

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM 17 β -ESTRADIOL EM RATAS OVARIETOMIZADAS SUBMETIDAS A ESTRESSE EM UM MODELO DE ISQUEMIA *IN VITRO* DE FATIAS HIPOCAMPAIS

NASSIF, M.C.¹; CIMAROSTI, H.I.²; BALK, R.³; FROZZA, R.¹; BUZIN, L.¹; ZAMIN, L.L.¹; DALMAZ, C.⁴; SALBEGO, C.G.⁴

¹Bolsistas de Iniciação Científica, ²Doutoranda, ³Mestre, ⁴Professoras do Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

TRABALHO PREMIADO COM O 3º LUGAR NO XXIV CAPEC, APRESENTADO PELA PRIMEIRA AUTORA

RESUMO: Estudos demonstram que mulheres no período pré-menopausa exibem menor susceptibilidade à isquemia que homens e mulheres pós-menopausa, com idades equivalentes. Isso se deve provavelmente aos maiores níveis circulantes de estrógenos, principalmente 17 β -estradiol. O objetivo do trabalho foi investigar o efeito do tratamento crônico com 17 β -estradiol em fatias hipocâmpais de ratas ovariectomizadas (ovx) submetidas a estresse e expostas a um modelo *in vitro* de isquemia (privação de oxigênio e glicose - POG). Ratas adultas, ovx, receberam implantes subcutâneos de cápsulas de *silastic* contendo 17 β -estradiol a 5% ou veículo oleoso, sendo subdivididas em controles e estressadas (contenção 1 h/dia, 35 dias). Fatias hipocâmpais desses animais (400 μ m) foram pré-incubadas por 15 min a 37 °C. Após, as fatias controle permaneceram na incubadora e as POG foram incubadas em câmara de anóxia a 37 °C por 60 min. Posteriormente, ambos grupos foram incubados por 3 h a 37 °C (re-oxigenação). A lise na membrana celular foi quantificada pela liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH). Com o tratamento, houve redução significativa da liberação de LDH pós-insulto, indicando um efeito neuroprotetor. Com o estresse, observou-se um aumento da liberação de LDH em relação aos respectivos controles. Esses resultados sugerem que o hormônio teve efeitos neuroprotetores nesse modelo, mas não foi capaz de reverter o efeito do estresse.

UNITERMOS: estradiol, estresse, fatias hipocâmpais, isquemia cerebral, LDH, ovariectomia, POG

ABREVIATURAS: ER- α e ER- β , receptores estrogênicos α e β ; LDH, lactato desidrogenase; NMDA, ácido N-metil-D-aspartato; ovx, ovariectomizadas; POG, privação de oxigênio e glicose.

ABSTRACT: *Evaluation of the Effect of the Chronic Treatment with 17 β -estradiol in Ovariectomized Female Rats Submitted to Stress Against an In Vitro Model of Ischemia in Hippocampal Slices.* Several studies show that men and women differ with respect to the incidence of brain ischemia: premenopausal women have fewer strokes than observed in age-matched men. The purported neuroprotection in premenopausal women may be associated to higher level of circulating estrogens, mainly 17 β -estradiol. The target of this work was to examine the effect of the chronic treatment with 17 β -estradiol in ovariectomized (ovx) female rats submitted to stress against an *in vitro* model of ischemia in hippocampal slices (OGD – oxygen and glucose deprivation). Female adult rats, ovx, received subcutaneous implants with *silastic* capsules that contained 5 % 17 β -estradiol or the oil vehicle. They were subdivided in a control group and a stressed (restraint stress 1 h/day, 35 days). Hippocampal slices (400 μ m) were pre incubated for 15 min in a tissue incubator at 37° C. Afterwards, the control slices were incubated and the OGD slices were incubated in an anaerobic chamber for 60 min at 37 °C. Then, the slices of both groups were incubated for 180

min (recovery period). The tissue damage was determined by measuring the LDH activity. Results showed that 17 β -estradiol was neuroprotective, with a reduction in LDH release, but it was unable to revert the stress damage.

