

VICTOR LEÃO DA SILVA ANTUNES

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES DE
ESTROGÊNIO NO HIPOCAMPO DE RATOS WISTAR COM
EPILEPSIA INDUZIDA POR PILOCARPINA**

**Trabalho apresentado à Universidade Federal de
Santa Catarina, como requisito para a conclusão
do Curso de Graduação em Medicina.**

**Florianópolis
Universidade Federal de Santa Catarina
2007**

VICTOR LEÃO DA SILVA ANTUNES

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES DE
ESTROGÊNIO NO HIPOCAMPO DE RATOS WISTAR COM
EPILEPSIA INDUZIDA POR PILOCARPINA**

**Trabalho apresentado à Universidade Federal de
Santa Catarina, como requisito para a conclusão
do Curso de Graduação em Medicina.**

**Coordenador do Curso Medicina: Prof. Dr. Maurício Pereima
Professor Orientador: Prof. Dr. Roger Walz, MD, PhD
Co-orientadora: Cláudia Pinto Figueiredo, Msc**

**Florianópolis
Universidade Federal de Santa Catarina
2007**

Antunes, Victor Leão da Silva.

Expressão dos receptores de estrogênio no hipocampo de ratos Wistar com epilepsia induzida por Pilocarpina. / Victor Leão da Silva Antunes – Florianópolis, 2007.

46p.

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Universidade Federal de Santa Catarina -- Curso de Graduação em Medicina.

Palavras Chaves: 1. Epilepsia do Lobo Temporal. 2. Estrogênio.
3. Imunohistoquímica. 4. Hipocampo.

Dedico este trabalho aos meus amados pais, irmão e Claudia Figueiredo que por meio de amor, carinho e compreensão me deram as bases necessárias para concluir minha formação.

Agradecimentos

Agradeço inicialmente ao meu orientador e mentor Dr. Roger Walz, e minha co-orientadora e amiga Cláudia Pinto Figueiredo que estiveram por todo o momento me dando forças e conhecimentos científicos e clínicos necessários para a elaboração, realização e conclusão deste trabalho. Não posso deixar de mencionar outros exemplos de vida e dedicação como Dra. Daniella Serafin Couto Vieira, Dra. Gabriella Di Giunta Funchal, Dra. Tânia Mazzuco e os demais médicos e funcionários técnico-administrativos do Departamento de Anatomia Patológica da Universidade Federal de Santa Catarina que me permitiram um convívio alegre e descontraído ao longo dos meus seis anos de formação.

Abraços especiais às minhas eternas colegas de faculdade que me acompanharam e estiveram presentes nos momentos felizes e tristes da jornada, secando minhas lágrimas e erguendo minhas rimas labiais, a citar: Ana Júlia Alves de Faria, Anahy Wilde, Bianca Stefanello e Daniele Aparecida Taufer, além de todos os amigos e amigas que cultivei ao longo dos anos de formação.

Agradecimentos aos doutores, alunos e professores do Departamento de Farmacologia da UFSC, que por meio da disponibilidade dos recursos de laboratório me permitiram suspirar, inspirar e transpirar um pouco de ciência. Por fim, a todos os não mencionados, que de alguma forma encontram um pouco do seu trabalho e esforço estampados nas páginas desse estudo.

RESUMO

Introdução: A relação entre estrogênios e a excitabilidade neuronal foi observada e descrita há mais de 150 anos. Desde então, inúmeros pesquisadores descreveram algumas ações dos estrogênios na excitabilidade neuronal, e modulação das crises epiléticas.

Objetivos: Determinar a expressão dos receptores de estrogênio 1 hora (fase ictal), 12 horas (período tóxico), 5 dias (período silente), e 50 dias (período crônico) após o término do estado de mal epilético induzido pela pilocarpina comparando com animais controle.

Métodos: Foi realizada administração de pilocarpina (i.p.) em ratos Wistar machos, com sacrifício após 1 hora, 12 horas, 5 dias, e 50 dias do término do EME para estudo imunohistoquímico. A marcação expressão do RE foi analisada por microscopia óptica através do programa CHPTOOL.

Resultados: Animais tratados com Pilocarpina exibem porcentagem de área marcada para o RE maior quando comparados aos controles. Nas regiões CA1, CA2 e CA3 ocorre uma queda na expressão dos RE ao longo do tempo, atingindo os menores valores após 50 dias.

Conclusões: Os RE estão presentes em todas as regiões do hipocampo avaliadas, e a intensidade de marcação para o RE nos grupos tratados com pilocarpina foi significativamente maior quando comparado com seus respectivos grupos controle, nas diferentes regiões analisadas (CA1, CA2 e CA3), exceto o giro denteado. Há uma distribuição temporal na expressão RE nas diferentes regiões do hipocampo, com aumento na síntese dessas proteínas nas primeiras horas do processo de epileptogênese induzido pela droga.

ABSTRACT

Introduction: The possible interactions between estrogens and neuronal excitability have been first described 150 years ago. Since then many researchers have related some characteristics of estrogens in neuronal excitability and seizures modulation.

Objectives: To determine the estrogen receptor expression after the end of the SE induced by pilocarpine at 1 hour (acute phase), 12 hours (toxic period), 5 days (silent period), and 50 days (chronic period), comparing with control animals.

Methods: pilocarpine was administered by intraperitoneal injection in male Wistar rats, which were killed 1 hour, 12 hours, 5 days and 50 days after Status Epilepticus onset and performed immunohistochemistry study. The ER expression was analysed by optical microscopy, using CHPTOOL Software®, in CA1, CA2, CA3 and dentate gyrus hippocampal subregions.

Results: Animals treated with pilocarpine showed an increased percentage of area labeled for ER when compared to the controls. In the subregions CA1, CA2 and CA3 a reduction in the ER expression along the time occurred, reaching the least values after 50 days.

Conclusions: The estrogens receptors were present in all hippocampal subregions, and the intensity of immunostaining for ER in treated animals was higher comparing to their respective control groups, in different hippocampal regions evaluated (CA1, CA2 and CA3), except in the dentate gyrus. There is a temporal distribution of ER in the different hippocampal subregions with an increase of immunostaining to ER in the first hours (12 hours) after Status Epilepticus induced pharmacologically by pilocarpine.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EH	Esclerose do hipocampo
ELTM	Epilepsia Lobo Temporal Mesial
FIG	Figura
GD	Giro denteado
HU	Hospital Universitário
IPI	Insulto precipitante inicial
RE	Receptor de estrogênio
StaR	Proteína Regulatória Aguda da Esteroidogênese
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

FALSA FOLHA DE ROSTO	i
FOLHA DE ROSTO	ii
DEDICATÓRIA	iii
AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
SUMÁRIO	viii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	9
3 MÉTODOS	10
3.1 Modelo Experimental	11
3.2 Reação de Imunoistoquímica	12
3.3 Análise Estatística	13
4 RESULTADOS	14
5 DISCUSSÃO	22
6 CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
NORMAS ADOTADAS	30
ARTIGO CIENTÍFICO	31

1 INTRODUÇÃO

O termo *Epilepsia* vem do verbo grego *επιλαμβάνειν* (*epilambanein*) que significa “ser pego”, ser “atacado”.¹ Há relatos completos de uma crise secundariamente generalizada datados de 3.000 anos atrás em linguagem Acadiana. Outros relatos de casos foram descritos no Egito (1600 a.C.), China (1700 a.C.), Índia (1000 a.C.) e na Babilônia (500 a.C.).²

A epilepsia é um problema de saúde cuja prevalência está entre 5 e 10 casos a cada 10.000 pessoas em países desenvolvidos, podendo ser maior em países em desenvolvimento.² A incidência (= novos casos/habitante/ano) de epilepsia em uma determinada população varia muito de acordo com a idade, sexo, raça, tipo de síndrome epiléptica e fatores sócio-econômicos.^{2, 3} Embora em grande parte das vezes seu prognóstico seja favorável, a epilepsia é a segunda causa de incapacidade mental, particularmente em pacientes jovens⁴, comprometendo a saúde mundial de forma similar ao câncer de mama em mulheres e de pulmão em homens.⁵

A epilepsia está relacionada à predisposição genética (epilepsias idiopáticas), lesões cerebrais congênitas e adquiridas (epilepsias sintomáticas) ou ambas.⁶ O termo epileptogênese é aplicável em dois contextos distintos. Um está relacionado ao processo de “gênese” ou “formação” de um tecido capaz de gerar crises epiléticas. O outro está relacionado ao conceito de “início” da crise epilética em si. Ou seja, o tecido que gera as crises já está formado (epileptogênese no sentido descrito anteriormente), e denomina-se epileptogênese o início de uma crise epilética propriamente dita.

No caso de epilepsias idiopáticas, entende-se que o processo de “formação” de um tecido epileptogênico depende basicamente de expressão e repressão de genes ao longo da formação e desenvolvimento do cérebro. Embora a participação do meio ambiente não possa ser completamente excluída, esta não parece ser decisiva. Já nas epilepsias sintomáticas, o processo de epileptogênese depende do tipo de insulto, da região cerebral afetada, e da resposta tecidual. Esta por sua vez é dependente das duas primeiras (tipo de insulto e região afetada), além das características genéticas do indivíduo e da faixa etária na qual ocorreu o insulto.

Em torno de 20 a 30% dos pacientes são portadores de alguma forma de epilepsia refratária ao tratamento farmacológico. Estes pacientes são responsáveis por 70% dos gastos com epilepsia nos Estados Unidos. O comprometimento do hipocampo está relacionado à síndrome

epiléptica mais freqüentemente refratária ao tratamento farmacológico, a epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose do hipocampo (ELTM-EH). A ELTM-EH corresponde em média a 70% dos casos tratados cirurgicamente no mundo. A formação hipocampal é uma estrutura intimamente relacionada aos processos envolvidos com o processamento de memórias declarativas. A formação hipocampal é formada pelo pré-subículo, subículo, e pelo hipocampo propriamente dito. Esta região tem recebido considerável atenção da comunidade científica por vários motivos: a) estar intimamente relacionada com aprendizado e memória; b) apresentar um alto grau de plasticidade neuronal quer seja ela fisiológica ou patológica; c) estar implicada patologicamente com inúmeros insultos neurológicos incluindo traumatismo craniano, acidente vascular, e desordens degenerativas (ex. D. de Alzheimer); d) sua disposição anatômica e fisiológica ser particularmente útil na realização de estudo eletrofisiológicos; e) por tratar-se de uma forma relativamente simplificada de córtex; f) ser ricamente conectada com outras estruturas do sistema nervoso central.

