

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
MESTRADO EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO

EFEITOS DA CASTRAÇÃO SOBRE O VOLUME SOMÁTICO DOS
NEURÔNIOS NAS CAMADAS II E IV DO CÓRTEX
ENTORRINAL DE RATOS

MARCIA GHISI MEZADRI

FLORIANÓPOLIS, 1997.

MARCIA GHISI MEZADRI

**EFEITOS DA CASTRAÇÃO SOBRE O VOLUME SOMÁTICO DOS
NEURÔNIOS NAS CAMADAS II E IV DO CÓRTEX
ENTORRINAL DE RATOS.**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre. Curso de Pós-Graduação em *Neurociências e Comportamento*, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. José Marino Neto

Florianópolis 1997

Ficha Catalográfica

MEZADRI, Márcia Ghisi. Efeitos da castração sobre o volume somático dos neurônios nas camadas II e IV do córtex entorrinal de ratos. Florianópolis, 1997. 65p. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Comportamento) - Curso de Pós - Graduação em Neurociências e Comportamento, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. José Marino Neto

Defesa: 15/12/1997.

Análise das alterações no volume dos corpos celulares de neurônios do Córtex Entorrinal (E.C.) nas regiões Lateral (LEA) e medial (MEA), nas camadas II e IV de ratos machos induzidas por castração no 5º dia de vida pós-natal. Foram utilizados 17 ratos divididos em 2 grupos (C,N-8) castrados e (Nc,N-9) não castrados. Posteriormente (90 dias), foram sacrificados e seus hemisférios foram separados em plano sagital mediano, (hemisfério direito foi cortado em plano horizontal no meio do flóculo) os cortes histológicos tingidos com Nissl foram mensurados em três níveis anatômicos (ventral, intermediário e dorsal). Os volumes celulares dos neurônios inseridos nas camadas II e IV foram mensurados por uma ocular de medição com o tambor rotativo, adaptada a um microscópio de luz. Os dados dos animais castrados demonstraram uma diminuição significativa no volume de seus corpos celulares (34%), quando comparados com os valores médios do grupo controle. A região MEA apresentou somata com volumes menores. A camada IV do MEA no nível ventral apresentou maior diferença entre as médias e a camada II do LEA no nível dorsal apresentou menor diferença entre as médias, indicando que o nível dorsal é menos susceptível aos efeitos da castração. Os achados também sugerem que nas regiões ventrais é onde se acentuam os efeitos da castração. Estes resultados sugerem que a castração pode modificar a morfologia do CE.

**“EFEITOS DA CASTRAÇÃO SOBRE O VOLUME SOMÁTICO DOS
NEURÔNIOS DAS CAMADAS II E IV DO CÓRTEX ENTORRINAL DE
RATOS”.**

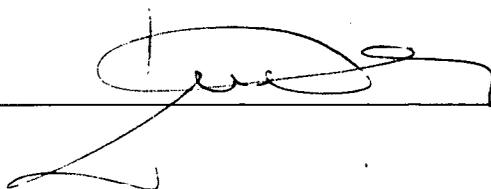
MARCIA GHISI MEZADRI

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO

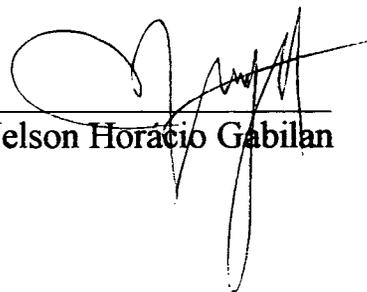
na área de Neurofisiologia e Comportamento Aprovada em sua forma final pelo
Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento.

Orientador



José Marino Neto

Coordenador do Curso

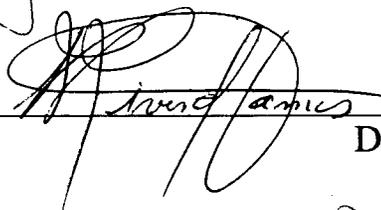


Nelson Horácio Gabilan

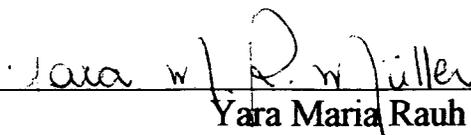
Banca Examinadora



José Marino Neto (Presidente)



David Rivero Tames



Yara Maria Rauh Müller

OFEREÇO

Aos meus pais *Lydio Ghisi & Angela da Silva Ghisi*

por conseguirem ensinar a lição mais difícil: o amor

Ao meu esposo *Felmo José Mezadri*

pela compreensão, incentivo e carinho.

Aos meus filhos *Bruno Ghisi Mezadri & Mirela Ghisi Mezadri*

por serem o motivo da minha existência

Às minhas irmãs *Lígia Ghisi & Patrícia Ghisi*

pelo privilégio do convívio.

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, por sua presença a cada momento.

Ao professor orientador, Dr. *José Marino Neto*, pela grandeza e sabedoria com que conduziu o trabalho.

Ao professor Dr. *David Riveiro James* pelo incansável apoio e amizade.

Ao diretor da Faculdade de Odontologia do Vale do Itajaí, professor *Telmo José Mezadri*, pelo apoio, incentivo e pelo respeito que mantém aos seus docentes.

Aos professores *Emílio A. Perula, Ricardo V. Boas, Carlos A. de Brito, Manoel J. Simão e Osvaldo Mora*, por permitirem o aprimoramento técnico em seus laboratórios.

Ao professor Dr. *Ricardo Tramonte* pelos ensinamentos iniciais.

Ao secretário do curso *Nivaldo M. Vicente*, pelo profissionalismo, dedicação e amizade com que nos atende.

Aos amigos *Nestor S. de Carvalho, Túlio Calcanha, Henri Stuke, Susana Schlemper, Elizabete Gama, Cinthia Phillips, Claudia B. Cruz, Emilia Colombina, Roseli Morastoni, Flávio Dias, Ricardo Ghisi Tobaldini, Nair T. P. da Silva, Sueli da Silva, Elizabete R. Botan, Eliel Waight*, pela amizade e pelo auxílio na elaboração deste trabalho.

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

1. Introdução.....	01
1.1. Dimorfismo Sexual.....	01
1.2. Formação Hipocampal.....	09
1.3. Córtex Entorrinal.....	10
2. Materiais e Métodos.....	21
2.1. Procedimentos cirúrgicos.....	21
2.2. Perfusão.....	23
2.3. Obtenção dos cortes.....	23
2.4. Técnica Histológica.....	25
2.5. Determinação dos cortes e codificação das lâminas.....	25
2.6. Obtenção dos resultados.....	26
2.7. Análise dos resultados.....	27
3. Resultados.....	31
4. Discussão.....	40
4.1. Considerações finais.....	46
5. Referências Bibliográficas.....	48

RESUMO

A presença do dimorfismo sexual na formação hipocampal já é conhecida há tempo. Foram verificadas diferenças entre machos e fêmeas no que se refere ao número de espinhos dendríticos de células piramidais do hipocampo e tamanho das células granulares do giro denteado. Entretanto, as diferenças morfológicas induzidas por hormônios no córtex entorrinal (E.C.) ainda não foram descritas. Este estudo objetivou analisar as alterações no volume dos corpos celulares de neurônios do CE nas regiões lateral (LEA) e medial (MEA), nas camadas II e IV de ratos machos, induzidas pela castração no 5^o dia de vida. Para tanto, foram divididos em dois grupos 17 ratos machos com 5 dias de vida pós-natal, a saber: animais castrados (C, N=8) e controle (Nc, N=9). Os animais do grupo controle foram submetidos ao mesmo trauma, porém sem sofrerem a castração. Quando os animais atingiram 90 dias de idade, foram sacrificados e os hemisférios cerebrais foram separados em plano sagital mediano. O hemisfério direito foi cortado em plano horizontal no meio do flóculo, (bregma 7,3mm e lateral 12,6mm, plano de PAXINOS e WATSON, 1982), Os cortes histológicos foram analisados em três níveis: ventral (1,9mm intraural), intermédio(3,9mm intraural) e dorsal(5,4mm intraural). Os volumes celulares das camadas II e IV das regiões LEA e MEA, através da fórmula de Salvatore, (1972). Os procedimento de análise resultou nas medidas de 32 corpos celulares de cada lâmina histológica, perfazendo um total de 1.344 células verificadas. Os dados dos animais castrados demonstraram uma diminuição significativa no volume de seus corpos celulares, quando comparada com os valores médios do grupo controle. A camada IV do MEA no nível ventral foi a que apresentou maior diferença entre as médias e a camada II do LEA no nível dorsal a que apresentou menor diferença entre as médias, indicando que o nível dorsal é menos susceptível aos efeitos da castração, pois ao se estudar o volume dos pericários nas camadas observadas, tanto na região do MEA como na região do LEA, as diferenças entre as médias foram menores. Os achados também sugerem que nas regiões ventrais é onde se acentuam os efeitos da castração. Estes resultados sugerem que a castração pode modificar a morfologia do CE.

ABSTRACT

The presence of sexual dimorphism in the hippocampal formation has been known for a long time. It has also been verified that there are differences between males and females regarding the number of dendritic spines of the hippocampal pyramidal cells. And the size of the granular cells of the dentate gyrus. However, the morphological differences induced by hormones in the entorhinal cortex (EC) have not been described yet. This study aimed at analyzing the alterations of the volume in the cellular bodies of the CE neurons, in the lateral (LEA) and medial (MEA) regions, in layers II and IV of male rats, when induced by castration in their fifth day of life. To achieve this aim, 17- five-day-old male rats were divided into two groups: castrated animals (C, N=8) and control (Nc, N=9). The control group animals underwent the same trauma. However, they did not suffer castration. When the animals were 90 -days old, they were sacrificed and the cerebral hemispheres were separated into a median sagittal plain. The right hemisphere was horizontally cut in the middle of the flocculus, (bregma 7,3mm and lateral 12,6 mm, PAXINOS & WATSON, 1982 plain). The histological incisions were analyzed according to three levels: ventral (1.9 mm intra-aural), intermediate (3.9 mm intraural) and dorsal (5,4mm intra-aural). The cellular volumes of layers II and IV in the LEA and MEA regions were calculated according to Salvatore,(1972). The analysis procedure resulted in the measures of 32 cellular bodies of each histological lamina, summing up 1.344 documented cells. The achieved mean values, demonstrated a significant reduction of the volume in the cellular bodies of castrated animals, if compared with the group control mean values. The layer IV of the MEA, in the ventral level, presented the greatest difference between the mean values. The layer II of the LEA, in the dorsal level, showed the slightest difference, indicating that the dorsal level is less susceptible to the castration effects, for when analyzing the nuclear volume of the cells in the observed layers (MEA and LEA), the differences between the mean values were attenuated. The findings also suggest that it is in the ventral regions that the castration effects are emphasized. These results suggest that castration can change EC morphology.

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Dimorfismo Sexual

Durante vários séculos, tentou-se esclarecer o significado da diferença entre os sexos. Somente no início deste século, houve a preocupação por parte dos estudiosos em investigar o dimorfismo sexual no Sistema Nervoso Central de diversas espécies (MADEIRA e LIEBERMAN, 1995). O termo dimorfismo sexual no cérebro ou o “sexo do cérebro”, como também é conhecido, refere-se a diferenças morfológicas e funcionais que podem existir entre os cérebros de machos e fêmeas (ARNOLD e GORSKY, 1984).

O estudo do dimorfismo sexual avançou consideravelmente a partir de trabalhos que demonstraram a existência de núcleos, da área pré-óptica de ratos, ligeiramente maiores nos machos quando comparados com os mesmos núcleos em fêmeas. Além disso, nesta mesma área, também o volume celular apresentava-se significativamente maior em machos (GORSKY et al., 1978). Indicando que o dimorfismo possa estar relacionado com hipertrofia celular.

Tais núcleos foram posteriormente denominados de núcleos

sexualmente-dimórficos da área pré-óptica (NSD-PA), estando presentes em todas as espécies de mamíferos estudadas, inclusive a humana. Desta maneira, a pesquisa sobre as diferenças morfológicas ou fisiológicas no sistema nervoso, vem sendo relacionada com os estudos sobre NSD-PA. (MADEIRA e LIEBERMAN, 1995; GORSKY et.al.,1978).

No Sistema Nervoso Central, já foram descritas diversas áreas que apresentam dimorfismo sexual, resultando em diferenças morfológicas (McEWEN,1977;1979) e comportamentais (WARREN et al.,1995). Tais diferenças incluem alterações do volume neuronal, comprimento das arborizações dendríticas, número de espinhos dendríticos, forma e localização das sinapses sobre um determinado grupo de neurônios (McEWEN, 1979 ; GOY e McEWEN, 1980), neurônios piramidais maiores no córtex somatossensorial em ratos machos (GREGORY , 1975); aumento do tamanho e número de neurônios em várias áreas do córtex somatossensorial de ratos machos (YANAI, 1979a); espessura maior em áreas do córtex de animais machos (PFAFF, 1966; YANAI, 1979b; REID e JURASCA, 1992); ratos machos com árvores dendríticas maiores no córtex pré-frontal (KOLB e STUWART, 1991; MADEIRA e LIEBERMAN, 1995); complexo hipocampo-giro denteado do lado direito dos machos, mais espesso do que o das fêmeas (DIAMOND, 1987). As alterações encontradas nos cérebros de machos e fêmeas estão vinculadas à ação dos hormônios esteróides gonadais.(ARNOLD e GORSKY, 1984; DIAMOND, 1987; McEWEN,1979; McLUSKY e NAFTOLIN, 1981;

GOULD, et al., 1990; HIEMKE et al., 1992; MADEIRA e LIEBERMAN, 1995; SEGURA-GARCIA, 1996; SEGÓVIA e GUILLAMÓN, 1996).