KEYWORDS: brain ischemia, estradiol, hippocampal slices, LDH, OGD, ovariectomy, stress

1 INTRODUÇÃO

O metabolismo energético cerebral apresenta vários aspectos particulares, como alta taxa metabólica, reservas energéticas internas limitadas e dependência crítica do fluxo sanguíneo contínuo para suprimento de oxigênio e glicose [31]. A interrupção do suprimento sanguíneo para o cérebro desencadeia uma cascata de eventos neurais, como liberação de grandes quantidades de glutamato [19, 26], aumento do influxo de cálcio [16, 29], formação de radicais livres [19, 30], aumento dos níveis de óxido nítrico para concentrações tóxicas [5,8] e outros mecanismos que podem levar à morte celular.

A isquemia cerebral é caracterizada por uma redução grave ou pelo bloqueio completo do fluxo sanguíneo normal em alguma região cerebral, geralmente causada por um trombo ou uma hemorragia [14, 28]. Constitui uma das principais causas de mortalidade na população adulta e idosa, ficando atrás apenas dos problemas cardiovasculares e câncer. Nos casos em que é possível uma recuperação, geralmente ela é parcial, levando a incapacidades físicas ou mentais permanentes [24, 25, 29].

Homens e mulheres não diferem em relação aos fatores de risco primários para a isquemia cerebral, tais como pressão alta e o avanço da idade. No entanto, vários estudos [2, 10, 20, 23, 24, 25] demonstram que homens e mulheres diferem no que se refere à incidência da isquemia: mulheres no período pré-menopausa exibem uma menor susceptibilidade a danos isquêmicos comparadas com homens e mulheres pós-menopausa com idades equivalentes. A menor incidência do insulto isquêmico em mulheres pré-menopausa pode estar relacionada com os níveis mais altos circulantes de estrógenos, principalmente o 17 β -estradiol [9, 10, 16].

Muitos estudos mostram que o 17 β -estradiol pode agir de diferentes maneiras para diminuir a susceptibilidade à isquemia cerebral em mulheres: diminuindo os níveis de colesterol sanguíneo [10] e de substâncias pró-inflamatórias presentes após uma lesão cerebral [17]; atenuando a toxicidade de aminoácidos excitatórios, como o glutamato [12, 21, 32]; estimulando a síntese e a atividade de fatores de crescimento [6, 33]; agindo em cascatas anti-

apoptóticas [4, 13, 18] ou através de suas propriedades antioxidantes [3, 7, 20, 23].

O dano resultante da isquemia no tecido cerebral pode variar em função de vários fatores, como os maiores níveis circulantes de hormônios liberados pelo estresse. Estudos preliminares em nosso laboratório, realizados com animais machos, demonstraram que a lesão tecidual ocasionada pela isquemia era maior quando os animais eram submetidos previamente a estresse crônico por contenção.

2 OBJETIVOS

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivos investigar o efeito do 17 β -estradiol sobre a morte celular induzida pela exposição de fatias hipocâmpais à situação de privação de oxigênio e glicose (POG), mimetizando a condição isquêmica, e verificar se esse tratamento seria capaz de reverter o maior dano ocasionado pelo estresse. Para isso, foram utilizadas ratas ovariectomizadas (ovx), com a finalidade de prevenir oscilações dos níveis hormonais fisiológicos, submetidas a estresse por contenção, que recebiam ou não o 17 β -estradiol em forma de implante subcutâneo, padronizando, dessa forma, o nível do hormônio circulante.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Ratas adultas Wistar, pesando cerca de 250 g, sofreram cirurgia para extirpação de seus ovários (ovariectomia) sob anestesia com cetamina (50 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) [15]. Após dois dias de recuperação, as ratas ovx receberam implantes subcutâneos de cápsulas de *silastic* contendo 10 μ L de 17 β -estradiol a 5 % (grupo tratado) ou apenas o veículo oleoso (grupo controle) [11] e foram subdivididas em controles e estressadas (estresse por contenção por 1 h/dia, por 35 dias). Após esse tempo, os animais foram mortos por decapitação 24 horas após a última sessão de estresse, o sangue do tronco coletado e o soro congelado para posterior dosagem do estradiol sérico e os hipocâmpos cuidadosamente dissecados. Foram preparadas fatias hipocâmpais com espessura de 400 μ m, utilizando-se um fatiador de tecido *McIlwain tissue chopper* [27]. As fatias foram distribuídas em duas placas de 24 poços, sendo uma controle e outra exposta à POG, e pré-incubadas por 15 minutos com um meio Krebs-Henseleit modificado (meio de pré-incubação) contendo (em mM): NaCl (120); KCl