As epilepsias parciais complexas de lobo temporal são as formas mais freqüentes das epilepsias parciais.^{6,7} A marca histopatológica clássica da epilepsia de lobo temporal é a chamada esclerose do hipocampo (EH). O termo vem da descrição dos primeiros achados macroscópicos datados de 1825,⁷ posteriormente de estudos microscópicos realizados por Sommer em 1880.⁸ Até a década de 50 acreditava-se que as crises epilépticas repetidas acarretavam a morte neuronal, e conseqüentemente a esclerose do hipocampo. Na década seguinte surge o conceito de que a EH seja uma patologia crônica associada com um insulto cerebral, inicialmente atribuído a dificuldades no parto e hipóxia neonatal⁶. Nos anos 60 Falconer e colaboradores^{9,10} levantaram a suspeita da existência de mais de um fator etiológico, incluindo convulsões na infância e traumatismo crânio-encefálico. Posteriormente o próprio Falconer concluiu que as crises convulsivas precoces seriam “a causa” da EH.¹⁰

Recentemente o grupo da UCLA (Universidade da Califórnia, Los Angeles), aplicando técnicas de quantificação patológica nas ressecções de lobo temporal realizadas para tratamento de epilepsia refratária realizadas de 1961 a 1992, expandiu estas associações clínico-patológicas. Criou-se o conceito de “insulto precipitante inicial” (IPI, do inglês *initial precipitating injury*). Por definição é um evento que tenha acarretado perda de consciência por mais de 30 minutos ou alteração cognitiva por mais de 4 horas. Além disso, o IPI pode ou não ser uma convulsão propriamente dita. A perda neuronal severa (mais de 40% de neurônios no hipocampo) ocorre

mais freqüentemente em pacientes com história de IPI (88,2%) em comparação à sua ausência (15,8%)^{11,12}.

Pacientes com história de IPI no passado tinham densidade neuronal diminuída (quando comparada a peças de autópsias de mesma idade) em todas as regiões do hipocampo, especialmente CA4, CA1 e pró-subículo. Pacientes sem IPI não apresentaram densidade neuronal diminuída no CA4, CA2 e pró-subículo, sendo a perda neuronal mais uniforme. Além disso, a idade em que ocorre o insulto não necessariamente está associada à perda neuronal.¹³ Estes dados sugerem a necessidade de mais estudos clínicos. Aceita-se portanto que o IPI ocorra muitos anos antes do início da epilepsia. Embora crises subseqüentes pareçam contribuir para uma perda neuronal progressiva, acredita-se que esta perda adicional seja pequena e restrita às regiões CA1 e pró-subículo.^{11,12}

À luz dos conhecimentos atuais, talvez seja mais prudente considerar que o IPI ou outro evento clínico/cirúrgico raramente “cause” EH e posteriormente epilepsia de lobo temporal.¹³ Assim, a chance de uma pessoa desenvolver EH e epilepsia a partir de um IPI é pequena. Por outro lado, dentre os pacientes que apresentam EH, a história de IPI é bem freqüente quando comparado à população controle (sem epilepsia de lobo temporal).

A esclerose do hipocampo, característica dessa síndrome, ocorre na maioria dos casos seguinte a um evento precipitante como status epilético (episódio de convulsões contínuas com duração de 30 minutos ou mais). Tal situação envolve a perda de neurônios hilares e piramidais nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo. Concomitante ao dano do hipocampo, axônios de neurônios dessas regiões iniciam um processo de reorganização, formando novas conexões funcionais, as quais podem ser fontes epileptogênicas.

Semelhante a humanos, dano no hipocampo subseqüente ao estado de mal epilético pode ser demonstrado em animais. A pesquisa de recursos terapêuticos para epilepsia tem sido baseada em modelos de animais epiléticos (roedores e primatas)¹⁴. No último século, o uso destes modelos tem permitido o desenvolvimento com sucesso de drogas ativas nas epilepsias em humanos. O modelo da pilocarpina é um dos modelos animais que mimetiza a epilepsia do lobo temporal associada à esclerose do hipocampo em humanos.¹⁵

Os modelos da pilocarpina^{15,16} e do ácido cáinico,¹⁷ são extremamente úteis para investigar o surgimento, neuroplasticidade e achados neuropatológicos relacionados com a epilepsia mesial temporal, através da investigação experimental de crises prolongadas em roedores (estado de mal

epiléptico).¹⁸⁻²⁰. Estes agentes injetados por via sistêmica ou intracerebroventricular produzem um estado de mal epilético relacionado à excitotoxicidade glutamatérgica¹⁵, dano por espécies reativas de oxigênio (estresse oxidativo), necrose e apoptose.²¹

Este insulto precipitante inicial leva a uma seletiva perda neuronal, gliose e reorganização sináptica (brotamento sináptico) no hipocampo bastante similar aos achados observados na esclerose mesial temporal em humanos (Figura 1).

Também são observadas lesões em outras áreas além do hipocampo (ex. amígdala, cortex entorrinal, tálamo, cortex piriforme). Num período variável após a recuperação da crise induzida pela pilocarpina ou cáinico (período latente, em média 15 dias), os animais passam a apresentar crises límbicas espontâneas originadas no hipocampo e propagadas para o córtex (período crônico). Todos os animais injetados com pilocarpina tornam-se cronicamente epiléticos, sendo que no modelo do ácido cáinico este número pode não chegar a 50%.^{13,20}

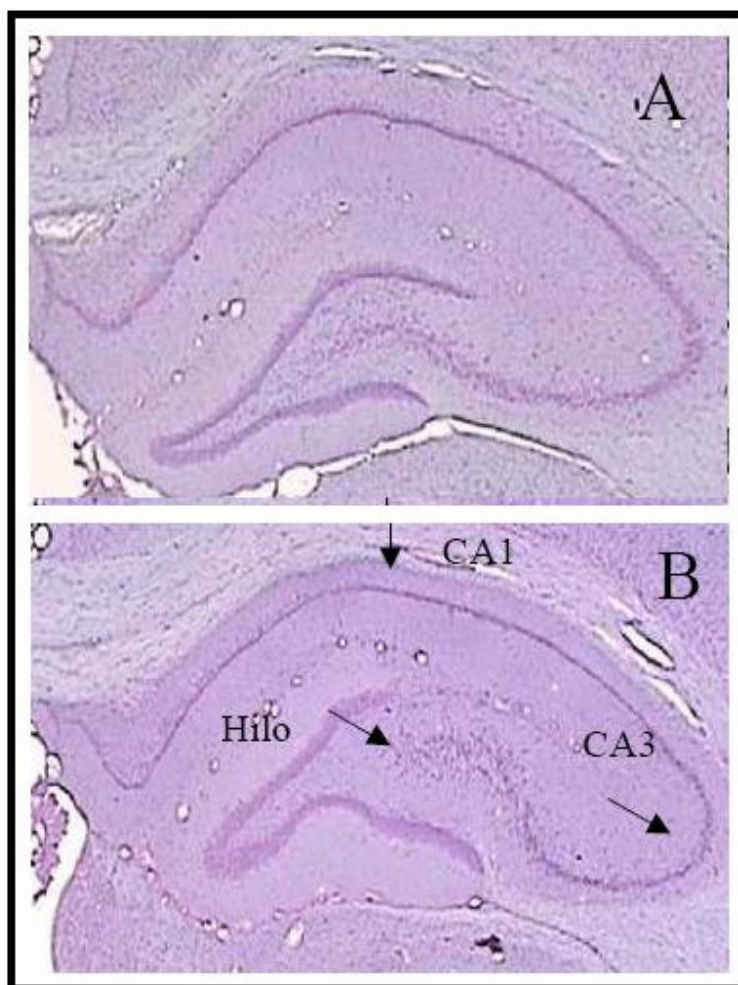


Figura 1 – Corte histológico corado com Hematoxilina-Eosina (HE) de hipocampo de rato Wistar controle (A). Em (B), observa-se corte de hipocampo de um rato Wistar com epilepsia induzida por pilocarpina e as alterações de reorganização celular, gliose e perda neuronal nas regiões CA1, CA3 e GD.

Os achados discutidos anteriormente indicam que lesões neocorticais²²⁻²⁶ e hipocampais,⁷ além de modificar as características da rede neural na região lesada, são capazes de induzir alterações na fisiologia intrínseca neuronal, levando ao surgimento de neurônios epiléticos.

Os mecanismos responsáveis e atuantes na epileptogênese não são satisfatoriamente compreendidos por mais que a etiologia da epilepsia em humanos tenha sido objeto de pesquisas intensas durante muitos anos.¹⁵ Inúmeras teorias tem sido desenvolvidas para explicar a fisiopatologia da doença, entre elas a que estabelece uma relação entre crises epiléticas, alteração na proporção estrogênio:progesterona e dano neuronal.