Esteróides gonadais, como o estradiol, a progesterona e a testosterona, são semelhantes entre si e muito similares ao colesterol, molécula a partir da qual esses esteróides são sintetizados. Os hormônios sexuais, que são lipossolúveis, atravessam a membrana celular e se unem a um receptor nuclear. Estes receptores podem estar solúveis no citosol ou no núcleo, e são proteínas monoméricas que se ligam ao ácido desoxirribonucléico (ADN) através das “alças” ricas em cisteína. Acredita-se que estas “alças” envolvam as hélices de ADN (GOODMAN, 1994). O receptor específico, após ser ativado pelo hormônio, abre-se, mostrando o local de ligação (no centro da molécula receptora) ao ADN chamados de elementos hormônio-responsivos. Tal processo resulta no aumento da atividade de uma enzima denominada ARN-polimerase e também na produção do ARN-mensageiro (ARNm). As moléculas de ARN, sintetizadas a partir de um molde de ADN, têm como função levar mensagens às organelas celulares que sintetizam proteínas (RANG e DALE, 1991). As proteínas formam a base do funcionamento celular, onde algumas atuam como enzimas catalisadoras de reações químicas, outras são parte da estrutura celular de seu esqueleto interno ou de porções de suas membranas (receptores). Desta forma, produção de determinadas proteínas pelos neurônios, os hormônios sexuais

têm muitas maneiras de afetar a função cerebral (GARCIA -SEGURA, 1996).

Todos os esteróides que mostram atividade sobre o cérebro, seja de origem glandular ou cerebral, metabolizados ou não, são chamados de *esteróides neuroativos* (SEGÓVIA e GUILLAMÓN, 1996). Em ratos machos e fêmeas os esteróides neuroativos, como a testosterona e o estrogênio, são retidos competitivamente no hipotálamo, área pré-óptica e amígdala e estes eventos foram observados em ratos com até 5 dias de vida pós-natal (McEWEN, 1979; McLUSKY e NAFTOLIN, 1981). Assim, as teorias mais aceitas na atualidade sobre a origem do dimorfismo sexual baseiam-se em trabalhos sobre os efeitos dos esteróides gonadais no período perinatal, período no qual se origina o NSD - PA (ARNOLD e GORSKY, 1984; McLUSKY e NAFTOLIN, 1981; SEGÓVIA e GUILLAMÓN, 1996).

Existem células que concentram esteróides gonadais ou seus derivados em áreas cerebrais, controlando a liberação de gonadotrofinas e o conseqüente comportamento sexual de mamíferos e de outros vertebrados. Já na década de 70, verificou-se que as células nervosas, que apresentavam afinidade por esses hormônios, estavam localizadas prioritariamente nas áreas denominadas como cérebro "periventricular" (STUMPF, 1970), conhecidas hoje como núcleos hipotalâmicos periventriculares (MADEIRA e LIEBERMAN, 1995).

Além de serem observadas nas áreas já descritas, evidenciaram-se esteróides gonadais em outras regiões do Sistema Nervoso Central, tais como na formação hipocampal, (WOOLLEY e McEWEN, 1993; GOULD, et al., 1990; ROOF e HAVENS, 1992; DIAMOND, et al. 1983; WIMER e WIMER, 1985; BETTINI, et al., 1992; ROOF, 1993; PARDUCZ e SEGURA-GARCIA, 1993) e em determinadas áreas corticais como no córtex entorrinal, áreas próximas ao sulco rinal e córtex piriforme (STUMPF et al., 1974; MULDOON, 1980; MADEIRA e LIEBERMAM, 1995;).

A produção de testosterona pelos testículos de ratos inicia-se no 13º dia de vida intra-uterina, estendendo-se ao longo de toda a vida do animal (McEWEN, 1979). Diversos estudos, mostram que as alterações morfológicas provocadas pelos esteróides gonadais masculinos ocorrem durante "período crítico" que ocupa a primeira semana de vida pós-natal, (GODINA e BARASSA, 1964; COTMAM, et al., 1973; ZIMMER, 1977; McEWEN, 1979; GOY e McEWEN, 1980; McLUSKY e NAFTOLIN, 1981; MADEIRA e LIEBERMAM, 1995; GARCÍA-SEGURA, 1996). Os padrões sexuais dimórficos, tanto morfológicos como comportamentais de diversas espécies animais, são resultado da presença ou ausência de androgênicos durante o "período crítico", em relação ao desenvolvimento (GOY e McEWEN, 1980; McLUSKY e NAFTOLIN, 1981). Nesta fase, a testosterona é fundamentalmente importante no estabelecimento dos padrões morfológicos e comportamentais de machos

(McEWEN, 1979; GOY e McEWEN, 1980; MADEIRA e LIEBERMAM, 1995).

A testosterona provoca uma série de mudanças no cérebro em desenvolvimento, cujo resultado é a “masculinização”. Assim, o sexo gonadal acaba determinando o sexo fenotípico do cérebro. A presença dos testículos e, portanto, a possibilidade de produzir testosterona durante o período “crítico” de diferenciação sexual do cérebro, tem como consequência o desenvolvimento de uma estrutura cerebral do tipo masculina (GARCÍA-SEGURA, 1996).

Sabe-se que os neurônios de muitas áreas cerebrais são capazes de transformar testosterona em estradiol, sugerindo que grande parte dos efeitos masculinizantes sobre o cérebro deva-se à presença de estradiol em sítios que apresentam receptores para o mesmo (McLUSKY e NAFTOLIN, 1981; GARCÍA-SEGURA, 1996). Os neurônios áreas podem transformar a testosterona em estradiol, graças a uma enzima sintetizada e secretada principalmente nas células do núcleo sexualmente dimórfico do hipocampo (BALTHAZAR e JOIDART, 1993) , chamada de aromatase (McLUSKY e NAFTOLIN, 1981; SEGÓVIA e GUILLAMÓN, 1996), explicando a presença de receptores de estradiol em determinadas regiões do Sistema Nervoso Central (STUMPF, et al., 1975; DIAMOND, 1983)

Apesar da possibilidade do estradiol ser um hormônio responsável pela masculinização, fêmeas recém nascidas, com taxas séricas aumentadas de

estradiol, não se masculinizam neste período. Isto encontra fundamento no fato de que este hormônio apresenta grande afinidade por uma proteína circulante, a α - feto proteína. Ao se unir com a molécula do estradiol, a α -feto proteína forma um complexo relativamente grande, não lhe permitindo chegar ao cérebro, pois este não ultrapassa a barreira hemato encefálica (McLUSKY e NAFTOLIN, 1981; SEGÓVIA e GUILLAMÓN, 1996).

A remoção cirúrgica das gônadas em ratos durante as primeiras semanas de vida pós-natal promove alterações morfológicas marcantes em várias regiões corticais e em outras áreas do Sistema Nervoso Central (VAN EDEN, et al., 1954 ; DIAMOND, 1987; MADEIRA e LIEBERMAM, 1995). Fêmeas neonatas ovariectomizadas, quando adultas, apresentam um padrão de córtex semelhante ao córtex dos machos, ou seja, o hemisfério direito é maior do que o esquerdo (DIAMOND, 1987). A ovariectomia em ratas neonatas produz na vida adulta uma diminuição quanto à densidade de espinhos dendríticos no campo de Ammon do hipocampo (GOULD, et al., 1990). A castração em camundongos machos com 20 dias de vida pós-natal previne o pico de formação de espinhos dendríticos de algumas células hipocâmpais, que ocorre por volta do 35º dia de idade (MEYER, et al., 1978).

PFAFF (1966) observou diferenças entre machos no 7º. dia de vida pós-natal entre animais castrados e não castrados, na área pré-óptica lateral e

nos núcleos habenulares . GOY e McEWEN (1980) demonstraram que o período considerado “crítico” para os ratos é o 5º e não o 7º dia de vida pós-natal, período em que ocorre um aumento súbito das taxas séricas de testosterona, podendo este hormônio causar efeitos morfo-fisiológicos e comportamentais. Tais estes efeitos que podem ser classificados como organizacionais e ativacionais. (GOY e McEWEN, 1980).

A) Organizacional: Está relacionado com modificações permanentes na citoarquitetura neuronal. Morfologicamente, pode-se encontrar alterações relacionados com tamanho dos neurônios, tamanho de seus núcleos e número celular, no tamanho do número de espinhos dendríticos ou ainda aumento no volume de um determinada área do córtex (McEWEN,1979; GOY e McEWEN, 1980; HIENKE, et al.,1992).

B) Ativacional : Promove alterações transitórias e reversíveis na fisiologia neuronal, podendo esses efeitos diminuir, em ausência ou supressão de esteróide (GOY e McEWEN, 1980). O efeito ativacional, que indica alterações induzidas por esteróides sexuais, pode produzir modificações morfo-fisiológicas das sinapses, produção de metabolismo energético, síntese protéica, recuperação e degradação de neurotransmissor (GARCÍA-SEGURA, 1996). Por outro lado, pode também promover mudanças comportamentais, como na aprendizagem e memória assim desta maneira,

WARREN et al., (1995), ROOF, (1993), demonstraram a correlação entre o tamanho celular e a melhor performance de tarefas espaciais em machos . ROOF e HAVENS (1991), em experimento semelhante, já haviam mostrado a correlação, como aumento do volume dos *somata* das células granulares do giro denteado com um melhor desempenho de animais testados em labirintos e tratados com testosterona.

1.2 - Formação Hipocampal

A formação hipocampal de ratos inclui o subicuium, giro denteado, hipocampo e córtex entorrinal (MADEIRA e LIEBERMAN, 1995). Esta região está intrinsecamente relacionada com a memória espacial, processos cognitivos e emocionais. Foram observadas diferenças sexuais nesta região, tanto sobre aspectos comportamentais (MAREN, et al., 1994), quanto a aspectos anatômicos (MADEIRA, et al., 1991; BETTINI, 1992; ROOF, 1993; PARDUCZ e GARCÍA - SEGURA, 1993).

As principais alterações morfológicas induzidas pelos esteróides gonadais, no desenvolvimento da formação hipocampal de ratos, também ocorrem durante a primeira semana de vida pós-natal, (GODINA e BARASSA, 1964; COTMAN, et al., 1973; ZIMMER, 1977;). Todas as células

piramidais do hipocampo diferenciam-se após o nascimento e cerca de 85% das células da camada granulosa do giro denteado são formadas nas primeiras semanas de vida pós-natal (ANGEVINE, 1965; ALTMAN e DAS, 1965).

Enquanto algumas estruturas, que compõem a formação hipocámpal, estão bem descritas quanto às diferenças morfológicas, fisiológicas e comportamentais induzidas pela presença de esteróides gonadais no período considerado crítico, no córtex entorrinal, poucos são os trabalhos que evidenciam possíveis diferenças nesta região, proporcionando assim uma gama de possibilidades de se desenvolver trabalhos relacionados com esses aspectos.

1.3 - Córtex Entorrinal

O córtex entorrinal (CE) do cérebro de rato faz parte da formação hipocámpal, juntamente com o subiculum, giro denteado e o hipocampo. É uma estrutura alongada, em forma de “C” com seu longo eixo ou septotemporal orientado desde o núcleo septal (S) rostralmente até o córtex temporal (T), ventrocaudalmente. O eixo curto ou transversal (TRANS) orienta-se perpendicularmente ao eixo septo-temporal (fig.1) (AMARAL e WITTER, 1989)

Junto à região caudal do eixo transversal da formação hipocampal, encontra-se o subicium e o CE que formam a região perirrinal, (fig. 1). Separam-se apenas por um feixe de fibras claras e de forma relativamente compacta, denominado feixe angular (AMARAL e WITTER, 1989).

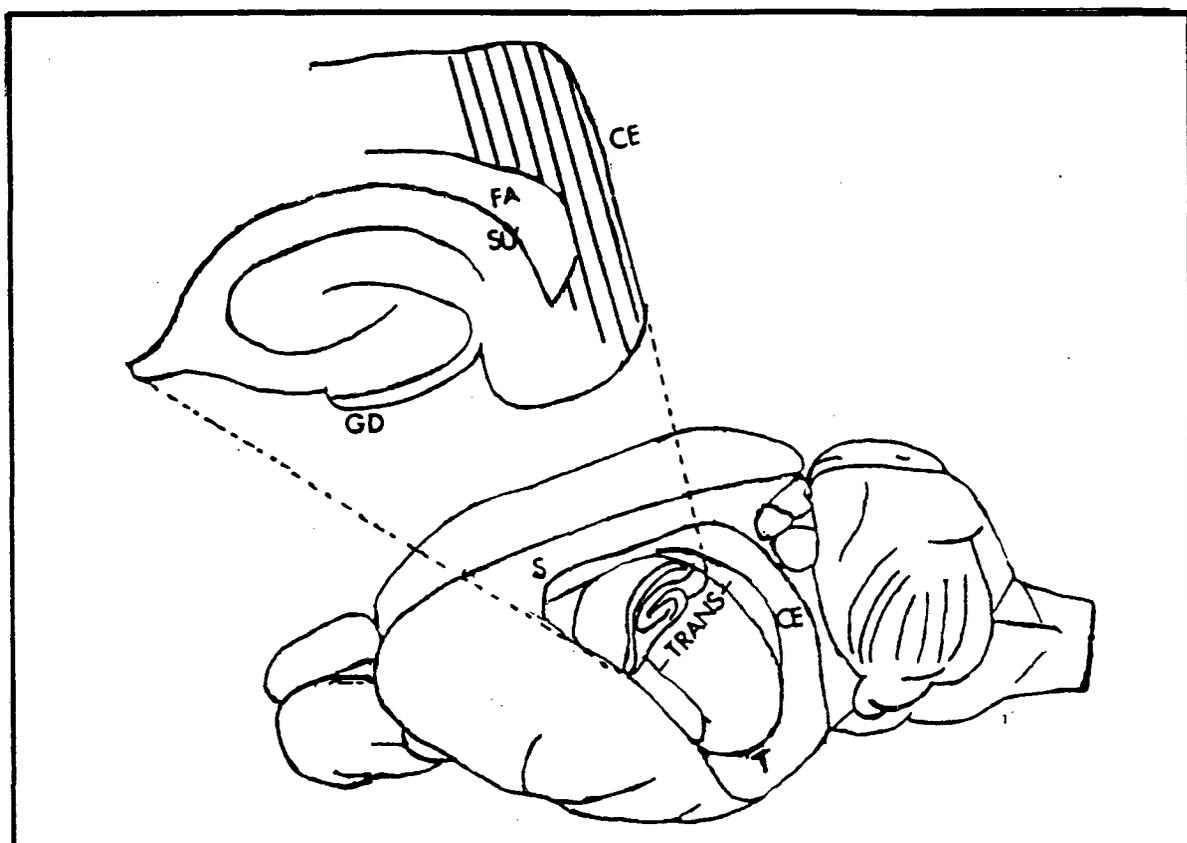


Fig. 1 - Desenho esquemático adaptado de Amaral e Witter (1989), modificado, indicando a posição da formação hipocampal no cérebro de rato, (S) núcleo septal, (T) córtex temporal, (TRANS) eixo transversal, (CE) córtex entorrinal, (GD) giro denteado, (SU) subicium, (FA) feixe angular.

