosforiláveis no resíduo de tirosina no hipocampo de ratas submetidas ao modelo de epilepsia induzido por pilocarpina. **São Paulo, 2001 (Tese de Mestrado - Escola Paulista de Medicina).**

SAVER, J.L., and RABIN, J. - The neural substrate of religious experiences. **J. Neuropsychol. Clin. Neurosci.** **9**: 498-510, 1997.

SCHUMACHER M, ROBEL P, BAULIEU EE. - Development and regeneration of the nervous system: a role for neurosteroids. **Dev Neurosci.** **18(1-2)**: 6-21, Review, 1996.

SJOSTRAND, T. - Potential changes in the cerebral cortex of rabbit arising from cellular activity and the transmission of impulses in the white matter. **The Journal of Physiol. (Lond)** **90**: 41-45, 1937.

SERRA, M., PISU, M.G., LITTERA, M., PAPI, G., SANNA, E., TUVERI, F., USALA., L., PURDY, R.H., BIGGIO, G. - Social isolation-induced decrease in both the abundance of neuroactive steroids and GABA_A receptors function in rat brain. **J. Neurochem.** **75**: 732-740, 2000.

SHERWIN, B.B. - Estrogen and/or androgen replacement therapy and cognitive functioning in surgically menopausal women. **Psychoneuroendocrinology** **13**: 345-357, 1988.

SHERWIN, B.B. - Hormones, mood, and cognitive functioning in post-menopausal women. **Obstet Gynecol.**, **87**: S20-S26, 1996.

SHERWIN, B.B. - The impact of different doses estrogen and progestin on mood and sexual behavior in post-menopausal women. **J. Clin. Endocrinol. Metabol.** **72**: 336-343, 1991.

SHERWIN, B.B., PHILLIPS, S. - Estrogen and cognitive functioning in surgically menopausal women. **Ann. NY Acad. Sci.** **592**: 474-475, 1990.

SHINOZAKI, H. & KONISHI, S.- Actions of several anti-helminthics and insecticides on rat cortical neurons. **Brain Res.**,**24**: 368-371, 1970.

SHORVON, S.D. -Epidemiologia, classificação, História natural e genética da epilepsia. In: Costa, J.C. (ed). **Epilepsy: A Lancet Review**, The Lancet, London, 1990.

SHORWON, S. - Status epilepticus: its clinical features and treatment in children and adults. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 1994.

SHUGHRUE, P.J., MERCHENTHALER, I. - Distribution of estrogen receptor beta immunoreactivity in rat central nervous system. **J Comp Neurol** **436**: 64-81, 2001.

SHUGHRUE, P.J., KOMM, B., MERCHENTHALER, I. - The distribution of estrogen receptor β mRNA in the rat hypothalamus. **Steroids** **61**: 678-681, 1996.

SHUGHRUE, P.J., LANE, M.V., MERCHENTHALER, I. - Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. **J Comp Neurol** **388**: 507-525, 1997.

SHUPNIK, M.A., GORDON, M.S., CHIN, W.W. - Tissue specific regulation of rat estrogen receptor mRNAs. **Mol Endocrinol** **3**: 660-665, 1989.

SILVA, I. - Efeito do estrogênio, progestagênio e do tamoxifeno sobre o perfil e a densidade sináptica do hipocampo de ratas adultas castradas. **São Paulo, 1999. (Tese de Mestrado - Escola Paulista de Medicina).**

SILVA, I., MELLO, L.E.A.M., FREYMÜLLER, E., HAIDAR, M.A. and BARACAT, E. C. - Onset of estrogen replacement has a critical effect on synaptic density of CA1 hippocampus in ovariectomized adult rats. **Menopause**, **10 (5)**: 406-411, 2003.

SIMERLY, R.B., CHANG, C., MURAMATSU, M., SWANSON, L.W. - Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: An in situ hybridization study. **J Comp Neurol**. **294**: 76-95, 1990.

SKIPPER, J.K., YOUNG, L.J., BERGERON, J.M., TETZLAFF, M.T., OSBORN, C.T., CREWS, D. - Identification of an isoform of the estrogen receptor

messenger RNA lacking exon four and present in the brain. **Proc Natl Acad Sci USA 90**: 7172-7175, 1993.