A possível relação entre os estrogênios e a excitabilidade neuronal tem sido observada e descrita há mais de 150 anos^{28, 29}. Desde então, inúmeros pesquisadores têm relatado a variação da frequência de crises epiléticas em algumas mulheres durante o ciclo menstrual, condição referida como epilepsia catamenial e algumas características relativas à função de ativação dos estrogênios principalmente no que diz respeito à excitabilidade neuronal, modulação das crises epiléticas e o papel dessas moléculas no dano neuronal induzido pela epilepsia.³⁰

Hormônios sexuais influenciam o sistema nervoso central desde o início do seu desenvolvimento e durante a idade adulta. O acesso ao tecido neural que permite tais modulações é possível devido a características dessas substâncias como baixo peso molecular e propriedades lipofílicas, o que permite fácil penetração na barreira hemato-encefálica.³¹ Os efeitos desses hormônios no sistema nervoso central são mediados pela ligação a receptores específicos ou por meio de efeitos diretos nos receptores de neurotransmissores das fendas sinápticas. No cérebro foram identificados receptores de estrogênio alfa e receptores de estrogênio beta, ambos com uma estrutura similar contanto com distribuição e funções diferentes.³²

A distribuição dos receptores dos hormônios sexuais é ampla no sistema nervoso central. Especificamente, os receptores de estrogênios existem na forma intracelular (identificados no citoplasma celular na forma inativa e no núcleo tanto na forma ativa como inativa), e como receptores de membrana celular. Os receptores intracelulares estão relacionados aos efeitos em longo prazo do estrogênio (minutos a horas), os quais envolvem regulação da transcrição gênica.^{33, 34}

Já os receptores de membrana, por sua vez atuam por meio de um sistema de segundo mensageiro e medeiam efeitos rápidos (segundos a minutos). Por mais que alguns autores usem o termo receptor nuclear de estrogênio para se referirem a esses receptores como um todo, há claras evidências de que ocorre uma movimentação núcleo-citoplasmática desses receptores.³⁴

Vários estudos sugerem que além de efeitos excitatórios sobre o tecido nervoso, os hormônios sexuais têm papel na fisiopatologia da epilepsia do lobo temporal, uma das mais prevalentes síndromes epiléticas, freqüentemente associada à perda de neurônios hipocampais.³⁵

Já é consenso científico de que os esteróides de produção periférica tenham atividade no tecido nervoso central.³⁶ Estudos recentes vêm demonstrando, entretanto que neurônios de determinadas áreas do cérebro são capazes de produzir esteróides de novo e por meio da utilização de metabólitos intermediários periféricos.³⁷

A hipótese de que existe uma produção dos neuroesteróides em regiões do sistema nervoso central tem sido testada e fomentada por alguns pesquisadores baseadas em evidências como a presença de dosagens de neuroesteróides no tecido cerebral mesmo após a remoção de glândulas periféricas envolvidas na esteroidogênese.³⁵ Esses achados sugerem que essas moléculas podem ser tanto sintetizadas de novo como por meio de precursores endógenos a partir da ação de enzimas presentes no sistema nervoso central. Fato que corrobora e sustenta essa idéia é a expressão nas regiões do hipocampo tanto da proteína regulatória aguda da esteroidogênese (StAR) como a enzima aromatase, duas moléculas essenciais à síntese de estrogênios.³⁸

Fisiologicamente, a StAR é uma proteína responsável pelo transporte do colesterol para dentro da mitocôndria onde tem início a esteroidogênese pela quebra da cadeia lateral da molécula de colesterol e a conversão do mesmo em pregnenolona. Já a aromatase por sua vez converte testosterona em estradiol e representa a última etapa da síntese dos estrogênios.³⁸

Em estudos de imunistoquímica, a expressão da proteína StAR foi detectada em neurônios piramidais, células da camada granular do giro denteado e interneurônios hipocampais. Um padrão de expressão e distribuição similar foi achado na detecção do RNAm da enzima aromatase.³⁸

Aproximadamente dois terços de todas as células na camada piramidal foram positivas para ambas as marcações citadas acima. Se 60% de todas essas células forem realmente funcionais na produção de neuroesteróides, essa porcentagem seria comparada àquela correspondente à produção celular de estrogênio periféricamente nas gônadas, e apontaria para uma alta capacidade de síntese de estrogênios dos neurônios hipocampais.³⁸ Uma alta porcentagem de células duplamente marcadas para essas duas moléculas envolvidas na síntese de neuroesteróides é um forte indicativo da capacidade dos neurônios hipocampais na síntese de estrogênios de novo, já que as células hipocampais teoricamente são providas dos recursos enzimáticos necessários para tal atividade.³⁸

Diferenças entre sexo não foram observadas nesses estudos, o sexo não parece influenciar na porcentagem das células com marcação positiva para proteína StAR e aromatase, tampouco na intensidade da marcação. Culturas de células hipocampais constituídas por aproximadamente 98% de neurônios e somente 2% de astrócitos, feitas em estudos anteriores, mostraram dosagens de estrogênios nos meios de cultura maiores do que aqueles presentes no soro dos modelos experimentais. Os níveis de estrogênio no hipocampo foram aproximadamente três vezes maiores nas culturas de células hipocampais de ratas se comparadas às dosagens encontradas no plasma

destas, sendo que em culturas celulares de ratos machos a concentração de estrogênio nos meios chegou à cerca de quatro vezes àquelas encontradas no plasma.^{39, 40}

Sendo assim, os estrogênios são sintetizados em quantidades semelhantes no tecido hipocampal de ratos machos e fêmeas. Esses estrogênios derivados das células hipocampais podem explicar o porquê das concentrações periféricas de estrogênio em animais machos e fêmeas não resultarem em diferentes efeitos dos estrogênios no hipocampo entre os dois sexos. É bem aceito que tanto os estrogênios produzidos no cérebro como os produzidos periféricamente atuam nos neurônios hipocampais, justificando, portanto alguns efeitos dos estrogênios variando durante o ciclo estral nas ratas fêmeas.⁴⁰

Esses estrogênios produzidos localmente têm papel importante na plasticidade sináptica, além de atuação em receptores específicos para moléculas de estrogênio, representados pelas isoformas alfa e beta. Essas duas isoformas de receptores encontram-se expressas no hipocampo. A expressão do RNAm dos RE α e RE β foram encontradas tanto nas células principais como nos interneurônios hipocampais. A expressão dos RE foi maior em CA3 quando comparada a outras regiões do hipocampo (CA1). A marcação com anticorpos específicos dirigidos contra as duas isoformas de RE foi evidenciada no núcleo e citoplasma desses neurônios, permitindo caracterizar que tais anticorpos reconhecem tanto o estado ativo quanto o inativo dos RE.⁴¹

Estudos prévios utilizando tratamento de culturas de neurônios hipocampais com inibidores da aromatase bem como uso de estradiol nessas culturas levam a uma resposta específica da expressão dos RE nestas células. Um aumento na expressão dos RE α e uma diminuição da expressão dos RE β foram observados em resposta ao tratamento das culturas com estradiol, sendo que um diminuição dos RE α e um aumento na expressão dos RE β foram observados em resposta ao inibidor de aromatase, diminuindo neste último caso os níveis locais de estradiol.^{42, 43}

Esses achados citados anteriormente sugerem a funcionalidade dos RE bem como a resposta dos neurônios hipocampais à ação do estradiol, além de importante função desse hormônio na plasticidade sináptica, já que o uso de estradiol e inibidor da aromatase nas culturas de células hipocampais interfere na densidade dos prolongamentos neuronais e no número dos botões pré-sinápticos.⁴⁴

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo aprimorar a compreensão da neuroplasticidade que ocorre na ELTM-EH através do estudo do modelo da pilocarpina em roedores.

2.2 Objetivos específicos

Determinar a expressão dos receptores de estrogênio 1 hora (fase ictal), 12 horas (período tóxico), 5 dias (período silente), e 50 dias (período crônico) após o término do estado de mal epilético induzido pela pilocarpina e comparar com animais controle.

3 MÉTODOS

3.1 Modelo Experimental

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) cadastrado sob os número PP00056/CEUA e 23080.016723/2006-87/CEUA/UFSC. Trata-se de um estudo experimental com ratos Wistar machos, adultos (pesando 250-300g) fornecidos pelo biotério central da UFSC. A indução do modelo experimental, bem como as análises imunoistoquímicas e histopatológicas foram realizados no Laboratório de doenças Neurodegenerativas do Centro de Ciências Biológicas (CCB), numa colaboração do Prof. Dr. Rui Daniel Predigüer (Departamento de Farmacologia/UFSC) e o Núcleo de Pesquisas em Neurologia Experimental e Clínica (NUPNEC) da UFSC, coordenado pelo Prof. Dr. Roger Walz. Os animais foram submetidos à administração intraperitoneal de uma dose de pilocarpina (320 mg/kg, i.p.) que acarretou um estado de mal epiléptico (EME) com duração de até 10 horas. Para minimizar a mortalidade, utilizou-se escopolamina (1 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes da administração da pilocarpina, e diazepam (5 mg/kg, i.p.) 3 horas após o início da crise. Os animais foram divididos em 4 grupos distintos, classificados de acordo com a fase do modelo. Um grupo de animais foi sacrificado após 1 hora (fase ictal, n=3), outro grupo após 12 horas (fase tóxica, n=3), 5 dias (período silente, n=3), e 50 dias (período crônico, n=3) após o término do EME para estudo de imunoistoquímica. Como grupo controle foram utilizados animais que receberam igual volume de escopolamina e diazepam e que foram sacrificados após 1 hora (fase ictal) (n=3), assim como 12 horas (n=3), 5 dias (período silente) (n=3), e 50 dias (período crônico) (n=3) do tratamento. Os animais controle foram injetados com salina e sacrificados nos tempos correspondentes aos grupos experimentais. Para a obtenção do material biológico todos os animais foram submetidos à anestesia com pentobarbital, perfundidos com solução salina, seguido de paraformaldeído 4%. Os cérebros foram retirados e armazenados em paraformaldeído tamponado 4% durante 24h e posteriormente submetidos ao processamento histológico para realização dos estudos de microscopia óptica convencional (HE) e imunoistoquímica. A avaliação da expressão do receptor de estrógeno (RE), foi realizada em cortes histológicos confeccionados a partir dos blocos de parafina contendo as amostras de cérebro dos animais dos diferentes grupos incluídos no estudo.