(2); CaCl_2 (0,5) ; NaHCO_3 (26), MgSO_4 (10); KH_2PO_4 (1,18) , 11 glicose (11), em uma estufa a 37°C com atmosfera de 5 % CO_2 [22]. Uma menor concentração de cálcio e uma maior de magnésio, diferente das concentrações fisiológicas, foram utilizadas para inibir o receptor NMDA, prevenindo uma lesão mediada por seu estímulo [1]. Após o período de pré-incubação, as fatias da placa controle foram incubadas por 1 hora substituindo o meio de pré-incubação pelo meio controle (meio de incubação), contendo (em mM): NaCl (120); KCl (2); CaCl_2 (2); NaHCO_3 (26); MgSO_4 (1,19); KH_2PO_4 (1,18); glicose (11), em uma estufa incubadora a 37°C com atmosfera de 5 % CO_2 . As fatias que sofreriam POG foram lavadas duas vezes com um meio, semelhante ao controle, porém livre de glicose e saturado com N_2 , mimetizando uma condição isquêmica [8], e incubadas por 1 hora (período de POG) em uma câmara anaeróbica saturada com N_2 . Cessado o período de POG, os meios das fatias de ambas as placas foram removidos e os grupos receberam o meio de incubação controle contendo glicose. As placas foram incubadas por 3 horas (período de re-oxigenação) a 37°C com atmosfera de 5 % CO_2 . Os experimentos controle e POG foram realizados concomitantemente, sendo usadas fatias do mesmo animal.

A lise celular induzida pela POG foi quantificada pela liberação de lactato desidrogenase (LDH) no meio em que estavam contidas as fatias [8, 16, 34]. Após o período de re-oxigenação, foram retiradas alíquotas de 100 μL do meio de cada um dos 24 poços de ambas as placas para a medida da atividade da enzima, utilizando-se um *kit* (Doles Reagentes, Goiânia, Brasil). O estradiol sérico foi medido por enzima imunoensaio, utilizando-se um *kit* (Genzyme Diagnostics, San Carlos, CA, EUA). Os resultados foram analisados por ANOVA, seguido do teste de Duncan.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As ratas ovariectomizadas, que receberam o implante de hormônio, apresentaram o nível de estradiol sérico de 88,7 pg/ml (referência: 30 a 100 pg/mL), em média, mostrando que a reposição hormonal foi bem sucedida.

A figura 1 mostra a quantificação da atividade da LDH no meio de incubação de fatias hipocâmpais de ratas ovx que receberam implantes contendo o hormônio 17 β -estradiol (CH) ou o veículo óleo (CO), 3 horas depois de terem sido expostas à condição de privação de oxigênio e glicose durante 1 hora. Como pode ser visto, a administração crônica do hormônio induziu a uma diminuição de cerca de 23 % ($p < 0,05$) na liberação

de LDH no meio em relação às fatias das ratas que receberam apenas o veículo, o que pode ser considerado uma diminuição da morte celular. No caso das fatias das ratas estressadas e que sofreram POG, observou-se uma tendência ao aumento do dano celular, ilustrado pela maior liberação da enzima LDH no meio.