SLOVITER, R.S.- Permanently altered hippocampal structures, excitability and inhibition after experimental status epilepticus in the rats "dormant basket cell" hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy. **Hippocampus 1**: 41-46, 1991.

SMITH, S.S., WATERHOUSE, B.D. and WOODWARD, D.J. - Locally applied progesterone metabolites alter neuronal responsiveness in the cerebellum. **Brain Res. Bull. 18**: 739-747, 1987.

SMITH, S.S., WATERHOUSE, B.D. and WOODWARD, D.J. - Locally applied estrogen potentiate glutamate-evoked excitation of cerebellar Purkinje cells. **Brain Res. 475**: 272-282, 1988.

SMITH, S.S. - Estradiol administration increase neuronal responses to excitatory amino acids as a long term effect. **Brain Res. 503**: 354-357, 1989.

SMITH, S.S., GONG, Q.H., LI, X., MORAN, M.H., BITRAN, D., FRYE, C.A., HSU, F.C. - Withdrawal from 3α -OH- 5α -pregnan-20-one using a pseudopregnancy model alters the kinetic of hippocampal GABA_A - gated current and increase the GABA_A receptor α 4 subunit in association with increase anxiety. **J. Neurosci. 18**: 5275-5284, 1998.

SOMMER, W. - Erkrankung des ammonshorns als aetiologisches moment der epilepsie. **Arch Psychiatr Nervenkr 10**: 631-675, 1880.

SPERK, G. LASSMANN,H.; BARAN, H; KISH, S.J.; SEITELBERGER, F.; HORNYKIEWICS, O.- Kainic acid induced seizures: neurochemical and histopathological changes. **Neuroscience**, **10**: 1301-1315, 1983.

SPEROFF, L. GLASS, R.H., KASE, N.H. - Clinical gynecological endocrinology and infertility. 5th edn. Baltimore MA, USA: Williams & Wilkins, 1995.

STITT, S.L. and KINNARD, W.J. - The effect of certain progestin and estrogen on the threshold of electrically induced seizures patterns. **Neurology** **18**: 213-216, 1968.

STOFFEL-WAGNER, B., BEYENBURG, S., WATZKA, M., BLÜMCKE, I., BAUER, J., SCRAMM, J., BIDLINGMAIER, F. and ELGER, C.E. - Expression of 5 α -reductase and 3 α -hydroxysteroid oxidoreductase in the hippocampus of patients with chronic temporal lobe epilepsy. **Epilepsia** **41**: 140-147, 2000.

STRÖHLE, S., ROMEO, E., HERMANN, B., PASINI, A., SPALLETTA, G., di MICHELE, F., HOLSBOER, F., RUPPRECHT, R., - Concentration of 3 α -reduced neuroactive steroids and their precursors in plasma of patients with major depression and after clinical recovery. **Biol. Psychiatry** **45**: 274-277, 1999.

TAKEMOTO, T.- Isolation and structural identification of naturally occurring excitatory amino acids. In: **Kainic Acid as a Tool in Neurobiology**. McGeer,E.G.; Olney, J.W. and McGeer, P.(Eds.). Raven Press, New York: 1-15, 1978.

TAUCK, D.L. & NADLER, J.V.- Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated animals. **J. Neurosci.** **5**: 1016-1022, 1985.

THIND, K.K., GOLDSMITH, P.C. - Expression of estrogen and progesterone receptors in glutamate and GABA neurons of the puberal female monkey hypothalamus. **Neuroendocrinology** **65**: 314-324, 1997.

TORAN-ALLERAND CD. - The estrogen/neurotrophin connection during neural development: is co-localization of estrogen receptors with the neurotrophins and their receptors biologically relevant? **Dev Neurosci.** **18(1-2)**: 36-48. Review. 1996.

TSIEN, R.Y., POZZAN, T., RINK, T.J. - Measuring and manipulating cytosolic calcium with trapped indicator. **Trends Biochem. Sci.** **4**: 263-266, 1984.

TSUTSUI, K., UKENA, K., USUI, M., SAKAMOTO, H., TAKASE, M. - Novel brain function: biosynthesis and action of neurosteroids in neurons. **Neurosci. Res.** **36**: 261-273, 2000.