3.2 Reação de Imunoistoquímica

A expressão do receptor de estrógeno foi detectada em cortes histológicos confeccionados a partir dos blocos de parafina contendo amostras dos cérebros dos animais incluídos no estudo. Os cortes teciduais de espessura de 3 μm foram montados sobre lâminas preparadas com solução de ATPS a 5% (3-aminopropyltriethoxysilene; SIGMA CHEMICAL CO, St. Louis, MO, USA) em acetona PA, sendo mantidas em estufa a uma temperatura de 50°C durante 1h para fixação dos cortes nas lâminas. Após fixação, os cortes foram desparafinados em xilol e hidratados por passagens sucessivas em etanol de concentrações decrescentes (etanol absoluto, etanol 90%, etanol 80% e finalmente etanol 70%). O bloqueio da peroxidase endógena dos tecidos foi realizado com o objetivo de eliminar o desenvolvimento de reações inespecíficas falso-positivas. Para tanto, as lâminas foram imersas em uma solução de peróxido de hidrogênio a 1,5% e metanol absoluto (V/V), em uma passagem de 20 min, com posterior lavagem através de duas passagens em água destilada. Previamente à incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram submetidas ao tratamento para reativação antigênica, com a finalidade de recuperar os sítios antigênicos mascarados pela fixação e inclusão do tecido em formol e parafina. Para este fim, foi preparada uma solução composta por 180 mL de ácido cítrico 0,1M (MERCK, São Paulo/SP, Brazil) e 820 mL de citrato de sódio 0,1M (MERCK, São Paulo/SP, Brasil) pH 6,0. Após preparo da solução, as lâminas foram imersas nesta solução de reativação antigênica diluída 1:10 em água destilada, e mantidas em banho-maria ajustado para 95-98°C, durante 45 min. Logo após, ainda como parte do processo de reativação antigênica através do calor, as lâminas foram retiradas do banho-maria, mantidas durante 20 min à temperatura ambiente, e posteriormente lavadas em água destilada. Após a lavagem das lâminas, estas foram submersas em tampão salina fosfato (PBS, composição: NaCl 137 mM, KCl 2 mM e tampão fosfato 10 mM, pH 7,2-7,4) (SIGMA CHEMICAL CO., St. Louis, MO, USA). O anticorpo monoclonal primário anti-RE (clone 6F11, Novocastra, United Kingdom) foi diluído a 1:100, em uma solução comercial apropriada à diluição de anticorpos (Dako, Carpinteria, CA, USA), composta por TRIS-NaCl (Tris Base 13,9g, Tris-HCl 60,6g, NaCl 87,66g, pH 7,6) e um reagente comercial bloqueador de reação inespecífica. Após esta etapa, a solução contendo os anticorpos foi adicionada sobre os cortes teciduais e as lâminas foram mantidas em câmara úmida, de 2-8°C durante 12h. A seguir, estas foram lavadas com tampão PBS, por 2 vezes, por 5 min cada, à temperatura ambiente. Após lavagem as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG/IgM conjugado com um polímero de peroxidase (EN VISION PLUS, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) pronto

para uso em câmara úmida durante 1h à temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas duas lavagens utilizando-se PBS por 5 min, à temperatura ambiente. As amostras foram submetidas a uma revelação colorimétrica com uma solução cromógena contendo 0,03% de 3,3'-diaminobenzidina (3,3',4,4'-tetraaminobiphenyltetrahydrochloride) (DAB), diluído em tampão imidazol pH 7,2 e peróxido de hidrogênio a 0,3%. Após a revelação, foram realizadas a contracoloração das lâminas com solução de Hematoxilina de Harris, desidratação através de passagem das lâminas em concentrações crescentes de etanol (etanol 70%, etanol 80%, 90% e etanol absoluto), diafanização em xilol e montagem em ENTELLAN® (MERCK, São Paulo/SP, Brasil). Para cada reação realizada foi utilizado um controle positivo (ovário de ratas Wistar) (Figura 2), e o controle negativo foi realizado pela abolição do anticorpo primário nas reações. O resultado positivo foi revelado pelo aparecimento de coloração castanha no local da marcação pelos anticorpos. A leitura das lâminas e digitalização das imagens de todas as regiões hipocâmpais de interesse (CA1, CA2, CA3 e giro denteado) foi realizada em microscópio óptico comum (NIKON, 80i) acoplado a câmera digital (Digital Sight Câmera, DS-5M-L1; Nikon, Nova Iorque, USA). Para quantificação da expressão do receptor de estrógeno nas diferentes regiões hipocâmpais as imagens obtidas em aumento de 200X foram analisadas através de um software de análise de imagens (CHPTool Cyclops, Brasil). A quantificação dos receptores foi expressa por porcentagem de área marcada em relação a área total analisada.

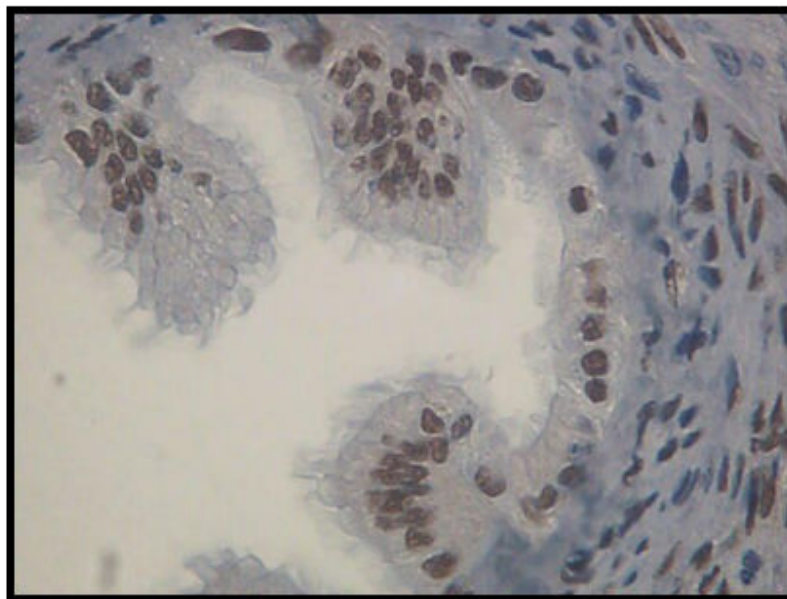


Figura 2 - Reação de imunoistoquímica em corte histológico de ovário de rata Wistar adulta (400X). A reação positiva com padrão nuclear pode ser observada nas células gonadais, sendo caracterizada pelo desenvolvimento de um precipitado de coloração castanha, sendo as células estromais negativos para o receptor.

3.3 Análise estatística

A estatística dos resultados foi realizada usando análise de variância de duas ou três vias (ANOVA). As variáveis independentes foram o tratamento (animais controle e tratados com Pilocarpina), fase do modelo, e as diferentes sub-regiões do hipocampo. A variável dependente foi a intensidade de marcação por área para o RE. Posteriormente, os resultados significantes obtidos com a aplicação do ANOVA foram submetidos a comparações múltiplas *post hoc* usando o teste de Newman-Keuls, com valores de “p” igual ou menor 0.05 foram considerados estatisticamente significativos. A análise estatística foi realizada com auxílio do software Statistica® (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

4 RESULTADOS

A marcação imunoistoquímica para o receptor de estrógeno, avaliada nos cortes do hipocampo dos animais tratados com pilocarpina e nos animais controle, foi tanto nuclear como citoplasmática. Este padrão de marcação é semelhante ao encontrado nas células gonodais de tecido ovariano de ratas Wistar (Fig. 2), confirmando a afinidade entre o receptor estudado e o anticorpo utilizado. Também foi possível observar uma intensa imunoreatividade na camada de células granulares do hipocampo dos animais tratados com pilocarpina (Fig. 3).

A Figura 3 ilustra a porcentagem de área marcada relativa à expressão do receptor de estrogênio na região CA1 nos animais controle e tratados com pilocarpina e sacrificados na fase ictal, tóxica, período silente e crônico do modelo. Os animais tratados com pilocarpina exibem uma porcentagem de área marcada notavelmente maior quando comparados aos grupos controles (Fig. 3). Tal diferença foi estatisticamente significativa com $p=0,0001$. Também foi analisado o padrão de imunoreatividade para os receptores de estrogênio nos respectivos grupos de animais controle (1h, 12h, 5 dias e 50 dias), não demonstrando diferença estatisticamente significativa. Quando comparada o padrão de expressão do RE nos diferentes grupos de animais submetidos ao SE foi possível observar que o grupo de animais sacrificados após 1h apresentou maior expressão do receptor, quando comparado com o grupo sacrificado após 12h ($p=0.0121$) e após 50 dias ($p=0.0008$). Sugerindo que o aumento na expressão do RE na região CA1 do hipocampo nos animais tratados ocorreu somente nas primeiras fases do modelo (1h, 12h e 5 dias). É importante ressaltar que não foi encontrada diferença significativa na expressão do RE nos animais sacrificados após 50 dias, quando comparado com seu respectivo controle ($p=0.2064$).