A LDH corresponde a uma enzima citosólica responsável pela interconversão de lactato e piruvato [16]. Sendo uma enzima intracelular, a lesão na membrana celular, provocada pela POG, leva ao seu extravasamento para o meio em que o tecido está contido. A liberação da LDH é menor nas fatias tratadas com o 17 β -estradiol, indicando uma menor morte celular comparada com as fatias que não receberam o hormônio. Esse resultado confirma muitos estudos que associam maiores níveis circulantes de estrógeno e neuroproteção pós-isquêmica em ratas [2, 10, 16, 23]. O modo como o 17 β -estradiol protege as células neurais ainda é objeto de estudo, sendo propostos mecanismos de ação que podem ou não envolver a ativação de seus receptores intracelulares [10]. A maior parte das funções fisiológicas do estrógeno é mediada através da ligação a seus receptores específicos intracelulares, denominados ER- α e ER- β . Esses receptores agem como fatores de transcrição ligante-ativados presentes em muitos tecidos, inclusive no tecido cerebral [10, 34]. É por meio da ativação de seus receptores que o estrógeno pode, por exemplo, atuar em cascatas anti-apoptóticas intracelulares [4, 13, 18]. Pesquisas em andamento neste laboratório, utilizando um modelo de cultura de tecido hipocâmpal *in vitro*, têm demonstrado um aumento na expressão de proteínas anti-apoptóticas nas fatias hipocâmpais tratadas com 17 β -estradiol comparada com as fatias que não receberam o hormônio (resultados não publicados). Um outro mecanismo estrogênico bem documentado, porém independente da ativação de receptores, é através de suas propriedades antioxidantes [3, 7, 20, 23]. Estudos mostram que o estradiol possui propriedades antioxidantes que suprimem o estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio, superóxido e outras formas reativas de oxigênio em neurônios e outras células neurais [3, 7]. O 17 β -estradiol também decresce a peroxidação lipídica da membrana celular, como demonstrado em alguns estudos [10]. Com esses dados, muitos pesquisadores sugerem que o estrógeno pode proteger células do dano cerebral induzido por radicais livres de oxigênio, com ação direta contra eles e através da preservação dos sistemas antioxidantes endógenos [20].