O CE de humanos, (área 28 de Brodmann, BRODAL, 1984) e em outras espécies de primatas, insere-se na porção anterior do giro hipocampal (KASS,

1987) da região ventro-medial do lobo temporal, (FU DU, et al., 1995; INSAUSTI, et al., 1995; GOLDEMBERG, et al., 1995). Em roedores o CE apresenta duas regiões distintas: córtex entorrinal lateral (LEA) e córtex entorrinal medial (MEA) (KÖHLER, 1986; SWANSON, et al., 1987). Estas subdivisões podem variar numericamente, dependendo da espécie estudada (VAN HOESEN e PANYA, 1985; AMARAL, et al., 1987; INSAUSTI, et al., 1995; MADEIRA e LIEBERMAN, 1995).

De idêntica maneira que o neocórtex, o CE divide-se em 6 camadas neuronais distintas, identificadas por algarismos romanos (KÖHLER, 1986, 1988) (Fig.2). É importante salientar que as duas regiões do CE apresentam tipos celulares distintos. No LEA, a camada I, chamada de plexiforme, ou molecular, é rica em fibras, com poucas células nervosas possuindo axônios curtos e de tamanho mediano. A camada II, ou granular, apresenta células, com axônios curtos, dividindo-se ainda em duas subcamadas: a externa (IIa), com neurônios triangulares (de tamanho médio) e semi-lunares (pequenos), e a interna (IIb), mais espessa, formada por células fusiformes, ovóides (de tamanho médio) e até mesmo pode-se encontrar neurônios piramidais (RAMÓN Y CAJAL, 1995). A camada III ou de células piramidais (GERMROTH et al. 1989), consiste predominantemente de neurônios de tamanho médio. A camada IV, ou granular interna, é constituída por células de tamanho médio em forma de estrela. A camada V é também

denominada de piramidal interna. A camada VI, ou polimórfica, é constituída por células triangulares, ovóides e fusiformes com dendritos longos, podendo inclusive atingir a substância branca ou ascender até a camada I (RAMÓN Y CAJAL, 1995). KÖHLER (1986) encontrou, também, uma expansão maior na camada IV e VI do LEA quando comparadas com as mesmas camadas do MEA.

Na região medial (MEA) do C.E também as camadas celulares são diferentes e podem ser divididas em seis camadas (KÖHLER,1985,1988; RAMÓN Y CAJAL,1995): camada I plexiforme ou ainda de células polimórficas; camada II, granular externa ou de células estreladas (GERMROTH, et al.,1989). Em preparação de Nissl , estas células são grandes , apresentam abundantes corpúsculos de Nissl em seus citoplasmas e núcleo grande. Ainda na mesma camada, se pode encontrar células piramidais, poucos neurônios com axônios curtos e células triangulares. A camada III, ou piramidal, apresenta células de tamanho médio. A camada IV, granular interna ou estrelar, possui células agrupadas, ou células piramidais em pouca quantidade. Esta camada contém abundantes fibras direcionadas horizontalmente. A camada V ou ganglionar é constituída por células piramidais pequenas. A camada VI, ou polimórfica ou fusiforme, apresenta células poligonais, fusiformes ou triangulares, seus ramos podem terminar tanto dentro da substância branca como nas demais camadas (RAMÓN Y CAJAL, 1995).

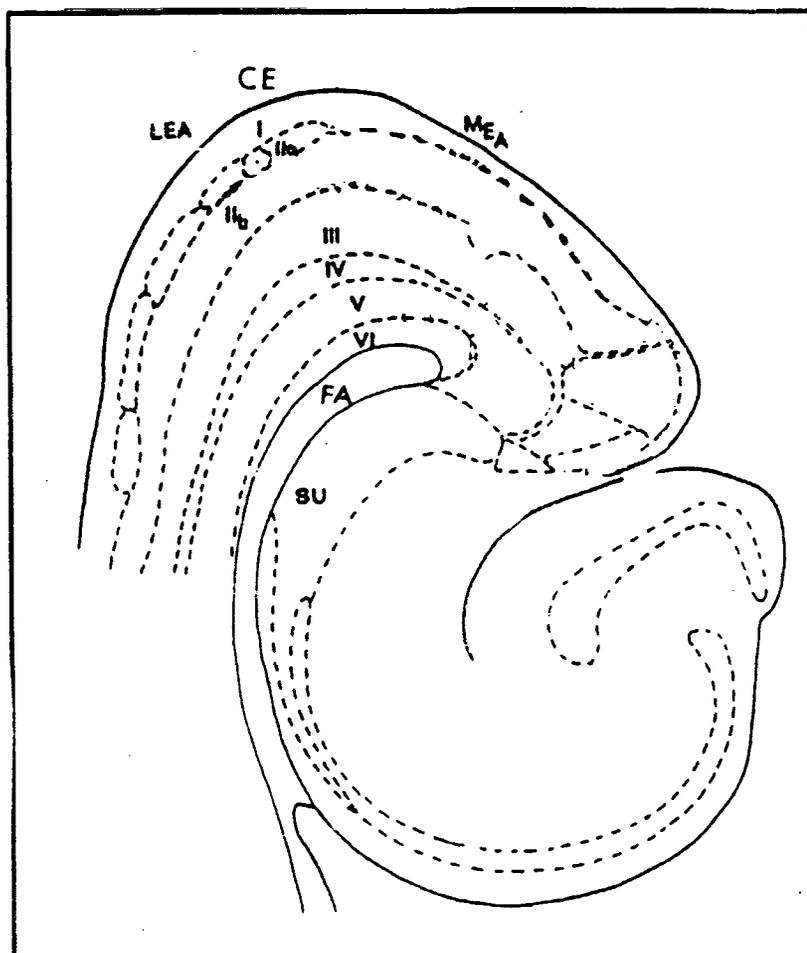


Fig.2 - Desenho esquemático modificado de KÖHLER (1986), mostrando seções horizontais da região hipocampal. Neste, evidenciam-se as seis camadas do (CE) córtex entorrinal, (LEA) área ou córtex entorrinal lateral, (MEA) área ou córtex entorrinal medial, (FA) feixe angular e o (SU) subiculum.

As camadas II e IV do MEA possuem projeções direcionadas, longitudinalmente, para a parte ventral do córtex entorrinal, de modo que a inervação torna-se sucessivamente mais densa em níveis ventrais. Cada camada do MEA inerva a camada imediatamente superficial a ela e todas as suprajacentes. As camadas II e III, que são as principais origens de

projeções do MEA (fig.3), estão densamente inervadas e retroalimentadas pelas camadas mais profundas. Já as camadas IV e VI possuem projeções divergentes, sendo que a maior parte dessas projeções alcança as camadas I e II ao longo dos seus eixos longitudinais (KÖHLER, 1986).

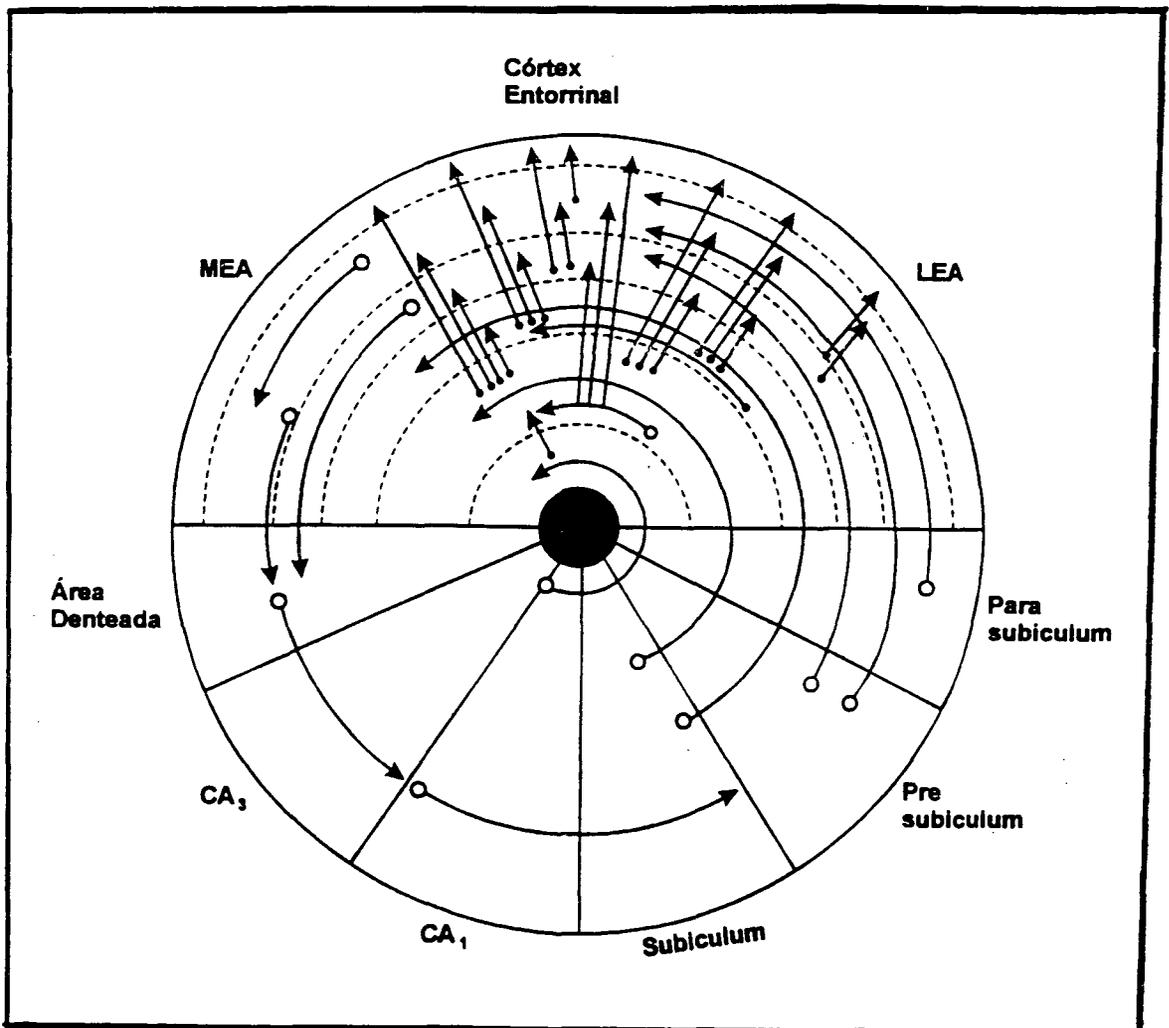


Fig.3 - Desenho modificado de KÖHLER, (1986-1988), mostrando a organização principal das ligações intrínsecas do córtex entorrinal. As camadas do córtex separadas por linhas pontilhadas; as setas indicam as projeções. (MEA) área entorrinal medial, (LEA) área entorrinal lateral, (CA₃) campo de Amonn 1, (CA₁) campo de Amonn 2.

As conexões intrínsecas da região lateral (LEA) do CE são resultado de projeções longitudinais tanto para direção ventral como dorsal, onde as projeções para a região ventral são mais proeminentes. Neurônios da camada IIa e IIb projetam seus axônios para essas mesmas áreas e ascendem para a camada I, passando pelo MEA, dirigindo-se para o parassubiculum e subiculum. As células da camada III são bem delimitadas nesta área, possuindo projeções maciças para a camada IIa, IIb e I. Da mesma forma os neurônios da camada IV, V e VI possuem densas projeções para as camadas adjacentes e mais superficiais. A camada V apresenta fracas projeções para a região medial, já as camadas IV e VI possuem projeções mais proeminentes em direção ao MEA.

Cada componente da formação hipocampal e outros locais do SNC mantém comunicações de forma diferente com a região medial do CE, ou seja: a camada II da região medial (MEA) recebe aferentes do parassubiculum; a camada III (do MEA), do pré-subiculum, a camada IV do subiculum, (KÖHLER, 1985, 1986) e as camadas V e VI de outras áreas do sistema nervoso central (tálamo, núcleo amigdalóide basolateral, (PARÉ, et al., 1995), córtex visual, núcleo da rafe, bulbo olfatório, núcleo septo medial e principalmente do hipocampo (BRODAL, 1984).

Da mesma maneira, a camada II do (LEA) recebe aferentes do parasubiculum e pré-subiculum, a camada III recebe projeções do pré-subiculum, as camadas IV e V recebem do subiculum e, finalmente, a última camada (VI), recebe projeções da formação hipocampal.

Estes aferentes atingem o LEA e o MEA nas diferentes camadas de cada uma das regiões (SWANSON, et al., 1987). Quanto à organização laminar, ocorrem inervações preferencialmente nas camadas mais profundas do córtex entorrinal (KÖHLER, 1985a; GOOD e MORRISON, 1995).