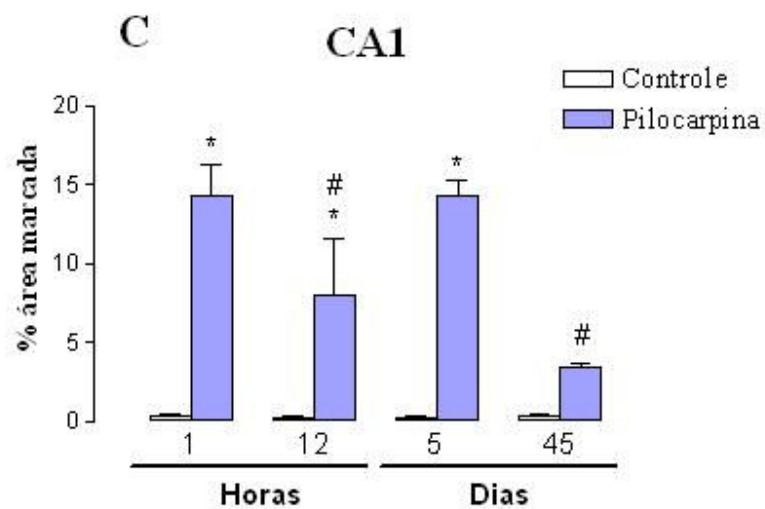
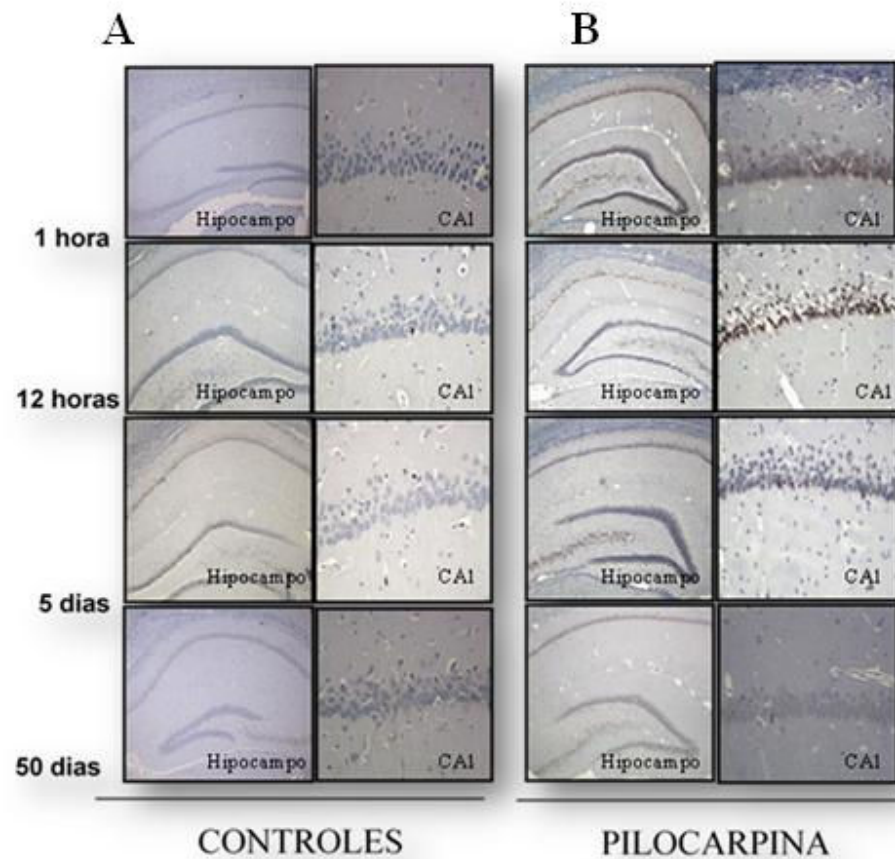
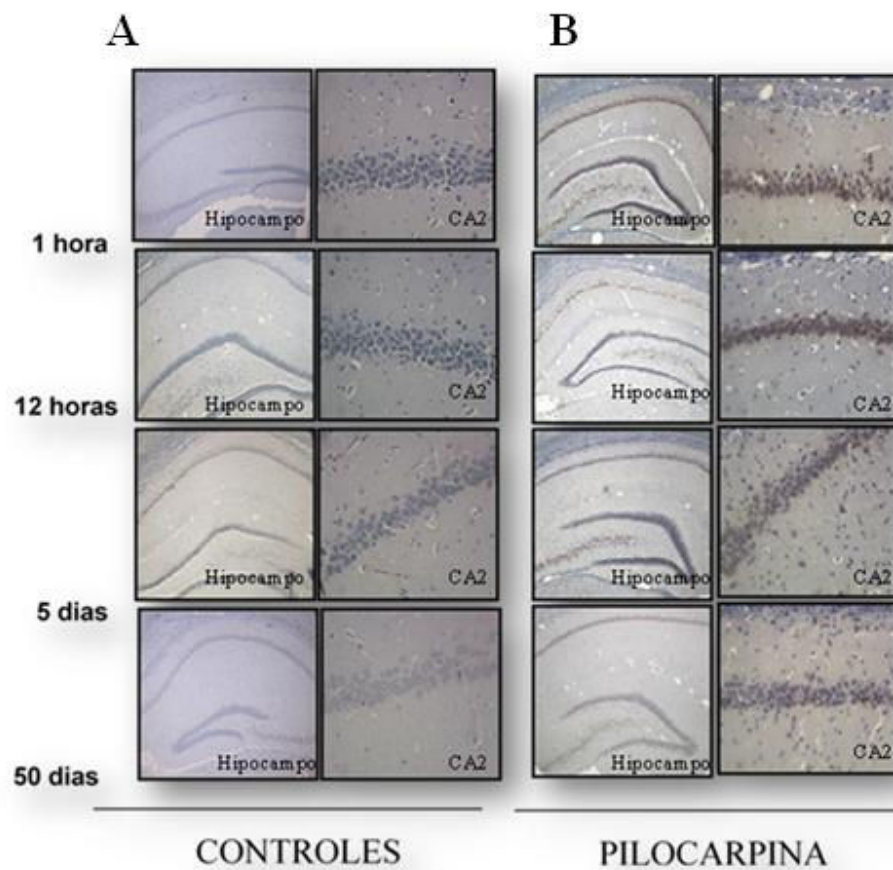


Figura 3 – Fotos de Microscopia Óptica dos cortes histológicos da região CA1 dos grupos controle (A) e dos grupos tratados com pilocarpina (B) nas diferentes fases do processo de epileptogênese (1 hora, 12 horas, 5 dias e 50 dias). É possível observar intensa imunoreatividade para o RE, na camada de células granulares do hipocampo, nos animais tratados com Pilocarpina. O gráfico (C) ilustra a imunoreatividade do RE nos diferentes grupos através da porcentagem de área marcada, com $n=3$ para cada grupo. (* $p<0.05$ comparando os tratamentos com seus respectivos controles; # $p<0.05$ comparando com grupo submetido ao SE e sacrificados após 1h).

O padrão de imunorreatividade do RE na região CA2 do hipocampo, nos diferentes grupos de animais, demonstrou-se semelhante ao padrão de imunorreatividade da região CA1. Ou seja, os grupos de animais controle (1h, 12h, 5 dias, 50 dias) não demonstraram diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$). Além disso, os grupos de animais submetidos ao SE e sacrificados após 1h e 12h apresentaram porcentagem de área marcada para o RE estatisticamente significante, quando comparados com seus respectivos grupos controle ($p=0,0003$, $p=0,0028$, respectivamente) (Fig 4). Conforme ilustra a Fig. 4 (C), a expressão do RE no grupo sacrificado após 1h do SE foi significativamente maior, quando comparado com os grupos sacrificado após 5 dias ($p=0.0157$) e após 45 dias ($p=0.0008$) do SE, não demonstrando diferença significativa quando comparado com o grupo sacrificado após 12h ($p=0.0994$). Isto demonstra que a expressão do RE na região CA2 do hipocampo está aumentada nas primeiras horas após o SE.



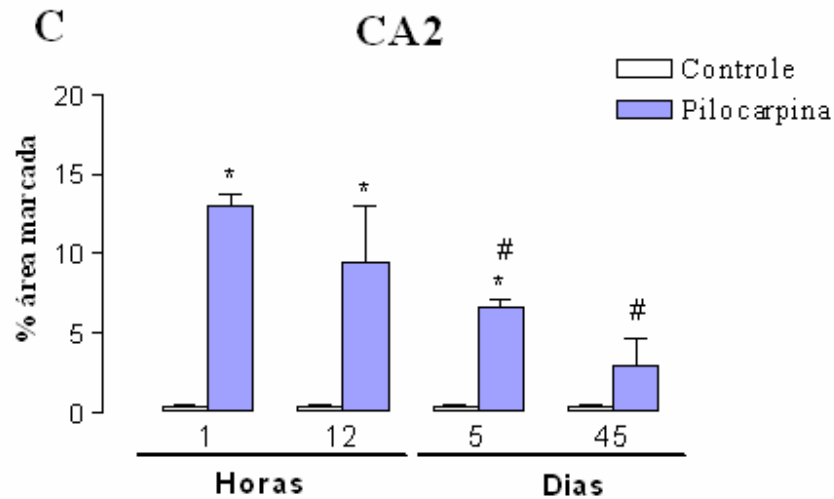


Figura 4 – Fotos de Microscopia Óptica dos cortes histológicos da região CA2 dos grupos controles (A) e dos grupos tratados com Pilocarpina (B) nas diferentes fases do processo de epileptogênese (1 hora, 12 horas, 5 dias e 50 dias). É possível observar intensa imunoreatividade para o RE, na camada de células granulares do hipocampo, nos animais tratados com Pilocarpina. O gráfico (C) ilustra a imunoreatividade do RE nos diferentes grupos através da porcentagem de área marcada, com $n=3$ para cada grupo (* $p<0.05$ comparando os tratamentos com seus respectivos controles; # $p<0.05$ comparando com grupo submetido ao SE e sacrificados após 1h).

A análise do padrão de imunoreatividade do RE na região CA3 do hipocampo (Fig. 5) é similar ao padrão de expressão da região CA2. Os grupos de animais submetidos ao SE e sacrificados após 1h e 12h apresentaram porcentagem de área marcada para o RE estatisticamente significante, quando comparados com seus respectivos grupos controle ($p=0,0001$, $p=0,0002$, respectivamente) (Fig 5). Observou-se uma diminuição gradual na expressão do RE, nesta região hipocampal, nos diferentes grupos tratados com pilocarpina, com valores próximos a 15 % de área marcada nos animais sacrificados em período pós-ictal (1h) e aproximadamente 2,5% de área marcada nos animais sacrificados no período crônico (50 dias). Ou seja, a expressão do RE no grupo sacrificado após 1h do SE foi significativamente maior, quando comparado com os grupos sacrificado após 5 dias ($p=0.0002$) e após 50 dias ($p=0.0002$) do SE, não demonstrando diferença significativa quando comparado com o grupo sacrificado após 12h ($p=0.1505$) (Fig. 5). Isto demonstra que a expressão do RE na região CA3 do hipocampo também está aumentada nas primeiras horas após o SE, sugerindo ser dependente do tempo de evolução do processo de epileptogênese.