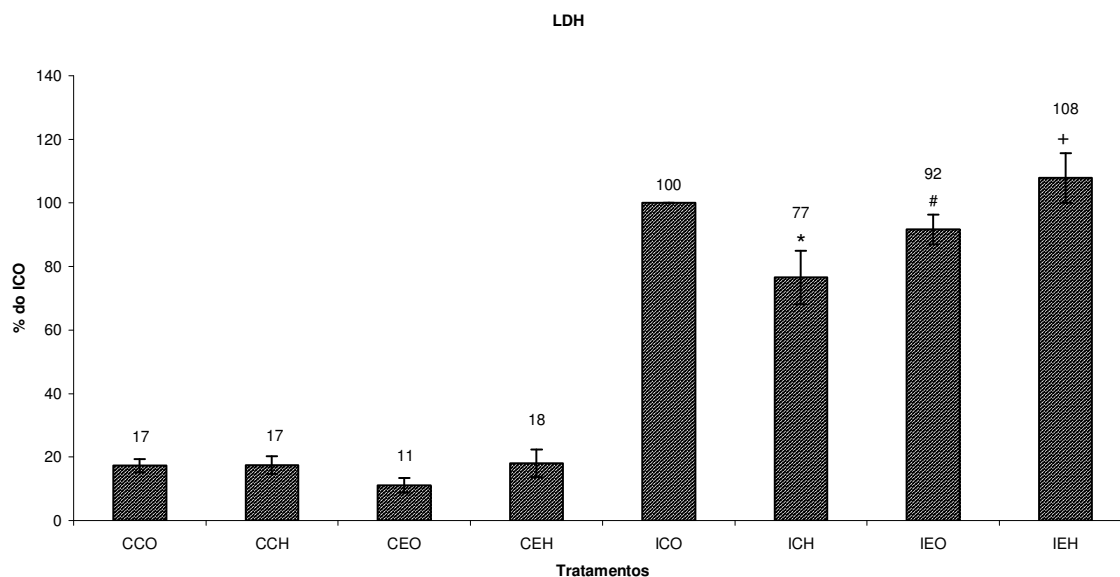


Figura 1. Verificação do dano na membrana celular, medido pela quantificação da atividade da enzima LDH. (CCO - fatias de ratas com óleo não estressadas, CCH - fatias de ratas tratadas com hormônio não estressadas, CEO - fatias de ratas com óleo e estressadas, CEH - fatias de ratas tratadas com hormônio e estressadas, ICO - fatias de ratas com óleo e que sofreram POG, ICH - fatias de ratas tratadas com hormônio e que sofreram POG, IEO - fatias de ratas com óleo, estressadas e que sofreram POG, IEH - fatias de ratas tratadas com hormônio, estressadas e que sofreram POG). ANOVA, seguida pelo teste de raio múltiplo de DUNCAN, n = 10. * Significativamente diferente do grupo ICO ($p < 0,05$); # Significativamente diferente do grupo ICH ($p < 0,05$); + Significativamente diferente do grupo ICH ($p < 0,05$)

Apesar do efeito neuroprotetor demonstrado pelo hormônio frente à lesão isquêmica nesse modelo, o 17 β -estradiol não se mostrou capaz de reverter o dano ocasionado pela POG em animais submetidos ao estresse crônico, sugerindo uma interação entre os efeitos da POG e aqueles da exposição ao estresse. Assim, quando esses dois insultos encontram-se associados, levam a danos que a administração de estradiol não foi capaz de prevenir e que poderiam estar associados com uma potencialização dos prejuízos energéticos sofridos pela célula.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O resultado do presente trabalho sugere que o tratamento crônico das ratas ovariectomizadas com 17 β -estradiol protegeu o tecido hipocampal do dano induzido pela exposição à privação de oxigênio e glicose. O mecanismo envolvido nessa proteção ainda não está esclarecido. Esse pode envolver a ação do hormônio através da ligação a receptores, podendo desencadear uma cascata de eventos intracelulares, como também o 17 β -estradiol pode estar exercendo a ação neuroprotetora como um

agente antioxidante. Estudos adicionais estão sendo desenvolvidos neste laboratório a fim de esclarecer o papel do estresse nesse modelo além de tentar elucidar os mecanismos pelos quais o hormônio neuroprotege.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AITKEN, P.G.; BREESE, G.R.; DUDEK, F.F.; EDWARDS F.; ESPANOL, M.T.; LARKMAN, P.M.; LIPTON P.; NEWMAN, G.C.; NOWAK, Jr., T.S.; PANIZZON, K.L.; RALEY-SUSMAN, K. M.; REID, K.H.; RICE, M.E.; SARVEY, J.M.; SCHOEPP, D.D.; SEGAL, M.; TAYLOR, C.P.; TEYLER, T.J. and VOULADAS, P.J. Preparative methods for brain slices: a discussion. *J. Neurosc. Meth.*, v. 59, p. 139-149, 1995.
- [2] ALKAYED, N.J.; MURPHY, S.J.; TRAYSTMAN, R.J. and P.D. HURN, Neuroprotective effects of female gonadal steroids in reproductively senescent female rats. *Stroke*, v. 31, p. 161-168, 2000.
- [3] BEHL, C. Estrogen can protect neurons: modes of action. *J. Steroid Biochem. Biol.*, v. 83, p. 195-197, 2003.