Os neurônios do córtex entorrinal projetam suas fibras principalmente sobre a formação hipocampal (BRODAL, 1984; KÖHLER, 1985b; SWANSON, et al., 1987; WITTER, et al. 1988), para o córtex estriado (FINCH, et al., 1995), área perirrinal e córtex piriforme (KÖHLER, 1988). As projeções dentro da formação hipocampal são feitas por duas vias. A primeira, através do fascículo perfurante, composta por neurônios da camada II com projeção para o giro denteado e CA3, (STEWART e SCOVILLE, 1976; AMARAL e WITTER, 1989; FU DU et al., 1995; MADEIRA e LIEBERMAM, 1995; EMPSON e HEINEMAN, 1995), (Fig. 4). O fascículo alvear, que é originado de neurônios da camada III com projeções para o subicium e CA1, corresponde à segunda via. (MADEIRA e LIEBERMAM, 1995), (Fig.4).

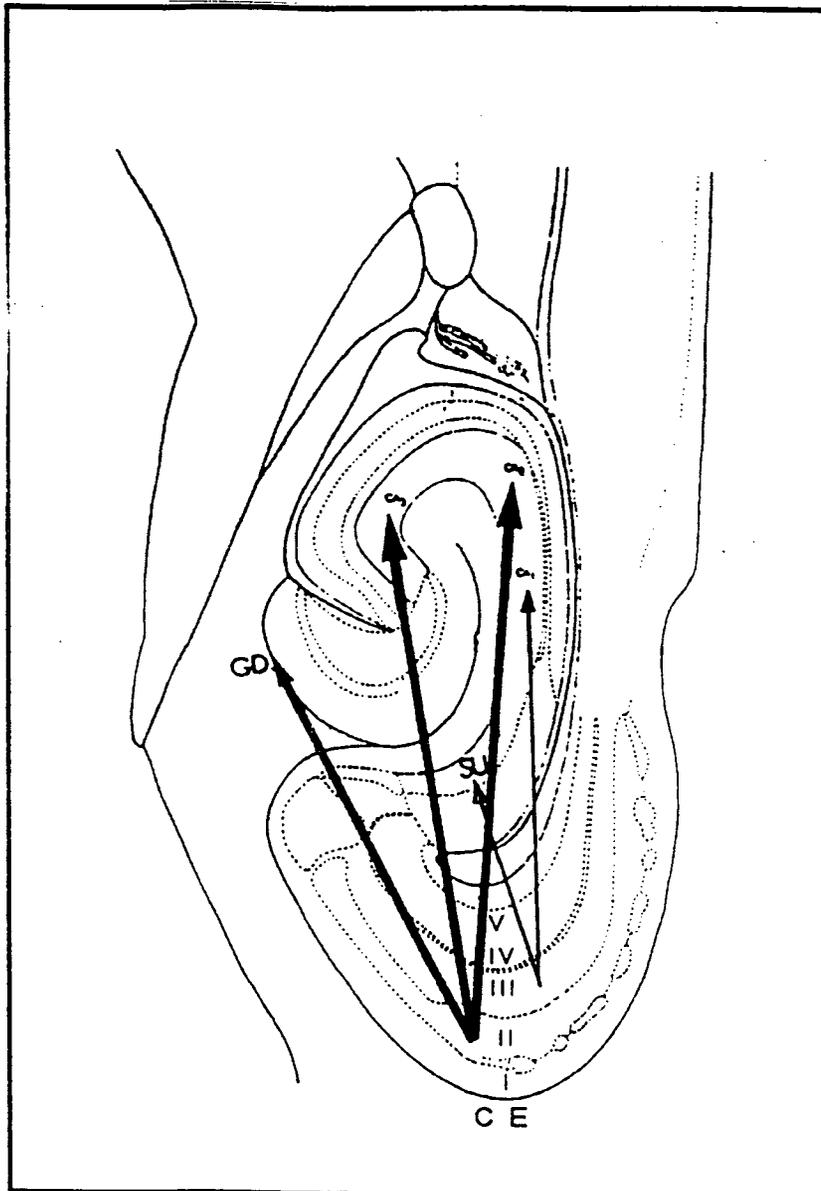


Fig.4 - Desenho esquemático adaptado de SWANSON, et al., 1987, onde mostra as projeções do córtex entorrinal em direção à formação hipocampal. Os algarismos romanos mostram as camadas do córtex entorrinal; as setas grossas indicam o fascículo perforante (FP); setas delgadas apontam o fascículo alvear (FAL); (GD) giro denteado; (SU) subiculum; (CA1, CA2, CA3) os campos de Ammon, 1,2,3.

As camadas II e III da região medial são as principais origens de projeções do córtex entorrinal para a formação hipocampal e estão maciçamente inervadas por camadas mais profundas. (KÖHLER, 1985b). O hipocampo e o subicuium inervam as camadas IV e VI do córtex entorrinal de ratos. Anatomicamente, esses elementos juntos constituem um circuito próprio desta região, ou seja o circuito entorrino-hipocampal. (VNEK, GLEASON e KROMER, 1995).(Fig. 5)

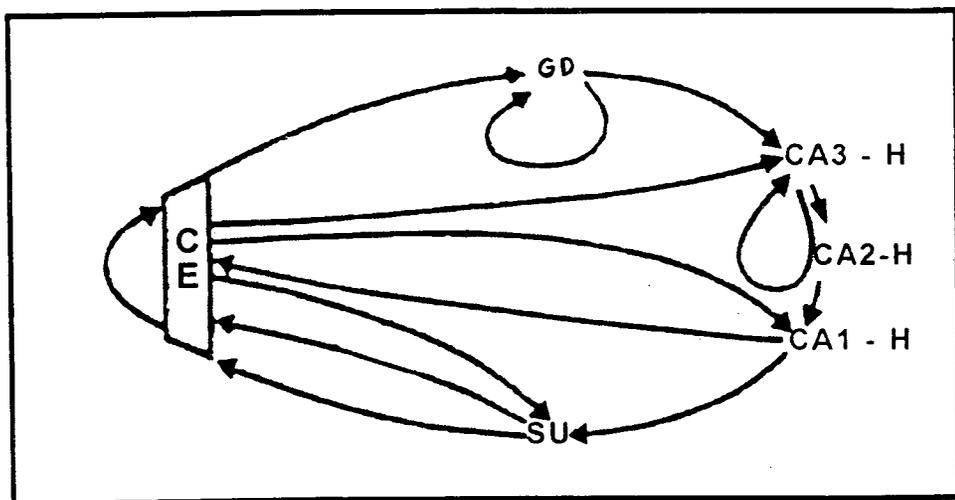


Fig.5 - Diagrama resumido das conexões intrínsecas da formação hipocampal, adaptado de AMARAL e WITTER (1989). (CE), córtex entorrinal;(GD), giro denteado; (CA3-H, CA2-H, CA4-H), cornos de Amonn 3,2,4 do hipocampo; SU, subicuium.

O córtex entorrinal possui ligações com várias áreas do cérebro e a maioria de seus aferentes, dirige-se para o hipocampo como uma estação retransmissora, um relé (SCHWARCZ e TAMMINGA, 1995; AMARAL e WITTER, 1989). Constitui-se ainda uma área importante para o estabelecimento dos processos fisiológicos cognitivos, como memória e

aprendizado, uma vez que esta relacionado diretamente com a formação hipocampal (Mc EWEN, 1979).

Para que se forme o padrão citoarquitetônico do CE vários fatores agem durante sua corticogênese. Embora acredite-se que uma possível ação dos esteróides gonadais no período crítico possa atuar sobre sua citoarquitetura, não se encontraram relatos na literatura consultada, que justifique tal hipótese.

Assim, o presente trabalho procurou analisar mudanças morfológicas no volume dos corpos celulares dos neurônios do CE, nas camadas II e IV nas regiões lateral (LEA) e medial (MEA), produzidas pela castração em ratos machos no 5º dia de vida pós-natal quando os animais atingiram a vida adulta.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizados 17 ratos com 5 dias de vida pós-natal, obtidos junto ao biotério central da Universidade do Vale do Itajaí e divididos em dois grupos: castrados (C, N=8), submetidos à castração cirúrgica e controle (NC, N=9) submetidos ao mesmo trauma cirúrgico, porém sem castração. Procedeu-se o seu quando estes atingiram 90 dias de vida.

2.1- Procedimentos Cirúrgicos: Castração

Os animais dos 2 grupos foram anestesiados com éter sulfúrico por inalação, e fechados em recipiente de vidro. Em seguida, foram dispostos sob uma lupa com poder de resolução 10X, fixados a uma plataforma cirúrgica com fita adesiva, procedendo-se duas incisões paralelas à cicatriz umbilical na região abdominal inferior (fig. 6).

Nos animais do grupo castrado, os testículos foram removidos e a ferida suturada. O ato cirúrgico foi precedido de incisão nos tecidos, até a cavidade abdominal. Após a visualização do testículo, este foi amarrado com o fio de sutura e feito o corte abaixo do nó para evitar hemorragia (fig.6). Posteriormente foi suturada a incisão cirúrgica, respeitando os planos anatômicos.

Nos animais do grupo controle foram realizados todos os procedimentos cirúrgicos, menos a remoção dos testículos. Após os procedimentos cirúrgicos todos os animais foram imediatamente devolvidos às respectivas ninhadas, permanecendo com suas mães até atingirem vinte e um dias de idade. Posteriormente, os animais foram separados de suas mães, colocados em caixas contendo no máximo 2 animais e receberam alimentação “ad libitum”.

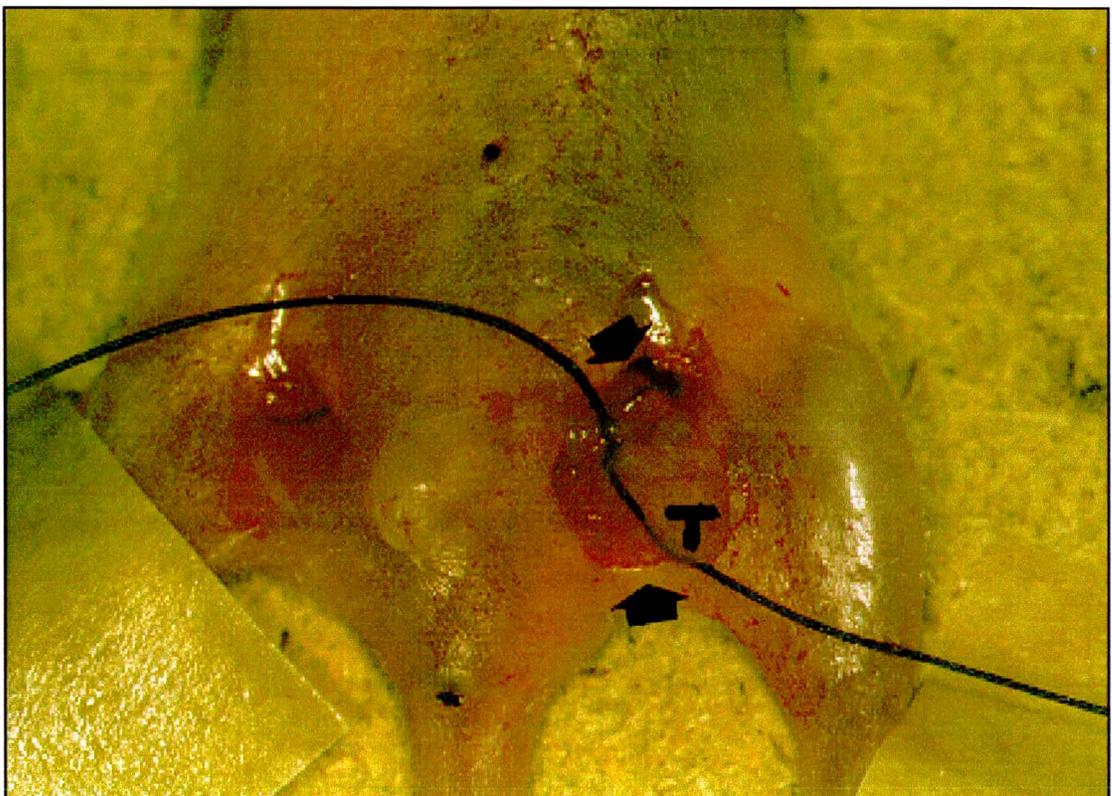


Fig.6 - Castração dos animais , onde as setas indicam o local da incisão e tração do testículo (T) esquerdo de um rato com 5 dias de vida. Para a tração emprega-se um fio de sutura, posteriormente secciona-se abaixo do nó cirúrgico para a retirada do testículo.

2.2 - Perfusão

Quando atingiram 90 dias de vida (idade adulta), todos os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (33mg/Kg. i.p.), fixados em decúbito dorsal em uma mesa cirúrgica adequada, realizando-se uma incisão cirúrgica longitudinalmente, desde a região peri-umbilical até a região cervical inferior. Posteriormente, injetou-se no ventrículo cardíaco esquerdo, 0,1 ml de Heparina e imediatamente após, no mesmo local, aplicou-se uma solução salina tamponada (PBS 0,1M, pH 7,4) durante 5 minutos (300 ml para cada animal), seguida por uma solução de formaldeído à 10% diluído em PBS por vinte minutos (150 ml para cada animal).

2.3 - Obtenção dos cortes

Após a perfusão, as cabeças dos animais foram removidas e os ossos do crânio cuidadosamente retirados com auxílio de um alveolótomo, preservando-se as estruturas corticais. As cabeças com os cérebros expostos e identificados, foram mantidas na mesma solução fixadora por mais de 6 horas.

Posteriormente, os cérebros foram cortados com auxílio de uma navalha descartável para microtomia, separando-se os dois hemisférios cerebrais

(esquerdo - direito) no plano sagital mediano. O hemisfério esquerdo é preservado intacto e o hemisfério direito seccionado no plano horizontal, exatamente ao meio do flóculo (Bregma 7,3mm, lateral 12.6mm; plano estereotáxico de PAXINOS e WATSON, 1982), dividindo assim em duas porções (DS-direito superior e DI-direito inferior).