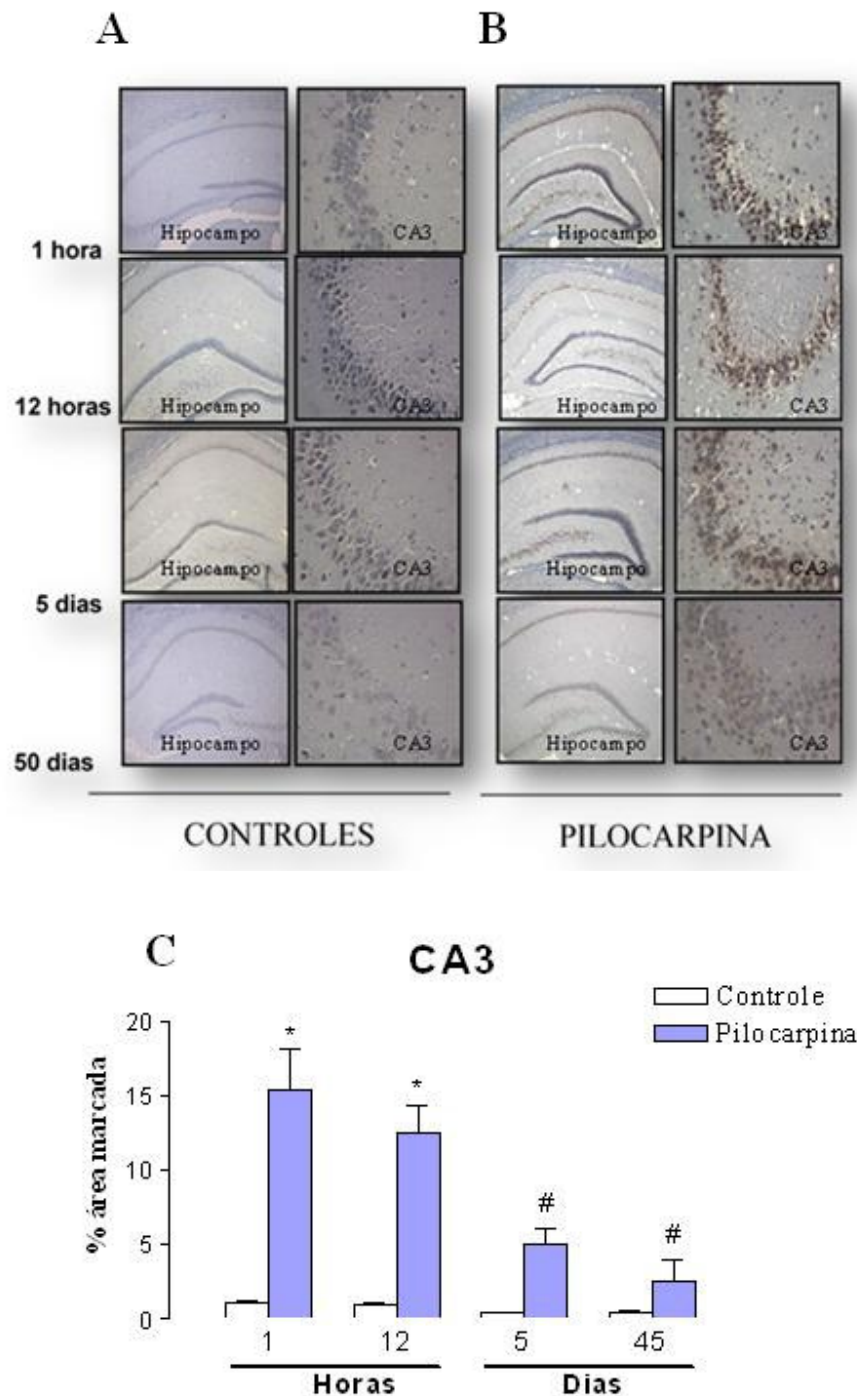
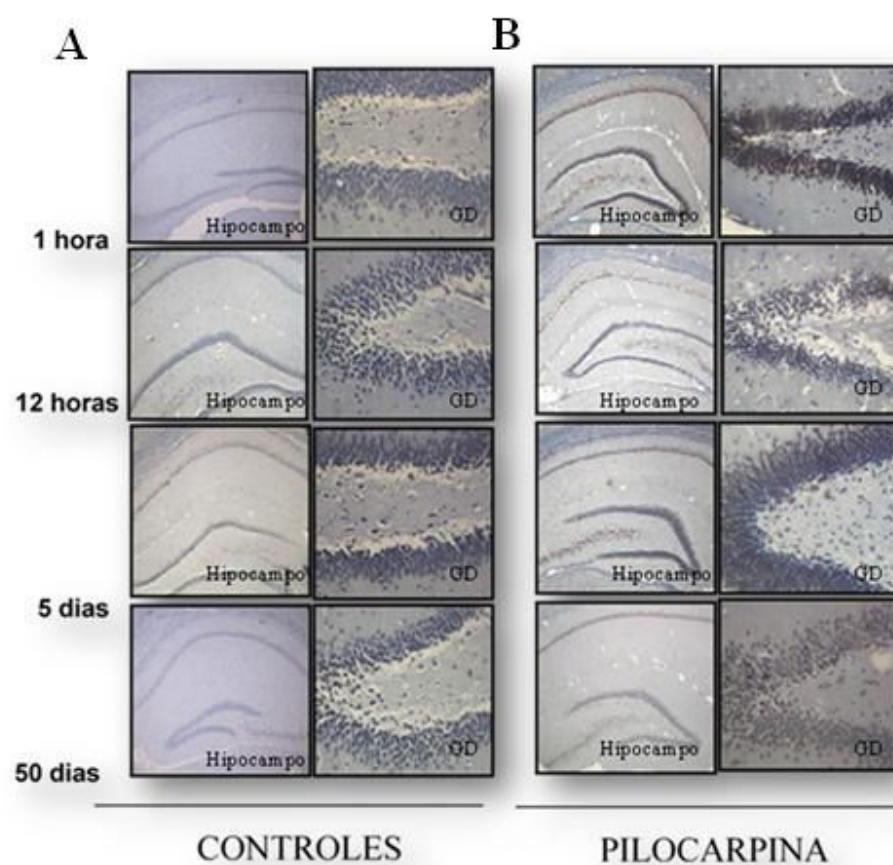


Figura 5 – Fotos de Microscopia Óptica dos cortes histológicos da região CA3 dos grupos controles (A) e dos grupos tratados com Pilocarpina (B) nas diferentes fases do processo de epileptogênese (1 hora, 12 horas, 5 dias e 50 dias). É possível observar intensa imunoreatividade para o RE, na camada de células granulares do hipocampo, nos animais tratados com Pilocarpina. O gráfico (C) ilustra a imunoreatividade do RE nos diferentes grupos através da porcentagem de área marcada, com $n=3$ para cada grupo (* $p<0.05$ comparando os tratamentos com seus respectivos controles; # $p<0.05$ comparando com grupo submetido ao SE e sacrificados após 1h).

Em contrapartida, a imunorreatividade do RE nesta região, não demonstrou diferença significativa nem quando comparado o tratamento com a expressão do receptor, tampouco quando comparado os tratamentos com seus respectivos grupos controle. Exceto os animais tratados com pilocarpina e sacrificados após 12 horas, que apresentaram diferença estatisticamente significativa na expressão do RE quando comparados com o grupo controle ($p=0,0029$) (Fig. 6).



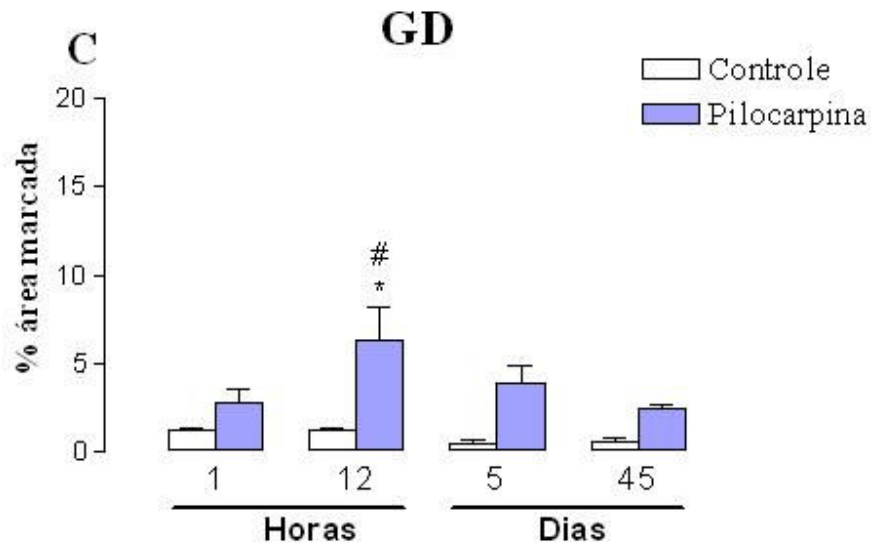


Figura 6 – Fotos de Microscopia Óptica dos cortes histológicos da região do GD dos grupos controles (A) e dos grupos tratados com Pilocarpina (B) nas diferentes fases do processo de epileptogênese (1 hora, 12 horas, 5 dias e 50 dias). É possível observar intensa imunoreatividade para o RE, na camada de células granulares do hipocampo, nos animais tratados com Pilocarpina. O gráfico (C) ilustra a imunoreatividade do RE nos diferentes grupos através da porcentagem de área marcada, com $n=3$ para cada grupo ($* p<0.05$ comparando os tratamentos com seus respectivos controles; $\# p<0.05$ comparando com grupo submetido ao SE e sacrificados após 1h).

A Figura 7 ilustra a variação da intensidade da imunoreatividade para o RE ao longo do tempo (1 hora, 12 horas, 5 dias e 50 dias), nas diferentes regiões do hipocampo estudadas (CA1, CA2, CA3 e Giro Denteado). Na região CA1 ocorre uma queda na marcação do RE nas primeiras 12 horas, seguida de um pico de expressão aos 5 dias e um declínio ao longo dos 50 dias subsequentes. A figura abaixo (Fig. 7) ilustra de forma clara, a queda acentuada da expressão do RE ao longo do tempo na região CA2 e CA3 do hipocampo, principalmente após 12h, assim como a menor expressão do receptor no giro denteado.