- [4] BELCREDITO, S.; VEGETO, E.; BRUSADELLI, A.; GHISLETTI, S.; MUSSI, P.; CIANA, P. and MAGGI, A. Estrogen neuroprotection: the involvement of Bcl-2 binding protein BNIP2. **Brain Res. Reviews**, v. 37, p. 335-342, 2001.
- [5] CÁRDENAS, A.; MORO, M.A.; HURTADO, O.; LEZA, J.C.; LORENZO, P.; CASTRILLO, A.; BODELÓN, O.G.; BOSCA, L. and LIZASOAIN, I. Implication of glutamate in the expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. **J. Neurochem.**, v. 74, p. 2041-2048. 2000.
- [6] CARDONA-GÓMEZ, G.P.; MENDEZ, P.; DONCARLOS, L.L.; AZCOITIA, I. and GARCIA-SEGURA, L.M. Interactions of estrogens and insulin-like growth factor-I in the brain: implications for neuroprotection. **Brain Res. Reviews**, v. 37, p. 320-334, 2001.
- [7] CULMSEE, C.; VEDDER, H.; RAVATI, A.; JUNKER, V.; OTTO, D.; AHLEMEYER, B. and KRIEG, J.C.; KRIEGLSTEIN, J. Neuroprotection by estrogens in a mouse model of focal cerebral ischemia and in cultured neurons: evidence for a receptor-independent antioxidative mechanism. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 19, p. 1263-1269, 1999.
- [8] De ALBA, J.; CÁRDENAS, A.; MORO, M.A.; LEZA, J.C.; LORENZO, P. and LIZASOAIN, I. Use of brain slices in the study of pathogenic role of inducible nitric oxide synthase in cerebral ischemia-reperfusion. **Gen. Pharmacol.**, v. 32, p. 577-581, 1999.
- [9] DHANDAPANI, K.M. and BRANN, D.W. Estrogen-astrocyte interactions: implications for neuroprotection. **BMC Neurosc.**, v. 3, p. 1-4, 2002.
- [10] GARCIA-SEGURA, L.M.; AZCOITIA, I. and DON CARLOS, L.L. Neuroprotection by estradiol. **Prog. Neurobiol.**, v. 63, p. 29-60, 2001.
- [11] GEARY, N.; TRACE, D.; MCEWEN, B. and SMITH, G.P. Cyclic estradiol replacement increases the satiety effect of CCK-8 in ovariectomized rats. **Physiol. Behav.**, v. 56, p. 281-289, 1994.
- [12] HARMS, C.; LAUTENSCHLAGER, M.; BERGK, A.; KATCHANOV, J.; FREYER, D.; KAPINYA, K.; HERWIG, U.; MEGOW, D.; DIRNAGL, U.; WEBER, J.R. and HÖRTNAGL, H., Differential mechanisms of neuroprotection by 17 β -estradiol in apoptotic versus necrotic neurodegeneration. **J. Neurosc.**, v. 21, p. 2600-2609, 2001.
- [13] HE, Z.; HE, Y.J.; DAY, A.J. and SIMPKINS, J.W. Proteus levels of estradiol during transient global cerebral ischemia improves the histological outcome of the hippocampal CA1 region: perfusion-dependent and-independent mechanisms. **J. Neurol. Sci.**, v. 193, p. 79-87, 2002.
- [14] HORST, G.J.T and KORF, J. (Ed.) **Clinical Pharmacology of Cerebral Ischemia**. New Jersey: Humana, 1997. p. 1-60.
- [15] HRUPKA, B.J.; SMITH, G.P. and GEARY, N. Ovariectomy and estradiol affect postingestive controls of sucrose licking. **Physiol. Behav.**, v. 61, p. 243-247, 1996.
- [16] LIAO, S.L.; CHEN, W.Y.; KUO, J.S. and CHEN, C.J. Association of serum estrogen level and ischemic neuroprotection in female rats. **Neurosc. Letters**, n. 297, p. 159-162, 2001.
- [17] LIAO, S.L.; CHEN, W.Y.; KUO, J.S. and CHEN, C.J. Estrogen attenuates tumor necrosis factor- α expression to provide ischemic neuroprotection in female rats. **Neurosc. Letters**, n. 330, p. 159-162, 2002.
- [18] LINDFORD, N.J. and DORSA, D.M. 17 β -estradiol and the phytoestrogen genistein attenuate neuronal apoptosis induced by the endoplasmic reticulum calcium-ATPase inhibitor thapsigargin. **Steroids**, n. 5686, p. 1-12, 2002.
- [19] LIPTON, P. Ischemic cell death in brain neurons. **Physiological Reviews**, v. 79, p. 1431-1568, 1999.
- [20] McCULLOUGH, L.D. and HURN, P.D. Estrogen and ischemic neuroprotection: an integrated view. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 14, p. 228-234, 2003.
- [21] MENDELOWITSCH, A.; RITZ, M.F.; ROS, J.; LANGEMANN H. and GRATZL, O. 17 β -estradiol reduces cortical lesion size in the glutamate excitotoxicity model enhancing extracellular lactate: a new neuroprotective pathway. **Brain Res.**, n. 901, p. 230-236, 2001.
- [22] MORO, M.A.; De ALBA, J.; LEZA, J.C.; LORENZO, P.; FERNÁNDEZ, A.P.; VENTURA, M.L.; BOSCA, L.; RODRIGO, J. and LIZASOAIN, I. Neuronal expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. **Eur. J. Neurosc.**, v. 10, p. 445-456, 1998.