TUFF, L.P.; RACINE, R.J; ADAMEC, R.- The effects of kindling on GABA-mediated inhibition in the dentate gyrus of the rat. I. paired-pulse depression. **Brain Res.**, **277**: 79-90, 1983.

TURSKI L.; CAVALHEIRO E.A.; SEEKLUCKA-DZIUBA, M.; IKONOMIDOU, TURSKI, C.; CZUCZWAR, S.J. AND TURSKI, W. A. - Seizure produced by pilocarpine: Neuropathological sequelae and activity of glutamate decarboxylase in rat forebrain. **Brain Res.**, **398**: 37-48, 1986.

TURSKI, W.A.; CZUCZWART, S.J.; KLEINROK, Z. AND TURSKI, L. - Cholinomimetic produce seizures and brain damage in rats. **Experientia 30**: 1408-1411, 1983.

TURSKI, W.A.; CAVALHEIRO, E.A.; BARTOLOTTA, Z.A., MELLO, L.E.; SCHWARZ, M.; TURSKI, L.- Seizures produced by pilocarpine in mice: A behavioural, electroencephalographic and morphological analysis. **Brain Res.**, **321**: 237-253, 1984.

TURSKI, W.A.; CAVALHEIRO, E.A.; SCHWARZ, M.; CZUCSWAR, S.J.; KLEINROK, Z. & TURSKI, L. – Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: A behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behav. Brain Res.**, **9**: 315-335, 1983.

UZUNOVA, V., SHELINE, Y., DAVIS, J.M., RASMUSSEN, A., UZUNOV, D.P., COSTA, E., GUIDOTTI, A. - Increase in the cerebrospinal fluid content of neurosteroids in patients with unipolar major depression who are receiving fluoxetine or fluvoxamine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95**: 3239-3244, 1998.

VALENTE, S.G.- Efeito da castração na fisiopatologia da epilepsia do lobo temporal: estudo em ratas submetidas ao modelo de epilepsia induzido por pilocarpina. **São Paulo, 2000. (Tese de Mestrado – Escola Paulista de Medicina).**

VALENTE, S.G.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G.; PEREIRA, M.; SILVA, I; SANTOS, N.F; BARACAT E.C.; CAVALHEIRO, E.A. AND AMADO, D.- Castration in female rats modifies the development of pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy Res. 49**: 181-188, 2002.

VONGHER, J.M., FRYE, C.A. - Progesterone in conjunction with estradiol has neuroprotective effects in an animal model of neurodegeneration. **Pharmacol. Biochem. and Behav.** **64(4)**: 777-785, 1999.

WALTER, P., GREEN, G., KRUST, A., BORNERT, J.M., JELTSCH, J.M., JENSEN, E., SCRACE, G., WALTERFIELD, M., CHAMBON, P. - Cloning of the human estrogen receptor cDNA. **Proc Natl Acad Sci USA** **82**: 7889-7893, 1985.

WEBBER, M. P., HAUSER, W. A., OTTMAN, R., ANNERGERS, J. F. – Fertility in person with epilepsy. **Epilepsia.** **27**: 746-752, 1986.

WEHBA, S., deLUCA, L.A., ALDRIGHI, S.M. - Terapêutica hormonal no climatério: indicações, esquema de tratamento, resultados, contra-indicações e repercussões endometriais. **I Reunião do Grupo de Estudo sobre o Climatério (SOBRIC)**, São Paulo, 1988.

WEIGEL, NL. - Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. **BiochemJ.** **319(Pt3)**:657-67, Review, 1996.

WEILAND, N.G. - Glutamic acid decarboxylase messenger ribonucleic acid is regulated by estradiol and progesterone in the hippocampus. **Endocrinology** **131**: 2697-2702, 1992.

WILSON, S. – **Neurology**. Baltimore: Williams & Williams, 1940.

WILLIAMS, P.A.; WUARIN, J.P.; DOU, P. FERRARO, D.J. AND DUDEK F.E.- Reassessment of the effects of clyclohemide on mossy fiber sprouting and epileptogenesis in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **J. Neurophysiol.** **88**: 2075-2087, 2002.

WOLF, H.K. & WIESTLER, O.D. – Surgical pathology of chronic epileptic seizure disorders. **Brain Pathol. 3**: 371-380, 1993.

WOOLLEY, C. S. & SCHWARTZKROIN, P. A. – Hormonal effects on the brain. **Epilepsia, 39 (Suppl. 8)**: S2-S8, 1998.

WOOLLEY, C. S.; McEWEN, B. S. – Estradiol regulates hippocampal dendritic spine density via an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism. **J Neurosci. 14**: 7680-7687, 1994.

WOOLLEY, C. S.; McEWEN, B. S. – Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in rats. **J Comp Neurol. 336**: 293-306, 1993.

WOOLLEY, C.S. - Effects of estrogen in the CNS. **Curr. Opin. Neurobiol. 9**: 349-354. 1999.

WOOLLEY, C.S. - Estradiol facilitates kainic acid-induced, but not fluorothyl-induced, behavioral seizures activity in adult female rats. **Epilepsia 41**: 510-515, 2000.

WOOLLEY, C.S. & McEWEN, B.S.- Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat.- **J. Neurosci., 12(7)**: 2549-2554, 1992.

WOOLLEY, C.S., GOULD, E., FRANKFURT, M. – Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. **J Neurosci. 10**: 4035-4039, 1990.

WOOLEY, D.E. and TIMIRAS, P.S. - The gonad-brain relationship: effects of female sex hormones on electroshock convulsions in the rats. **Endocrinology 70**: 196-209, 1962.

WOUTERLOOD, F.G., van DERDEREN, J.C., van HAEFTEN, T., WITTER, M.P. - Calretinin in the entorhinal cortex of the rat: distribution, morphology, ultrastructure of neurons, and co-localization with gamma-aminobutyric acid and parvalbumin. **J Comp Neurol 425**: 177-192, 2000.

YACUBIAN, E.M. - **Tratamento Medicamentoso das Epilepsias**. Lemos Editorial, São Paulo, 1999.

YACUBIAN, E.M. - **Proposta da classificação das crises e síndromes epilépticas - correlação vídeo-eletrencefalográfica**. In: Avaliação de pacientes com epilepsia de difícil controle medicamentoso, uma visão prática e crítica. Brasil, 2002.

YAMADA, N; BILKEY, D.K- Kindling-induced persistent alterations in the membrane and synaptic properties of CA1 pyramidal neurons. **Brain Res., 561**: 324-331, 1991.

ZIMMER, J, - Changes in the Timm sulfide silver staining pattern of the rat hippocampus and fascia dentata following early postnatal deafferentation. **Brain Res 64**: 313-326, 1973.

ZIMMER, J. - Long-term synaptic reorganization in rat fascia dentata deafferented at adolescent and adult stages: observation with the Timm method. **Brain Res. 76**: 336-342, 1974 .

7 - SUMMARY

The epilepsy model, induced by pilocarpine, in females was described by Amado et al., (1993) and was been used to understand the effect of hormones in epileptogenesis. Therefore this work was as objective, to study the function of sexual hormones in the epilepsy model induced by pilocarpine in castrated rats. We use as groups: (a) controls animals (estrus, metaestrus, diestrus, proestrus and castrated), (b) experimental animals, that was received pilocarpine and it was studied in the chronic phase of the model (normal chronic and castrated chronic) and (c) castrated animals, that in the chronic phase it was submitted to the hormonal replace therapy (castrated chronic treated with medroxiprogesterone acetate, castrated chronic treated with 17β -estradiol and castrated chronic treated with medroxiprogesterone acetate + 17β -estradiol. We could verify that all the castrated animals were genital atrophy 4 days of the surgical procedure. Moreover, all the animals that were received pilocarpine presented spontaneous recurrent seizures in the chronic phase. The study of the hippocampal distribution of parvalbumine showed that the staining for this protein presents fluctuations during the phases from the estrous cycle and presents greater staining in the group of castrated rats that was received medroxiprogesterone acetate + 17β -estradiol. In the frequency of seizures the best treatment after the castration was that one where medroxiprogesterone acetate + 17β -estradiol. However, animals that received the replacement only medroxiprogesterone acetate also was reduction of the number of seizures. Moreover, the hormonal treatment also was capable os stabilize the sprouting mossy fibers, showing the importance of these hormones in the development of the epilepsy in females rats.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)