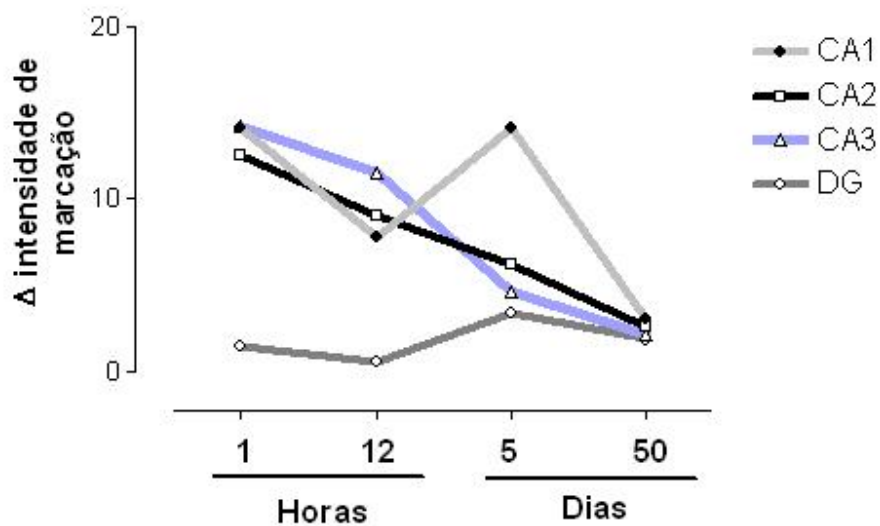


Figura 7– Gráfico ilustrando a variação na expressão do receptor de estrogênio nas diferentes fases do processo de epileptogênese (1 hora, 12 horas, 5 dias e 50 dias) nas diferentes regiões do hipocampo estudadas (CA1, CA2, CA3 e giro denteado). Em destaque, região CA2 e CA3, com diminuição da expressão do RE após 12h.

6 DISCUSSÃO

Várias são as evidências de que células do sistema nervoso e interneurônios são capazes de produzir hormônios esteróides por meio de síntese *de novo* e que tais hormônios têm papel diferenciado na neuroplasticidade, (re)organização celular e neuroproteção^{35, 37, 38}. Esse dado é corroborado por experimentos que demonstram que tais células exibem todas as enzimas necessárias à síntese dessas moléculas esteroidais, e que o bloqueio da via de síntese dessas moléculas parece interferir nos mecanismos de proliferação neurocelular.^{37, 38}

Entretanto, não existem relatos na literatura associando a variação da expressão dos receptores de estrogênio com o modelo crônico de epilepsia induzida por pilocarpina, no qual ocorrem alterações como perda neuronal, estresse oxidativo, gliose e neurogênese.

O presente estudo demonstrou que a expressão do RE aumenta significativamente nos animais submetidos ao estado de mal epiléptico induzido pela Pilocarpina, quando comparado com os níveis basais expressos no hipocampo. Este aumento ocorre nas regiões CA1, CA2 e CA3 do hipocampo, e as mudanças observadas variam de acordo com o tempo de evolução do processo de epileptogênese. O aumento é mais evidente na primeira hora de crise, decaindo até os 5 dias, e retornando a níveis basais no período crônico nas regiões CA1, CA2, CA3. No GD o aumento é mais transitório, ocorre apenas 12h após o início da crise retornando aos níveis normais no período silente. O significado destas modificações tempo e espaço dependentes devem ser interpretadas à luz do potencial envolvimento do receptor de estrógeno tanto em fenômenos fisiológicos relacionados à modulação da potenciação sináptica (LT) como em eventos patológicos envolvendo seu potencial neuroprotetor.

Rune e colaboradores⁴¹ descreveram uma maior imunorreatividade para o RE na região CA3 do hipocampo quando comparada com as outras regiões hipocámpais e a marcação com anticorpos específicos dirigidos contra as duas isoformas de RE foi evidenciada no núcleo e no citoplasma desses neurônios. Em nosso estudo, a marcação imunoistoquímica observada para o RE foi núcleo-citoplasmática em todas as regiões avaliadas (CA1, CA2, CA3 e GD) e os maiores valores de imunorreatividade para tal receptor foram encontrados na região CA3 do hipocampo. Os animais tratados com pilocarpina (fase ictal) apresentaram uma expressão de RE na região CA3 do hipocampo, 15 vezes maior que os animais controle, decaindo aproximadamente 50% na fase crônica. Os resultados obtidos em nosso estudo corroboram com as observações já descritas

na literatura, demonstrando que nas regiões CA1 e CA3, onde a perda neuronal é mais proeminente, a expressão desses receptores é maior.⁴¹

Entretanto, na região CA2 onde os eventos de perda neuronal e gliose são menos frequentes (zona de resistência), também ocorre um aumento na imunorreatividade para o RE nos animais tratados com Pilocarpina nas primeiras horas do processo de epileptogênese. Nessa região, na primeira hora de status epilético a porcentagem de área marcada para o RE aproximou-se de 15% passando a valores próximos de 10% após 12 horas do SME, 8% e 2,5% ao longo de 5 dias e 50 dias, respectivamente. Sendo assim, apesar da perda neuronal ser menos proeminente na região CA2 do hipocampo, o padrão de expressão do RE nessa região não diferiu dos padrões presentes nas regiões CA1 e CA3 durante as diferentes fases da epileptogênese.

Os achados desse estudo sugerem que a modulação principal relacionada à expressão do RE encontra-se mais evidente nas fases iniciais do modelo de epilepsia induzida por Pilocarpina, sendo que no período crônico do modelo ocorre uma menor participação deste neuroesteróide nos fenômenos modulatórios. Esses dados necessitam de estudos mais apurados para que se estabeleça com detalhe o papel exato dos estrogênios na modulação das crises epiléticas. A realização de estudos com diferentes abordagens, como por exemplo funcionalidade e afinidade do receptor, faz-se fundamental para o entendimento da participação deste receptor na fase crônica do processo de epileptogênese.

Os resultados imunoistoquímicos encontrados no presente estudo podem justificar tanto uma ação neuroprotetora mediada pelos estrogênios como pró-epileptogênica. Na literatura, existem dados conflitantes quanto ao papel do estrogênio no hipocampo e sua relação com as crises epiléticas.⁽⁴⁵⁾ Inúmeros estudos têm exaustivamente relatado as ações neuroprotetoras/pró-convulsivantes dos estrogênios, mas o verdadeiro papel desses hormônios ainda permanece incerto. O mecanismo molecular exato através do qual os neuroesteróides interferem na excitabilidade neuronal e susceptibilidade às crises epiléticas necessita ser rigorosamente investigado. A realização de estudos de tratamento com drogas que interferem na expressão e funcionalidade do RE, são fundamentais para que possamos no futuro contar com uma terapia hormonal eficiente que atue especificamente no controle, prevenção e/ou espontaneidade das crises epiléticas refratárias ao tratamento clínico convencional.

As funções dos estrogênios no hipocampo dependem da ligação a receptores específicos para estas moléculas, representados pelas duas isoformas conhecidas (alfa e beta), ambas expressas no hipocampo de ratos Wistar machos e fêmeas^{33, 34}, porém o mecanismo através do

qual esses hormônios desempenham suas funções neuroprotetoras é desconhecido. Conforme *Green e Simpkins*⁴⁵, os estrogênios apresentam inúmeros efeitos celulares, incluindo ativação dos receptores nucleares específicos, aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas, interações com mecanismos intracelulares dependentes de segundo mensageiro, ativação glutamatérgica, além de manutenção da homeostase do cálcio intracelular e atividade antioxidante. Inúmeros desses efeitos têm mostrado contribuição no aumento da sobrevivência neuronal.

Segundo esses autores⁴⁵, uma das principais vias associadas à neuroproteção mediada pelos estrogênios envolve a ativação do AMPc – PKA – CREB. Os estrogênios, através da ligação com as duas isoformas do seu receptor (alfa e beta), aumentam as concentrações intracelulares de AMPc nos neurônios hipotalâmicos. O aumento do AMPc com a subsequente fosforilação do CREB contribuiria para os efeitos neuroprotetores do estradiol através do aumento da expressão da proteína BCL-2, ativação da MAP cinase, ERK, ou inibição do raf-1 em células não-neuronais. Essa via ativada é conhecida ainda por mediar outros efeitos celulares incluindo despolarização de neurônios hipotalâmicos, crescimento dendrítico e aumento da expressão de neurotensina.⁴⁶⁻⁴⁸

Fica evidente, conforme ilustrado na Figura 7, uma distribuição temporal na expressão do RE nas diferentes regiões do hipocampo avaliadas, com um aumento na síntese dessas proteínas nas primeiras horas do processo de epileptogênese induzido pela droga, seguida de tendência à diminuição progressiva desses receptores ao longo da fase do modelo de epileptogênese, tendo com 50 dias de doença a menor expressão em todas as regiões analisadas. O retorno a níveis basais da expressão do RE encontrado em CA1, CA2 e CA3 pode estar relacionado em parte com uma menor densidade de neurônios por campo nessas regiões já que a perda neuronal associada à esclerose do hipocampo só é notada no período crônico do modelo da pilocarpina. Eventualmente uma correção para o número de células/campo evidenciaria que a marcação relativa por neurônios poderia permanecer aumentada.

Apesar das evidências, o sinal específico que leva ao aumento na expressão do RE no modelo experimental da pilocarpina, bem como a disparidade da imunoreatividade para o RE entre os grupos de animais controles e os tratados com pilocarpina ainda precisam ser elucidados e esclarecidos. Do mesmo modo, faz-se necessário estudos adicionais que avaliem a expressão do RE no córtex cerebral e outras regiões encefálicas, já que o modelo estudado envolve também a participação modulatória de outras regiões neocorticais e límbicas.