- [23] ÖGE, A.; SEZER, E.D.; ÖZGÖNÜL, M.; BAYRAKTAR, F. and SÖZMEN, E.Y. The effects of estrogen and raloxifene treatment on the antioxidant enzymes and nitrite-nitrate levels in the brain cortex of ovariectomized rats. **Neurosc. Lett.**, n. 338, p. 217-220, 2003.
- [24] PAGANINI-HILL, A. Hormone replacement therapy and stroke: risk, protection or no effect? **Maturitas**, v. 38, p. 243-261, 2001.
- [25] PAGANINI-HILL, A. Estrogen replacement therapy and stroke. **Prog. Cardiovasc. Dis.**, v. 38, p. 223-242, 1995.
- [26] PHILLIS, J.W. and O'REGAN, M.H. Characterization of modes of release of amino acids in the ischemic/reperfused rat cerebral cortex. **Neurochem. Int.**, v. 43, p. 461-467, 2003.
- [27] PORCIÚNCULA, L.O.; ROCHA, J.B.T.; CIMAROSTI, H. I.; VINADÉ, L.; GHISLENI, G.; SALBEGO C.G. and SOUZA, D.O. Neuroprotective effect of ebselen on rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation: correlation with immunoccontent of inducible nitric oxide synthase. **Neurosc. Lett.**, n. 346, p. 101-104, 2003.
- [28] PRICE, D. New order from neurological disorders. **Nature**, n. 399, p. A3-A5, 1999.
- [29] RANG, H.P; DALE, M.M. and RITTER, J.M. **Farmacologia**. 4^a ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 421-422.
- [30] REGAN, R.F. and GUO, Y., Estrogens attenuate neuronal injury due to hemoglobin, chemical hypoxia, and excitatory amino acids in murine cortical cultures. **Brain Res.**, n. 764, p. 133-140, 1997.
- [31] SIEGEL, G.L. AGRANOFF, B.W.; ALBERS, R.W.; FISHER, S.K. and UHLER, M.D. (Ed.). **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical aspects**. 6th. ed. Philadelphia, New York: Lippincott, Raven, 1999. p.1183.
- [32] STEIN, D.G., Brain damage, sex hormones and recovery: a new role for progesterone and estrogen? **Trends Neurosc.**, v. 24, p. 386-391, 2001.
- [33] SUDO, S., WEN, T.C., J. DESAKI, MATSUDA, S.; TANAKA, J.; ARAI, T.; MAEDA, N. and SAKANAKA, M., β -estradiol protects hippocampal CA1 neurons against transient forebrain ischemia in gerbil. **Neurosc. Res.**, v. 29, p. 345-354, 1997.
- [33] WILSON, M.E.; DUBAL, D.B. and WISE, P.M. Estradiol protects against injury-induced cell death in cortical explant cultures: a role for estrogen receptors, **Brain Res.**, n. 873, p. 235-242, 2000.

Agradecimentos

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), Pró-reitoria de Pesquisa (PROPESQ-UFRGS) pelo apoio financeiro.

Endereço para correspondência:

Prof^ª. Dr. Christianne Gazzana Salbego
Rua Ramiro Barcellos 2600, Anexo
90035 003. Porto Alegre/RS
Tel: 0-XX-51-33165569
Fax: 0-XX-51-33165565
e-mail: <salbego@terra.com.br>

Recebido em 15.10.2003.

Aceito em 15.10.2003.

Revisto em 23.11.2003.