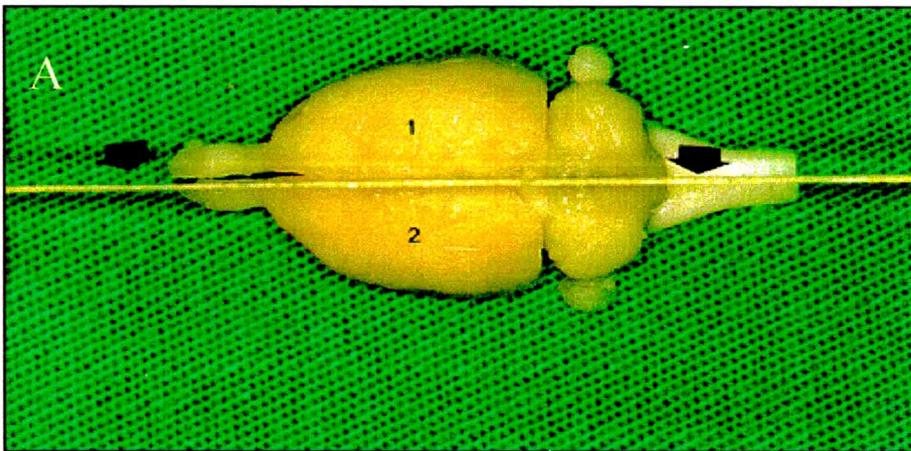


Fig. 7 - A-) Encéfalo de rato adulto, seccionado com o auxílio de uma lâmina descartável para microtomia (seta), seccionaram-se os dois hemisférios cerebrais, separando-o em direito (1) e esquerdo (2); B-) Momento da separação do hemisfério direito no plano horizontal em duas porções superior (S) e inferior (I), o número 1 indica o flóculo e o 2 o cerebelo; C-) Peças anatómicas obtidas após as seções. Na parte superior da fotografia, pode-se observar o hemisfério esquerdo, (1) na parte intermediária, percebe-se a porção superior do hemisfério direito, (2) na parte inferior da fotografia, observa-se a porção inferior do hemisfério direito (3).

2.4 - Técnica Histológica

As peças fixadas foram submetidas à técnica histológica de rotina para inclusão em parafina. Após a lavagem (com água corrente por 2 horas), as peças foram desidratadas em álcool de concentração crescente durante 14 horas, diafanizadas com banhos de xilol e emblocadas em parafina líquida. Deste material foram obtidos cortes semi-seriados (100 em 100 μ m) com 10 μ m de espessura e corados pelo método de Nissl com cresil violeta (MICHALANY, 1980).

2.5 - Determinação do nível de corte e codificação das lâminas:

Cada lâmina histológica assim obtida contém 2 cortes histológicos dos hemisférios direitos de cada um dos animais. Optou-se por inutilizar todas as que estavam tecnicamente inadequadas, assim como aquelas que não continham o córtex entorrinal. Após esta primeira triagem, determinou-se o nível de corte horizontal do cérebro, segundo orientação do atlas estereotático do rato de Paxinos e Watson (1982). Decidiu-se examinar três níveis de corte para a mensuração dos *somata* :ventral (1,9 interaural), intermédio (3,9 interaural) e dorsal (5,4 interaural). Todas as lâminas foram observadas e seus níveis anotados, identificados com números e letras, a fim de impedir que o

observador identificasse a qual grupo (C ou Nc) a lâmina pertencia. Nesta identificação foram utilizados os seguintes critérios:

- definição da seqüência de cortes obtidos em cada um dos blocos do hemisfério direito;

- definição do grupo (C ou N) ao qual o animal em análise pertencia, sendo que este grupo não foi identificado pelo observador. Dados foram anotados em uma planilha separada, sem que o observador tivesse conhecimento prévio dos códigos.

2.6 - Obtenção dos resultados

As lâminas obtidas, selecionadas e niveladas foram submetidas à análise morfológica, empregando-se microscopia óptica em campo claro. Nesta análise foram coletados dados do volume dos corpos dos neurônios das camadas corticais II e IV das regiões LEA e MEA do córtex entorrinal.

As camadas acima foram escolhidas para contemplar camadas relacionadas com as aferências ao córtex entorrinal (camada IV) e relacionadas com as eferências do córtex entorrinal (camada II).

Para a determinação dos volumes do soma dos neurônios, utilizou-se uma ocular de medição com o tambor rotativo modelo K8X ("Carl Zeiss"),

adaptada ao microscópio de luz com objetiva de 100X. Após a projeção do campo da ocular sobre a lâmina na área em estudo, procurou-se tomar o cuidado em medir somente os neurônios que apresentavam núcleos com forma elipsóide com núcleo e nucléolo evidentes, adequadamente corados com grumos de Nissl evidentes. Os demais foram desprezados, evitando-se falsos resultados. Desta forma foram mensurados dois diâmetros perpendiculares ao núcleo. Após medir os dois diâmetros, calculou-se o volume, segundo a fórmula utilizada por SALVATORE, (1972): $V = (A \times B) / 1.91$, onde: (A) menor diâmetro, (B) maior diâmetro e (1.91) constante (Fig. 9). Assim, mediram-se 8 corpos celulares de cada camada (II-IV) de cada região do córtex entorrinal (LEA e MEA) para cada um dos níveis escolhidos, resultando um total de 1.344 células contadas, 32 *somata* por lâmina histológica e 96 *somata* por animal, conforme tabela 1. Obedecendo os critérios previamente determinados e encontradas falhas de técnicas em algumas lâminas histológicas, nem todos os animais puderam contribuir com os três níveis analisados. Os números de pericários examinados em cada lâmina histológica podem ser observados na tabela 1 e os locais onde foram efetuados as mensurações podem ser observados na figura 8.

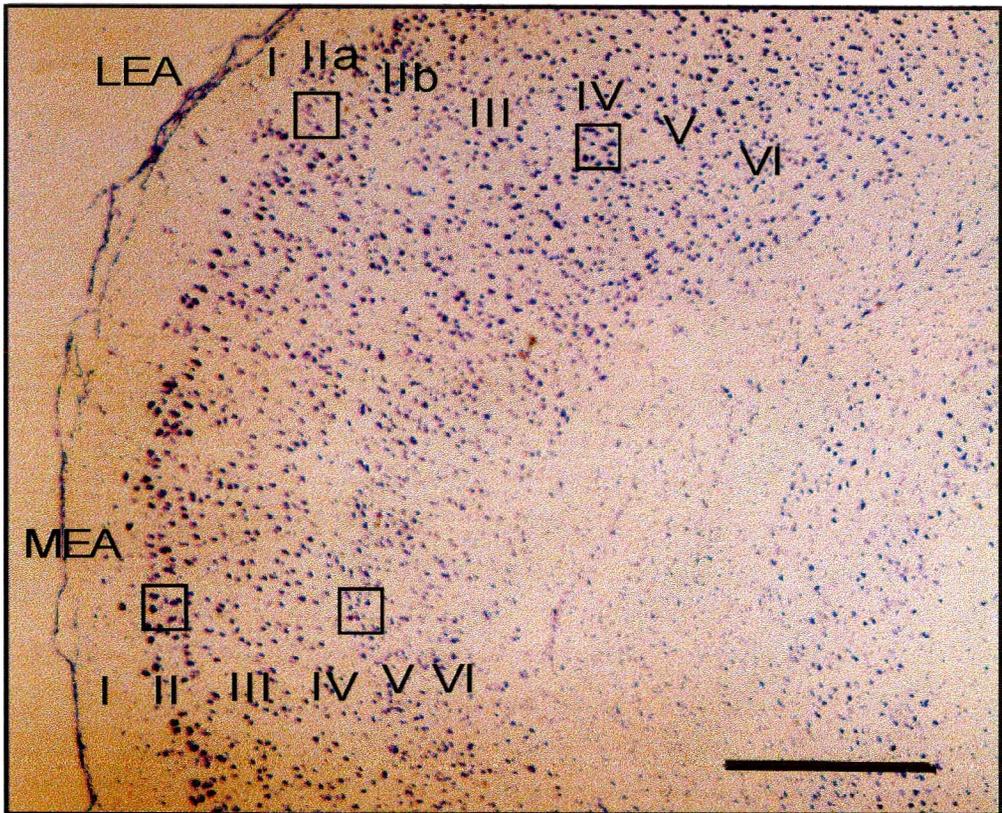


Fig. 8 Mostrando os locais onde foram efetuados as mensurações dos volumes dos soma dos neurônios do córtex entorrinal. Algarismos romanos indicam as camada celulares,(LEA) córtex entorrinal lateral, (MEA) córtex entorrinal medial. Barra= 50 μ m, coloração Nissl.

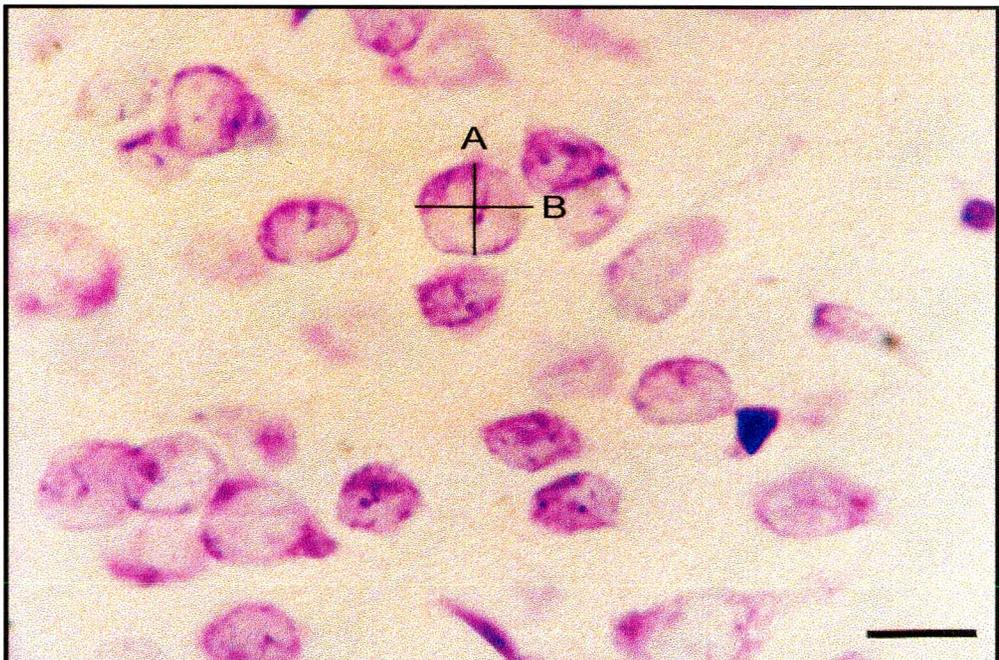


Figura- 9 Fotomicrografia de neurônios da camada II da região medial do córtex entorrinal de rato, mostrando diâmetro (A) menor e o diâmetro (B) maior. Aumento 100 X. Barra= 15 μ m, coloração Nissl.

Tabela 1. Número de células observadas em cada camada do CE, nos três níveis estudados.

Castrados			Não castrados	
CAMADAS	No. de CÉLULAS	NÍVEIS	CAMADA	Nº de CÉLULAS
*II MEA	64	VENTRAL	II MEA	56
**IV MEA	64	VENTRAL	IV MEA	56
II LEA	64	VENTRAL	II LEA	56
IV LEA	64	VENTRAL	IV LEA	56
II MEA	56	INTERMÉDIO	II MEA	56
IV MEA	56	INTERMÉDIO	IV MEA	56
II LEA	56	INTERMÉDIO	II LEA	56
IV LEA	56	INTERMÉDIO	IV LEA	56
II MEA	48	DORSAL	II MEA	56
IV LEA	48	DORSAL	IV MEA	56
II MEA	48	DORSAL	II LEA	56
IV MEA	48	DORSAL	IV LEA	56
TOTAL	672			672

Tabela 1. (MEA) córtex entorrinal medial, (LEA) córtex entorrinal lateral. *II (camada II),

** IV(camada IV)

2.7 - Análise dos resultados

Após a obtenção dos dados volumétricos dos corpos celulares dos dois grupos, os códigos foram abertos e submetidos a tratamento estatístico, por

análise de variância de duas vias (ANOVA) tendo como fatores os grupos (castrado e não castrado), os níveis (ventral, intermédio e dorsal) e as camadas (II e IV das regiões lateral e medial). Os dados foram tratados por intermédio do teste de Duncan, onde o nível de significância adotado foi de $p < 0.05$.

3. RESULTADOS

Ao efetuar as mensurações das estruturas em estudo, verifica-se que em algumas lâminas histológicas, muitas células apresentavam diferenças de tamanho entre si, de acordo com as ilustrações da figura 12. Após a abertura dos códigos e a análise estatística das diferenças entre as médias, os resultados das diferenças de tamanho dos *somata* dos neurônios do córtex entorrinal dos ratos estudados, encontram-se nos gráficos e tabelas abaixo, representando a comparação das médias pelo teste de Duncan ($p < 0,05$).

Analisando os dados obtidos com os animais castrados e controle nos três níveis estudados, ou seja: ventral, intermédio e dorsal, observa-se que as diferenças dos valores do grupo do grupo castrado nos três níveis são estatisticamente significantes (Fig. 11).

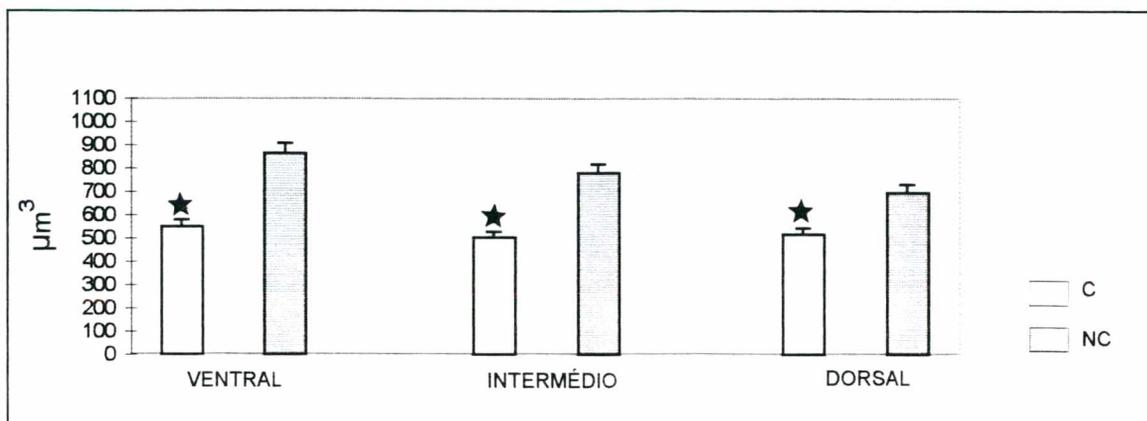


Fig. 11 Diferenças de volume dos *somata* dos neurônios das camadas II e IV, do córtex entorrinal nos três níveis e nas regiões analisadas. Valores médios ($X \pm E.P.M.$ em μm^3) (★)-diferenças em relação aos não castrados. $p < 0,05$, C= castrados, NC= não castrados.

Comparando os valores encontrados nas camadas II e IV nos níveis (dorsal, intermediário e ventral) das regiões medial (MEA) e lateral (LEA) do córtex entorrinal, observa-se que o grupo castrado apresentou o volume de seus *somata* com valores médios ($522,9 \pm 13,9 \mu\text{m}^3$) diminuídos, quando comparados com os valores médios ($786,7 \pm 20,8 \mu\text{m}^3$) dos *somata* dos neurônios do grupo controle e sendo diferenças também estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Analisando-se os valores encontrados nas camadas II e IV em cada nível (dorsal, intermediário e ventral) das regiões MEA e LEA do córtex entorrinal, observa-se que o grupo castrado, apresentou seus *somata* com valores volumétricos diminuídos quando comparados com o controle, sendo estes estatisticamente diferentes, (tabelas 2,3 e 4).

Tabela 2. Valores volumétricos médios ($X \pm E.P.M.$ em μm^3), dos volumes dos *somata* dos neurônios do córtex entorrinal no nível ventral das regiões lateral (LEA) e medial (MEA).

NÍVEL	VENTRAL			
REGIÃO	MEA		LEA	
CAMADA	II	IV	II	IV
CASTRADOS	516,5 \pm 25,2*	570,2 \pm 32,3 *	510,5 \pm 25,2 *	611,5 \pm 31,7*
NÃO CASTRADOS	811,4 \pm 25,2	973,5 \pm 46,7#	795,0 \pm 53,1	869,8 \pm 39,9

(*)-diferença em relação aos não castrados; (#) diferença em relação as camadas II do MEA, II e IV do LEA. Nível de significância, $p < 0,05$.

Tabela 3. Valores volumétricos médios ($x \pm E.P.M.$ em μm^3), dos volumes dos *somata* dos neurônios do córtex entorrinal no nível intermédio das regiões lateral (LEA) e medial (MEA).

NÍVEL	INTERMÉDIO			
REGIÃO	MEA		LEA	
CAMADA	II	IV	II	IV
CASTRADOS	481,7 \pm 21,6*	510,4 \pm 27,6 *	511,3 \pm 29,3 *	502,6 \pm 28,2*
NÃO CASTRADOS	888,6 \pm 37,8	825,2 \pm 30,3**	688,7 \pm 37,2 #	792,0 \pm 36,1

(*)-diferenças em relação a N.C.;(**)-diferenças em relação a camada II do MEA e a IV do LEA; (#)-diferenças em relação a camada II do MEA e a IV do LEA. Nível de significância, $p < 0,05$

No nível ventral, nas regiões MEA e LEA nas camadas II e IV, todos os valores dos animais castrados são significativamente diferente em relação aos valores dos animais não castrados (Tabela 2). Os *somata* dos neurônios da camada IV da região medial do grupo controle é significativamente maior quando comparados com os demais de seu grupo.

Na tabela 3 são apresentados os volumes dos *somata* dos neurônios das camadas II e IV do nível intermédio do córtex entorrinal de ratos na região medial (MEA) e lateral (LEA) e observa-se que estes valores nos animais castrados não diferem e são significativamente ($P < 0,05$) diferentes quando comparados com os valores dos *somata* dos animais controles. Os valores volumétricos médios dos *somata* dos neurônios dos animais intactos na camada II do MEA e da camada IV do LEA não diferem entre si e são significativamente diferentes dos demais.

Tabela 4. Valores volumétricos médios ($\bar{X} \pm E.P.M.$ em μm^3), dos volumes dos *somata* dos neurônios do córtex entorrinal, nível dorsal das regiões lateral (LEA) e medial (MEA).

NÍVEL	DORSAL					
	REGIÃO			LEA		
	MEA					IV
CAMADA	II	IV	II	IV		
CASTRADOS	645,8 $\pm 31,0^*$	510,0 $\pm 26,1^*$ •	446,6 $\pm 22,4^*$ •	466,8 $\pm 22,4^*$ •		
NÃO CASTRADOS	828,4 $\pm 55,9$	758,4 $\pm 49,2$	541,0 $\pm 33,7$	652,1 $\pm 43,1$		

(*)- diferenças em relação N.C.; (•)- diferenças em relação a camada II do MEA. Os valores médios do grupo não castrados são significativamente diferentes entre si. Nível de significância $p < 0,05$.

Na tabela 4 observa-se que os valores dos soma dos neurônios das camadas II e IV do córtex entorrinal de ratos castrados, nas regiões lateral e medial, do nível dorsal, são significativamente menores quando comparados com neurônios em sítios similares, dos animais não castrados. Pode-se observar

também que as camadas II e IV do MEA dos animais castrados neste nível são significativamente diferentes. Entretanto nas camadas II e IV do LEA estes valores são similares.

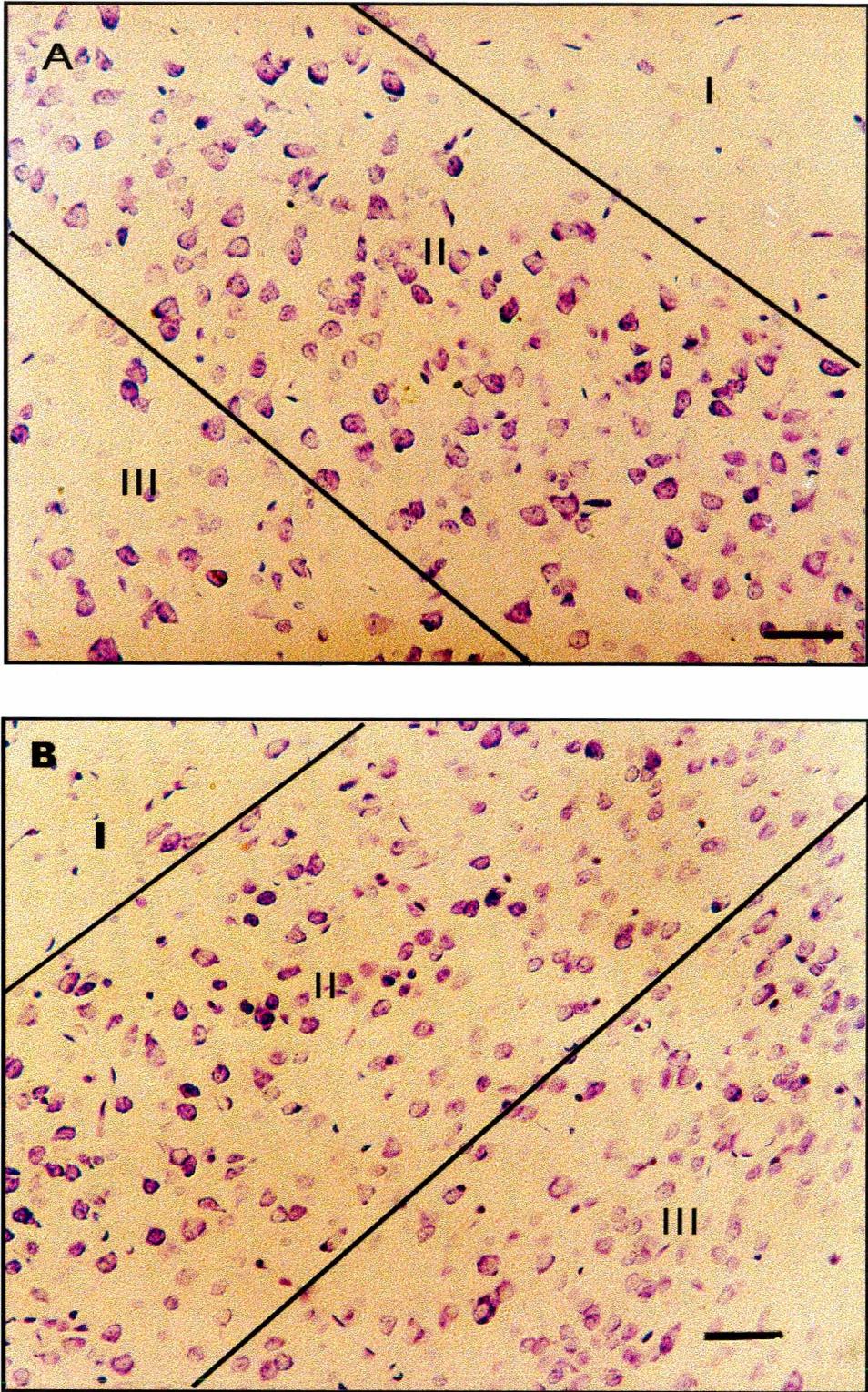


Fig. 12. Neurônios do córtex entorrinal de rato macho adulto, (MEA) região medial, no nível ventral, As linhas indicam a delimitação das camadas. Os números em algarismo romano identificam as camadas I e II; (A) não castrado, (B) castrado, bar-60µ, coloração Nissl.

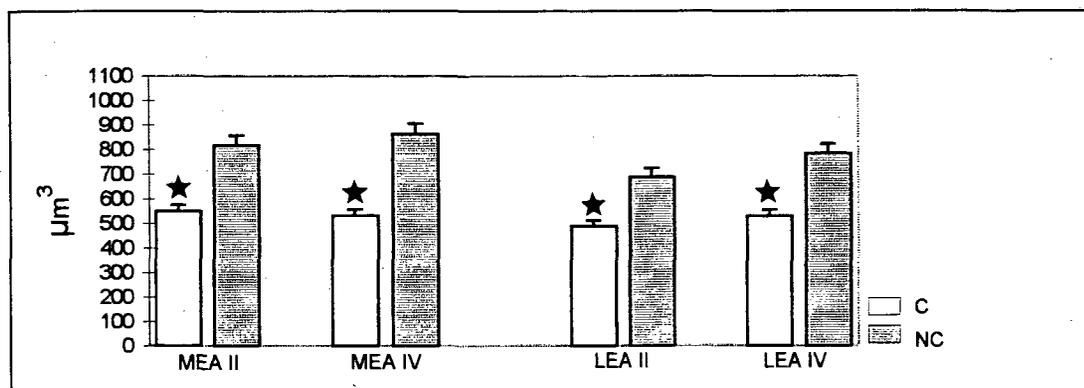


Fig. 13 Diferenças de volume dos *somata* dos neurônios das camadas II e IV do córtex entorrinal, regiões (MEA) medial e (LEA) lateral. Valores médios ($X \pm E.P.M.$ em μm^3). (*) diferenças em relação aos não castrados. Nível de significância, $p < 0,05$. C= castrados, NC= não castrados.

Ao se observar os valores médios dos *somata* dos neurônios da camada II e IV do MEA do córtex entorrinal de ratos castrados expressados na figura 13, pode-se perceber que os mesmos são significativamente ($P < 0,05$) menores (26,7% e 33,2% respectivamente) do que os valores médios dos *somata* dos animais não castrados. Os *somata* dos neurônios da camada II e IV na região LEA também são significativamente menores (20,1% e 25,4% respectivamente).

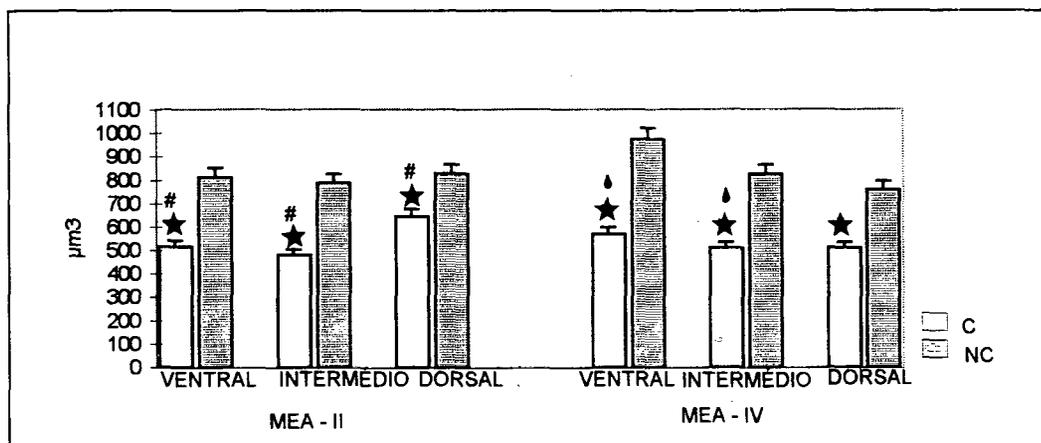


Fig.14. Diferenças de volume dos pericários das camadas II e IV do córtex entorrinal de ratos machos, região (MEA) medial dos três níveis estudados. Valores médios ($X \pm E.P.M.$ em μm^3). (★)-diferenças em relação aos não castrados. # ($p < 0,05$) em relação ao nível dorsal na camada II dos castrados, ♠ ($p < 0,05$) em relação ao nível ventral na camada IV, C= castrados, NC= não castrados.

Comparando, nos animais castrados, o volume dos pericários da camada II em todo os níveis estudados na região medial (MEA), pode-se observar que nos níveis ventral e intermédio são de tamanhos idênticos, porém estes são significativamente ($p < 0,05$) diferentes quando comparados com os do nível dorsal (fig.14.).

Os valores das mesmas estruturas, porém na camada IV, mostram que a diminuição do volume dos *somata*, nos níveis intermédio e dorsal são semelhantes entre si, e são significativamente ($P < 0,05$) menores que os do nível ventral. No MEA, a camada II, do nível ventral, apresentou um índice de 40,3% menor quando comparada com a camada similar dos animais castrados. A

camada II no nível dorsal foi a que apresentou menor índice no MEA(18,2%). De forma geral, os pericários da região mediai apresentaram-se 29,4% menores quanto ao seu volume, quando comparados com pericários de região semelhante do grupo não castrado.

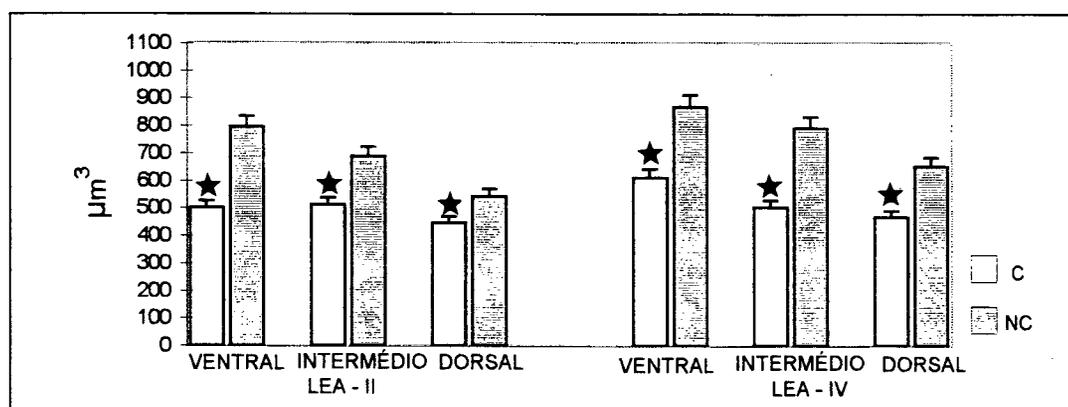


Fig. 15. Diferenças de volume dos pericários das camadas II e IV do córtex entorrinal de ratos machos na região lateral (LEA) dos três níveis estudados. Valores médios ($\bar{X} \pm E.P.M.$ em μm^3). (★)-diferenças em relação aos não castrados. ($p < 0,05$).

Na região lateral (LEA) do córtex entorrinal, os animais castrados mostram valores volumétricos diminuídos, dos neurônios localizados na camada II. Nos níveis estudados (ventral, intermédio e dorsal) os *somata* dos neurônios dos animais castrados apresentam, em seus volumes, valores percentuais (29,4%, 17,7% e 9,5%) menores que os do grupo controle. Os níveis ventral e intermédio são semelhantes entre si, e com pericários significativamente maiores ($p < 0,05$) que os do nível dorsal. Porém na camada IV, os neurônios dos animais castrados no nível ventral têm volume dos seus *somata*

significativamente maiores ($p < 0,05$) do que os dos níveis intermédio e dorsal. (fig. 15).

Os animais castrados que têm seus pericários localizados na camada IV da região lateral, tanto nos níveis ventral, intermédio e dorsal, apresentam seus volumes com valores percentuais menores (25,8 %, 28,9 % e 18,5 %) do que os dos animais normais. De forma geral, no grupo experimental, toda a região lateral do CE apresenta seus *somata* dos neurônios com valores percentuais menores (21,6%) que os dos animais do grupo controle (fig. 15).

No grupo controle (não castrado) o volume dos corpos celulares localizados nas camadas II e IV da região lateral são significativamente diferentes em todos os níveis (ventral, intermédio e dorsal), sendo que os do nível dorsal são menores e os do ventral, os maiores (fig. 15).

4. DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho demonstram que ocorre uma redução do volume dos corpos celulares dos neurônios do córtex entorrinal nas camadas II e IV, no grupo dos animais machos castrados no 5º dia de vida pós-natal, quando estes atingem a idade adulta (± 90 dias). Verificou-se que a média entre os *somata* dos animais castrados ($522,9 \pm 13,9 \mu\text{m}^3$) é menor quando comparada com a média *dos somata* dos neurônios dos animais não castrados ($786,7 \pm 20,8 \mu\text{m}^3$). Estes resultados são significativamente diferentes, indicando a existência do dimorfismo sexual no CE.

Apesar da existência de vários estudos demonstrando diferenças sexuais no SNC, tais como: volume celular dos núcleos da área pré-óptica maiores nos animais machos de várias espécies de mamíferos, inclusive no homem (GORSKI et al., 1978; MADEIRA e LIEBERMAN, 1995), tamanho e número celulares e árvore dendrítica maiores nos animais machos no córtex somatosensorial, córtex pré-frontal e complexo hipocampo-giro denteado (YANAI, 1979; KOLB e STUWART, 1991; MADEIRA e LIEBERMAN, 1995; DIAMOND, 1978), a literatura é lacunar em relação às diferenças sexuais no córtex entorrinal. Desta maneira, o presente estudo constituiu-se, provavelmente, no primeiro dado relatando que esta região sofre modificações estruturais, possivelmente induzidas pela ausência da testosterona ou de seus metabólitos, no período crítico.

Encontrou-se na literatura indicativos de que a ausência da testosterona, ou de seus metabólitos como o estradiol, em fases precoces da vida do animal, pode provocar a diminuição do volume dos *somata* dos neurônios, agindo sobre os fatores tróficos neuronais, como por exemplo, o fator de crescimento neuronal, que é uma proteína e que provoca a hipertrofia de alguns neurônios. (DAVIS et al., 1996; RICH et al., 1989; GIBBS, 1993; ARAKI et al., 1991). Embora os resultados deste estudo não definam a via de interferência no mecanismo da diminuição do volume somático, promovida pela castração, os relatos acima citados sugerem que, algumas dessas vias tenham sido alteradas após a castração. Entretanto, longe de se chegar a alguma definição quanto a relação entre modificação estrutural e fisiológica, há que se avançar nas investigações no sentido de solucionar as hipóteses levantadas.

Os resultados demonstram, que a diminuição do volume dos *somata*, após a castração, atinge com maior intensidade os níveis ventrais, independente das camadas (Figuras 14 e 15). Relatos de KÖHLER (1986; 1988), relacionados com a arquitetura das conexões intrínsecas, indicam que as camadas II e IV têm projeções preferencialmente direcionadas para a parte ventral deste córtex. Estes achados podem estabelecer uma relação entre o efeito da castração com os possíveis significados fisiológicos das projeções das camadas II e IV.

Por ocasião da castração no período crítico, induziu-se a diminuição das taxas séricas de testosterona do animal, comprometendo assim a oferta de testosterona ao cérebro. Esta circunstância pode provocar modificações morfo-fisiológicas e comportamentais e inclusive alterar o desenvolvimento neuronal do animal (GOY e McEWEN, 1980). Existem evidências de que a testosterona por meio do seu derivado, o estradiol, tem papel importante na síntese de tubulina, uma proteína estrutural dos microtúbulos (NAVE et al., 1996). Os microtúbulos participam significativamente no transporte de vesículas, que contêm produtos sintetizados pelas organelas somáticas e são carregadas até os prolongamentos neuronais. Os microtúbulos, ainda, são os componentes principais do citoesqueleto e indispensáveis para o crescimento dos prolongamentos neuronais (GARCIA-SEGURA, 1996). Com base nestas informações, pode-se inferir que a castração induz modificações estruturais nos neurônios, podendo esse fenômeno estar relacionado com modificações na formação dos microtúbulos e/ou modificações na plasticidade neuronal.

Também foi possível demonstrar que a castração diminui mais intensamente o tamanho dos corpos celulares dos neurônios situados na região mediai (MEA), do que os *somata* da região lateral (LEA) (Figuras 14 e 15). Sabe-se que a maioria das conexões intrínsecas do LEA terminam no MEA e, principalmente, nas camadas IV e VI. Ademais, KÖHLER (1988) descreveu que é principalmente da região mediai que o CE projeta suas fibras para a área denteada, ao hipocampo e para o complexo subicular. Isto pode ser um indicativo

que, mesmo de forma indireta, a diminuição dos corpos celulares dos neurônios localizados na região medial pode interferir na conectividade desta região com as demais estruturas que compõem a formação hipocampal.

Alguns comportamentos são induzidos direta e indiretamente pela formação hipocampal. Homens e mulheres são diferentes, não somente nos aspectos físicos e reprodutivos, mas também na forma com que resolvem seus problemas intelectuais. Estas diferenças parecem se relacionar com padrões de habilidades e não com o nível global da inteligência. Em média, os homens realizam melhor que as mulheres certas tarefas espaciais, têm vantagens em testes que necessitam imaginar um objeto em rotação ou quanto a manipulação deste objeto de outra maneira, e ainda na forma como navegam através de uma rota (KIMURA, 1992).

Somado a estes aspectos, cabe ressaltar que o hipocampo relaciona-se com uma variedade de comportamentos, como memória e aprendizagem (principalmente memória espacial) e que muitos estudiosos estão direcionando suas atenções à contribuição dos vários aferentes e eferentes para com os processos cognitivos. Dentro deste contexto, o CE é o maior aferente cortical do hipocampo e também do giro denteado. RAMIREZ et al. (1995) sugerem que danos no CE dão como resultado uma diminuição na performance de tarefas em laberinto. Estas considerações podem indicar que alterações no CE provocam também diminuição de comportamentos que normalmente são mantidos pela

formação hipocampal. Talvez, além da modificação estrutural no CE, como ficou demonstrado que a castração possa também causar alterações de comportamento nos animais.

Existem evidências de que os *somata* dos neurônios do CE da camada IV em animais normais são menores quando comparados com o de outras camadas (RÁMON Y CAJAL, 1995). Neste trabalho, os corpos celulares da camada IV dos animais controle apresentaram-se com volumes maiores em todos os níveis, nas duas regiões analisadas (LEA e MEA).

O número de contatos sinápticos nos *somata* pode estar diretamente relacionado com o tamanho dos corpos celulares dos neurônios, ou seja, quanto maior o soma, maior o número de contatos sinápticos, comprovado por GOLDERBERG et al. (1995), ao estudar os neurônios da camada II do CE, em primatas. Estes dados sugerem que a castração, ao promover uma diminuição acentuada no tamanho do soma, também pode interferir nos mecanismos funcionais vinculados às conexões intrínsecas do MEA, principalmente na camada IV, região em que este estudo indicou uma maior diminuição no tamanho do soma.

Desta maneira, pode-se dizer que a diminuição do volume dos *somata*, encontrada no grupo dos animais castrados, faz com que suas atividades também fiquem diminuídas, influenciando os circuitos que o CE estabelece, como por exemplo, com o subicium, córtex piriforme e o hipocampo (KÖHLER, 1988).

Os resultados do presente estudo, indicaram diferença nos volumes dos corpos dos neurônios dos ratos castrados no 5^o dia de vida, quando comparados com os do grupo controle, já adultos, ou seja: diminuíram significativamente. Da mesma maneira os *somata* observados dos ratos castrados da região MEA, se apresentaram com menor volume do que os da região LEA. Também verificou-se serem menores os *somata* do nível ventral, comparando-se aos dos níveis dorsal e intermédio e os *somata* da camada IV do CE.

Como a castração foi realizada no 5^o de vida dos animais experimentados e sabendo-se que em ratos, neste período ocorrem importantes modificações estruturais é possível que as mesmas, tenham relação com a corticogênese durante o desenvolvimento.

Do presente estudo resultou uma análise de um fator morfológico no que se refere ao tamanho dos *somata* dos neurônios de ratos castrados comparando-se com o grupo controle, faz-se necessário outras buscas experimentais, que possam definir os questionamentos discutidos neste capítulo. Como exemplo, poder-se-ia verificar a relação testosterona e/ou seus derivados (como o estradiol), sobre os corpos dos neurônios quanto aos aspectos morfo-funcionais, aplicando e/ou modificando o modelo proposto.

4.1- Considerações Finais

A título de conclusão, os resultados obtidos através deste trabalho, indicaram diferenças morfológicas (volumétricas) entre os *somata* dos neurônios inseridos nas camadas II e IV no grupo castrado e não castrado, onde foi observado que o grupo experimental apresentou um déficit de 34,7% nos volumes de seus *somata*, quando comparados com os *somata* do grupo controle (não castrados)

Verificou-se que a região medial (MEA) do grupo experimental, apresentou neurônios com seus *somata* menores quando comparados com os *somata* dos neurônios da outra região nos dois grupos estudados , o que indica que esta região é mais susceptível aos efeitos da castração.

Foi observado também que no nível ventral (1,9 interaural) , os *somata* dos neurônios estudados do grupo experimental (castrados), apresentaram-se menores quando comparados com os demais níveis do grupo controle (não castrados).

Ainda verificou-se que tanto a camada IV do MEA como a camada IV do LEA, apresentaram maior diferença entre as médias analisadas, apresentando-se a camada IV a mais susceptível aos efeitos da castração efetuada no 5^o dia de vida pós-natal de acordo com o modelo pesquisado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

*ALTMAN, J.e DAS, G. D. Autorradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **J. Comp. Neurol.**, v.124, p.319-36, 1965.

AMARAL, D.G., INSAUSTI, R.e COWAN, W.M. The entorhinal cortex of the monkey: I Cytoarchitectonic organization, **J. Comp. Neurol.**, v.264 ,p.326-55, 1987.

AMARAL, D.G.e WITTER, M.P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of a anatomical data. **Neuroscience.**, v.31,p.571-591,1989.

ANGEVINE, J. B. Time of neuronal origin in hippocampal region. **Exp. Neurol. Suppl.**, v..2, p.1-70, 1965.

ARAKI, I., HARADA, Y.e KUNO, M. Target-dependente hormonal control of neuron size in the rat spinal nucleus of bulbocavernosus. **J. Comp. Neurol.**, v.11,n.10, p. 3025-33 1991.

ARNOLD, A . P.e GORSKI. R. A . Gonadal steroid induction of structural sex difference in the central nervous system. **Ann. Ver. Neurosci.**, v.7, p.413-42. 1984.

BALTHAZAR, J.e JOIDART, U Aromatase in the brain and male sexual control. **Brain Res.**, v.44, p.521-40,1993.

* Associação Brasileira de Normas e Técnicas. NBR 6023. Brasília ABNT, 1089

BETTINI, E., POLLIO, G., SANTAGATI, S. e MAGGI, A . Estrogen receptor in rat brain: Presence in the hippocampal formation. **Neuroend.**, v. 65, p.502-8, 1992.

BRODAL, A. **Anatomia Neurológica**. São Paulo: Roca, 1984, 524-56.

COTMAM, C., TAYLOR, A. e LYNCH, G. Ultrastructural changes in synapses in the dentate gyrus of the rat during development. **Brain Res.**, v. 63, p.205-13, 1973.

DAVIS B. M., WANG, H. S., ALBERS, K. M., CARLSON, S. L., GOODNESS, T. P. e McKINNON, D. Effects of NGF overexpression on anatomical and physiological properties of sympathetic postganglionic neurons. **Brain Res.**, v. 724, p.47-54, 1996.

DIAMOND, M. Sex Differences in the Rat Forebrain. **Brain Res. Review**, v.12, p. 235-240, 1987.

DIAMOND, M., JOHNSON, R.E., YOUNG, D. e SINGH, S. Age- related morphologic difference in the cat cerebral cortex and hippocampus: male - female; right-left. **Exp. Neurol.**, v. 81, p.1-13, 1983.

EMPSON, R. M. e HEINEMAN, U. The perforant path projection to hippocampal area CA1 in the rat hippocampal-entorhinal cortex combined slices. **J. Physiol.**, v.484, p.707-720, 1985.

FINCH, D.M., GIGG, J., TAN, A.M.e KOSOYAN, O. P. Neurophysiology and neuropharmacology of projections from entorhinal cortex to striatum in the rat. **Brain Res.**, v.670, p.233-247, 1995.

FU DU, SCHWARCZ, R.e TAMMINGA, C.A. Entorhinal cortex in temporal lobe epilepsy. **Am J. Psychiatry.**, v.152, p.6-10, 1995.

GARCIA-SEGURA, L.M. La impregnación sexual del cerebro. **in: MORA, F.(Ed.). El cerebro íntimo.** Barcelona: Ariel, 1996, p.1120-33.

GERMROTH, P., SCHWERDTFEGER, W.K.e BUHL, E.H. Morphology of identified entorhinal neurons projecting to the hippocampus. A light microscopical study combining retrograde tracing and intracellular injection. **Neuroscience**, v.30, p.683-91, 1989.

GIBBS, R.B. Estrogen and nerve growth factor-related systems in brain. **In: Hormonal restructuring of the adult brain.** New York: Ann. N.Y. Acad. Sci., 1994, 165-299.

GODINA, C.e BARASSA, A. Morphogenesis et histogenesis della formazione ammonica. **Z.Zellforsch.**, v.63, p.327-45, 1964.

GOLDEMBERG, M.T. BAKAY, R.A.E.e RIBAK, C.E. Electro microscopy of cell islands in layer II of the primate entorhinal cortex. **J. Comp. Neurol.**, v.355, p.51-66, 1995.

GOOD, P. F.e MORRISON, J. H. Morphology and kainate-receptor immunoreactivity of identified neurons within the entorhinal cortex projections to superior temporal sulcus in the cynomolgus monkey. **J. Comp. Neurol.**, v.357, p.25-35, 1995.

GOODMAN, H. M. **Basic Medical Endocrinology**. Massachusetts : Raven Press ,1994,cap. 5, p.7-13

GORSKI, R. A. , GORDON, J. H., SHRYNE, J.E.e SOUTHAM, A . M. Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of brain rat. **Brain Res.**, v.148, p. 333-46, 1978.

GOY, R. W.e McEWEN, B.S. **Sexual Differentiation of the Brain**. Cambridge: MIT. Press, 1980, p.223-41.

GREGORY, E. Comparison of postnatal CNS development between male and female rats. **Brain Res.** , v.99, p.152-56, 1975

GOULD,E. ,WOOLLEY,C.S.,FRANKFURT,M.e McEWEN,B Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. **J. Comp. Neurol.**, v.10, n.4, p.1286-91,1990.

HIEMKE, C.,BANGER, M., KOHSIK, R. HUNDT,M.e GHRAF,R.. Action of sex hormones on the brain. **Neuro-Psychopharmacol.e Biol-Psychat .**, v.16, p.77-88.1992.

INSAUSTI, R.; TUNON T.; SOBREVIELA, T. The human entorrinal cortex: A cytoarchitectonic analysis. **J. Comp. Neurol.**, v.355, n.2, p.171-98,1995.

KASS, J.H. The organization of neocortex in mammals. Implications for theories of brain function. **Annual Rev. of Psychol.**, v.38, p. 129-51, 1987.

KIMURA, D, Sex difference in the brain.**Scien. Amer.**, V. 267, n.3, p.81-9,1992.

KÖHLER, C. A projection from the deep layers of the entorhinal area to the hippocampal formation in the rat brain. **Neurosci. Lett.**, v.56, p.13- 9, 1985 a.

KÖHLER, C. Intrinsic projections of the retrohippocampal region in the rat brain. I The subicular complex. **J. Comp. Neurol.**, v.236, p.504-22, 1985 b.

KÖHLER, C. Intrinsic connection of the retrohippocampal region in the rat brain II. The medial entorhinal area. **J. Comp. Neurol.**, v.246, p.149-69, 1986.

KÖHLER, C. Intrinsic connections of the retrohippocampal region in the rat brain: III. The lateral entorhinal area. **J. Comp. Neurol.**, v. 271, p. 208-28, 1988.

KOLB, B. e STUART, I. Sex-related differences in dendritic branching of cells in pre-frontal cortex of rat. **J. Neuroend.**, v.3, p. 95-100 1991.

MADEIRA, M.D., SOUZA N. e PAULA-BARBOSA, M. M. Sexual dimorphism in the mossy fiber synapse of rat hippocampus. **Brain Res.**, v.87, p.573-45, 1991.

MADEIRA, M.D. e LIEBERMAN, A.R. Sexual Dimorphism in the Limbic System. **Brain Res. Ver.**, v.167, p.273-94, 1995.

MAREN, S. , DE-COA, B. e FANSELOW, M.S. Sex differences in hippocampal long-term potentiation in rats: positive correlations between LTP and contextual learning. **Brain Res.**, v.661, p.25-34, 1994.

McEWEN, B.S. Sexual Maturation and Differentiation_The role of the gonadal steroids. **Progress in Brain Research**, v.48, p. 291-308, 1977.

McEWEN, B.S. Steroid hormone interactions with the brain: cellular and molecular aspects. **Ver. of Neurosci.**, v.4, p.2-47,1979.

McEWEN ,B.S. Toward a neurochemical basis of steroids hormone action. **In: Frontiers in Neuroendocrinol.** NewYork:Raven Press,1980, v. 8, p.234-47.

McLUSKY , N.J.e NAFTOLIN, F. Sexual differentiation of central nervous system. **Science.**, v.211, p.1294-301 1981.

MEYER, G., TORRES, R. e MAS, M. The effects of puberty and castration on hippocampal spines of mice. A Golgi study. **Brain Res.**, v.155, p.108-12,1978.

MICHALANY, J., Técnica histológica em anatomia patológica. São Paulo:E.P.U.,1980

MULDOON, T.G. Role of receptors in the mechanism of steroid hormone action in the brain. **:In Steroid hormone receptors in the brain.** New York: Raven Press,1980, p. 51-91

NAVE, F. J., HUERTA,J.J., GARCIA-SUAREZ,O ., URDANGARAY, N., ESTEBAN,I.,DEL-VALLE, I.e VEIGA,J.A . Distribution of immunoreactivity for cytoskeletal protein in the human dorsal root gangli. **Anat. Rec.**, v. 244, n.2, p.246-56, 1996.

PARDUCZ, A., GARCIA-SEGURA, L.M. Sexual differences in the synaptic connectivity in the rat dentate gyrus. **Neurosci. Letters.** 161 : 53-6,1993.

PAXINOS, G.e WATSON. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. Sydney: Academic Press, 1982.

PARÉ, D. , DONG. J. , GAUDREAU. H. Amygdalo- entorhinai cortex and their reflection in the hippocampal formation: generation of sharp sleep potentials. **J. Neurosc.**, v.15. p. 2482-503, 1995.

PFAFF, D.W.e MacEWEN, B.S. Actions of estrogens and progestins on the nerve cells. **Science**, v. 219, p.808-14, 1983.

PFAFF, D.W. Morphological changes in the brain of adult male rats after neonatal castration. **J. Endocrin.**, v.33. p. 415-16, 1966.

RAMIREZ, J.J., MARTIN, C., McQUILKIN, M.L., McDONALD, K. A . VALBUENA< M.e O"CONNEL, J.M., Bilateral entorhinal cortex lesion impar DRL performance in rat. **Psychol.**, v.23, n.1, p.37-44. 1995.

RAMÓN Y CAJAL, S. **Histology of the neurons system of man and vertebrates**. New York: Academic Press, 1995

RANG, H. P. , DALE, M. M. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, 78-86.

REID, S.N.M.e JURASKA, J.M. Sex differences in gross size of rat neocortex. **J. Comp. Neurol.**, v.321, p.242-46, 1992.

RICH, K. M., DISH, S. P.,e EICHLER, M.E. The influence of regeneration and nerve growth factor on the neuronal cell reaction to injury. **J. Neuroci.**, v. 18, p.569-76, 1989.

- ROOF,R.: The dentate gyrus is sexually dimorphic in prepubescent rats: testosterone plays a significant role. **Brain Res.**, v.610, p.148-51,1993.
- ROOF, R. L.e HAVENS,M.D., Testosterone improves maze performance and induces development of a male hippocampus in female.**Brain Res.**, v.572, p. 310-13,1991.
- SALVATORE, R. Morfology technical in the brain. **J. Comp Neurology.**, v. 54, p. 280-93, 1972.
- SEGOVIA, S.e GUILLAMÓN, A. Cerebro, hormonas y orientación sexual. In: **MORA, F.(Ed.). El cèrebro íntimo.** Barcelona: Ariel,1996,133-50.
- STEWARD, O .e SCOVILLE, S.A .Cells of origin of entorhinal cortical aferents to the hippocampus and fascia dentata of the rat. **J. Comp. Neurol.**, v.167, p.347-70, 1976.
- STUMPF, W.E. Oestrogen-neuron system in the paraventricular brain. **Am J. Anat.**, v. 129, p.207-18, 1970.
- STUMPF, W.E., SAR, M.e KEEFER, D.A . Atlas of oestrogen target cell in rat brain. **Anat. Neuroend.**, v. 54. p .104-19,1975.
- SWANSON, L.W.e KÖHLER, c.e BJORKLUND, A. **Handbook of chemical neuroanatomy.** New York : Elsevier Science Publishers B.V., 1987.
- UYLINGS, H.B.; KUYPERS,K., e DIAMOND, M.D. Effects of differential enviroments on platicity of dendritcs of cortical pyramidal neurons in adult rat. **Exptl. Neurol.**, v.62. p.652-77,1978.

VAN EDEN, C.G.; UYLINGS, H.B.M. e VAN PELT, J. Sex differences and left and right asymmetries in the prefrontal cortex during postnatal development in the rat. **Dev. Brain Res.**, v.12, p.146-52, 1984

VAN HOESEN, G.W. e PANDYA, D.N. Some connections of the entorhinal (area28) and perirhinal (area35) cortices of the rhesus monkey. Temporal lobe afferents. **Brain Res.**, v. 951, p.1-24, 1985.

VNEK, N.; GLEASON, T.C.; e KROMER, L.F. Entorhinal-hippocampal connections and object memory in the rat: acquisition versus retention. **J. of Neurosci.**, v.15. n.4, p.3193-9, 1995.

WARREN, S. g. , HUMPHREYS, A . G., JURASCA, J. M. e GREENOUGH, W.T. LTP varies across the estrous cycle: enhanced synaptic plasticity in proestrus rats. **Brain Res.**, v.703, p.26-30, 1995.

WIMER, R.E. e WIMER, C. Three sex dimorphisms in the granule cell layer of the hippocampus in house mice. **Brain Res.**, v.328, p.105-9, 1985.

WITTER, M.P., GRIFFIOEN, A . W., JORRITSMA-BYHAM, B. e KRIJNEN, J.L.M. Entorhinal projections to the hippocampal CA1 region in the rat: an underestimated pathway. **Neurosci. Lett.**, v.85, p.93-8, 1988.

WOOLLEY, C. S., McEWEN, B., Role of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v.336, p.293-306, 1993.

YANAI, J. Delayed maturation of the male cerebral cortex in rats. **Acta Anat.**, v.104, p. 335-339, 1979a .

YANAI, J. Strain and sex differences in the rat brain. **Acta Anat.**, v.103, p. 150-158,1979b.

ZIMMER, A.F. Development of the hippocampus and fascia dentata: morphological and histochemical aspects. **In: Maturation of Nervous System.**, New York: Raven Press, 1977, p.197-232.