7 CONCLUSÕES

1. O anticorpo anti-receptor de estrógeno humano (clone 6F11) utilizado neste estudo mostrou afinidade com o receptor de estrógeno dos Ratos Wistar.
2. Os receptores de estrogênio estão presentes em todas as regiões hipocâmpais avaliadas, tanto nos animais dos grupos controle, como nos animais tratados com pilocarpina, o que sugere uma possível participação dos estrogênios nos processos fisiológicos cerebrais.
3. A intensidade de marcação para o receptor de estrógeno nos grupos tratados com pilocarpina foi significativamente maior quando comparado com seus respectivos grupos controles, nas diferentes CA1, CA2 e CA3 do hipocampo.
4. A intensa expressão dos receptores de estrogênio observada no hipocampo dos animais tratados com pilocarpina, sugere um possível envolvimento dos estrogênios no processo de epileptogênese, entretanto são necessários estudos adicionais para que se estabeleça uma ação predominantemente neuroprotetora ou pró-convulsivante.
5. Há uma distribuição temporal na expressão dos receptores de estrogênio nas diferentes regiões do hipocampo avaliadas, com um aumento na síntese destes receptores nas primeiras horas do processo de epileptogênese induzido pela droga. Posteriormente é possível observar uma diminuição progressiva na expressão dos receptores ao longo do tempo, sendo que a menor expressão do receptor ocorre em 50 dias de evolução da doença.
6. Especialmente na região CA3, observou-se uma diminuição estatisticamente significativa no padrão de imunorreatividade do RE, após 50 dias do processo de epileptogênese induzido pela pilocarpina.
7. No giro denteado a variação da expressão do RE parece não guardar relações com o status epilético, já que a expressão desses receptores nesta região do hipocampo não foi estatisticamente significativo quando comparado com os grupos controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pedley EJa. Introduction: What is Epilepsy? In: Publishers L-R, editor. *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*. Philadelphia; 1997. p. 1-7.
2. Hauser W. Historical Perspectives. In: TA EJaP, editor. *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1998. p. 47-57.
3. Sander JaS. Natural History and Prognosis. In: TA EJaP, editor. *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1998. p. 69-86.
4. Kale R. Bringing Epilepsy Out of the Shadows. *BMJ*. 1997;315:2-3.
5. Murray C, Lopez AD, Jamison DT. The Global Burden of Disease in 1990: summary results, sensitivity analysis and future directions. *Bull World Health Organ*. 1994;72(3):495-509.
6. Williamson PD EJ. Complex Partial Seizures. In: Engel J PT, editor. *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1997. p. 557-66.
7. Bouchet C CY. De l'épilepsie considéré dans sens rapports avec l'aliénation mentale. *Arch Gen Med Par*. 1825;9:510-42.
8. Sommer W. Erkrankung des ammonshorns als aetiologisches moment der epilepsie. *Arch Psychiatr Nervenkr*. 1880;10:631-75.
9. Falconer MA SE, Corsellis JAN. Etiology and pathology of temporal lobe epilepsy. *Arch Neurol*. 1964;10:233-48.
10. Falconer MA TD. Surgical treatment of drug resistant epilepsy due to mesial temporal sclerosis. Etiology and significance. *Arch Neurol*. 1968;19:353-61.
11. Mathern GW, Babb TL, Vickrey BG, Melendez M, Pretorius JK. The clinical-pathogenic mechanisms of hippocampal neuron loss and surgical outcomes in temporal lobe epilepsy. *Brain*. 1995 Feb;118 (Pt 1):105-18.
12. Mathern G, Babb, TL and Armstrong, DL. Hippocampal sclerosis. In: Engel JJ PT, eds, editor. *Epilepsy: A comprehensive textbook*. Philadelphia: Lippincott-Raven.; 1997. p. 133-55.
13. Mathern GW BT. Hippocampal Sclerosis. In: Engel J PT, editor. *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p. 133-55.
14. Purpura DP PJ, Tomwe D, Woodbury DM, Walter R. *Experimental models of epilepsy*. New York: Raven Press; 1972.

15. Cavalheiro EA LZ, Bortolotto, WAT, Ikonomidou C. Long-Term Effects of Pilocarpine in Rats: Structural Damage of the Brain Triggers Kindling and Spontaneous Recurrent Seizures. *Epilepsia*. 1991;32(6):778-82.
16. Leite JP, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA. Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev*. 1990 Winter;14(4):511-7.
17. Ben-Ari Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*. 1985 Feb;14(2):375-403.
18. Walz R, Castro RM, Velasco TR, Carlotti CG, Jr., Sakamoto AC, Brentani RR, et al. Cellular prion protein: implications in seizures and epilepsy. *Cell Mol Neurobiol*. 2002 Jun;22(3):249-57.
19. Bonan CD, Walz R, Pereira GS, Worm PV, Battastini AM, Cavalheiro EA, et al. Changes in synaptosomal ectonucleotidase activities in two rat models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*. 2000 May;39(3):229-38.
20. Leite JP G-CN, Cavalheiro EA. New Insights from the use of pilocarpine and kainate models. *Epilepsy Res*. 2002;50(1-2):93-103.
21. Dal-Pizzol F KF, Vianna MM, Schroder N, Quevedo J, Benfato MS et al. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. *Neuroscience Letters*. 2000;291(3):179-82.
22. Connors BW, Gutnick MJ. Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends Neurosci*. 1990 Mar;13(3):99-104.
23. Connors BW. Neocortical anatomy and physiology In: Engel J PT, editor. *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p. 303-21.
24. Hoffman SN SP, Prince DA. Chronic neocortical epileptogenesis in vitro. *Journal of Neurophysiology*. 1994;71(5):1762-3.
25. Prince DA, Salin P, Tseng GF, Hoffman S, Parada I. Axonal sprouting and epileptogenesis. *Adv Neurol*. 1997;72:1-8.
26. Prince DA, Tseng GF. Epileptogenesis in chronically injured cortex: in vitro studies. *J Neurophysiol*. 1993 Apr;69(4):1276-91.
27. Sanabria ER, Su H, Yaari Y. Initiation of network bursts by Ca²⁺-dependent intrinsic bursting in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Physiol*. 2001 Apr 1;532(Pt 1):205-16.
28. Locock C. Discussion of paper by EH Sieveking: Analysis of 52 cases of epilepsy observed by the author. *Lancet*. 1857;1:527-8.
29. Gowers WR. *Epilepsy and other chronic convulsive diseases*. London: J. A. Churchill; 1881.

30. Herzog AG, Harden CL, Liporace J, Pennell P, Schomer DL, Sperling M, et al. Frequency of catamenial seizure exacerbation in women with localization-related epilepsy. *Ann Neurol*. 2004 Sep;56(3):431-4.
31. McEwen BS. Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *Trends Pharmacol Sci*. 1991 Apr;12(4):141-7.
32. McEwen B. Estrogen actions throughout the brain. *Recent Prog Horm Res*. 2002;57:357-384.
33. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med*. 2002 Jan 31;346(5):340-352.
34. DeFranco DB, Ramakrishnan C, Tang Y. Molecular chaperones and subcellular trafficking of steroid receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1998 Apr;65(1-6):51-8.
35. Compagnone NA, Mellon SH. Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front Neuroendocrinol*. 2000 Jan;21(1):1-56.
36. Woolley CS, Gould E, Frankfurt M, McEwen BS. Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci*. 1990 Dec;10(12):4035-9.
37. Stoffel-Wagner B. Neurosteroid metabolism in the human brain. *Eur J Endocrinol*. 2001 Dec;145(6):669-79.
38. Wehrenberg U, Prange-Kiel J, Rune GM. Steroidogenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-localization with StAR and aromatase. *J Neurochem*. 2001 Mar;76(6):1879-86.
39. Furukawa A, Miyatake A, Ohnishi T, Ichikawa Y. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) transcripts constitutively expressed in the adult rat central nervous system: colocalization of StAR, cytochrome P-450SCC (CYP XIA1), and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain. *J Neurochem*. 1998 Dec;71(6):2231-8.
40. Beyer C. Estrogen and the developing mammalian brain. *Anat Embryol (Berl)*. 1999 May;199(5):379-90.
41. Rune GM, Wehrenberg U, Prange-Kiel J, Zhou L, Adelman G, Frotscher M. Estrogen up-regulates estrogen receptor alpha and synaptophysin in slice cultures of rat hippocampus. *Neuroscience*. 2002;113(1):167-75.
42. Prange-Kiel J, Wehrenberg U, Jarry H, Rune GM. Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus*. 2003;13(2):226-34.
43. Prange-Kiel J, Rune GM, Leranth C. Median raphe mediates estrogenic effects to the hippocampus in female rats. *Eur J Neurosci*. 2004 Jan;19(2):309-17.
44. Kretz O, Fester L, Wehrenberg U, Zhou L, Brauckmann S, Zhao S, et al. Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *J Neurosci*. 2004 Jun 30;24(26):5913-21.

- 45.Green PS, Simpkins JW. Neuroprotective effects of estrogens: potential mechanisms of action. *Int J Dev Neurosci*. 2000 Jul-Aug;18(4-5):347-58.
- 46.Singh M, Meyer EM, Simpkins JW. The effect of ovariectomy and estradiol replacement on brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid expression in cortical and hippocampal brain regions of female Sprague-Dawley rats. *Endocrinology*. 1995 May;136(5):2320-4.
- 47.Singer CA, Rogers KL, Dorsa DM. Modulation of Bcl-2 expression: a potential component of estrogen protection in NT2 neurons. *Neuroreport*. 1998 Aug 3;9(11):2565-8.
- 48.Sohrabji F, Miranda RC, Toran-Allerand CD. Identification of a putative estrogen response element in the gene encoding brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Nov 21;92(24):11110-4.

NORMAS ADOTADAS

Este trabalho foi realizado seguindo a normatização para trabalhos de conclusão do Curso de Graduação em Medicina, aprovada em reunião do Colegiado do Curso de Graduação em Medicina da Universidade Federal de Santa Catarina, em 27 de novembro de 2005.

Essa normatização segue as recomendações da Convenção de Vancouver (Canadá) de acordo com a Quinta edição dos “requisitos uniformes para originais submetidos a Revistas Biomédicas”, publicado pelo Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas.