

**Efeito do Agonista Seletivo do GPER em Artérias  
Mesentéricas de Resistência de Ratos Normotensos  
de Ambos os Sexos**

**Pollyana Peixoto**

**Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas**

**Universidade Federal do Espírito Santo  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas  
Vitória, Março de 2017**

# **Efeito do Agonista Seletivo do GPER em Artérias Mesentéricas de Resistência de Ratos Normotensos de Ambos os Sexos**

**Pollyana Peixoto**

**Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.**

**Aprovada em \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ por:**

---

**Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Roger Lyrio dos Santos – Orientador, UFES**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nazaré Souza Bissoli – Co-orientadora, UFES**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sônia Alves Gouvêa, UFES**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Raquel Santos de Medeiros Garcia, IFES**

**Universidade Federal do Espírito Santo  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas  
Vitória, Março de 2017**

Peixoto, Pollyana 1993

Efeito do Agonista Seletivo do GPER em Artérias Mesentéricas de Resistência de Ratos Normotensos de Ambos os Sexos. [Vitória] 2017

xiv, 65p., 29,7 cm (UFES, M. Sc., Ciências Fisiológicas, 2017)

Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF.

Dedico este trabalho, especialmente, à minha mãe, por sempre ter me conduzido ao caminho do conhecimento e da sabedoria.

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade de mostrar que sou capaz de alcançar meus objetivos, e que apesar dos obstáculos e dificuldades, Ele me deu saúde e sabedoria para que eu pudesse atingir mais esta meta em minha vida.

À minha mãe, Maura Peixoto, que foi fundamental e imprescindível para aquisição deste título. Obrigada por todo carinho, incentivo e apoio!

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Raquel Santos de Medeiros Garcia, Prof<sup>o</sup>. MSc. Gamaliel Pires de Moura e Prof<sup>a</sup>. MSc. Viviane Guimarães Carvalho de Moura por guiarem meus caminhos rumo à pesquisa. Agradeço imensamente por todo incentivo, conselhos, confiança e amizade!!!

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nazaré Souza Bissoli por todo suporte e direcionamento desde a iniciação científica até o mestrado. Muito obrigada pela oportunidade de aprendizado, por compartilhar seus conhecimentos, pelo apoio em todos os momentos, pelos inúmeros conselhos tranquilizadores e pela confiança. Gratidão!!!

Ao meu orientador, Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Roger Lyrio dos Santos, pela oportunidade de cursar o mestrado e realizar esta pesquisa. Agradeço especialmente pelo projeto de mestrado e por sua essencial orientação.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Raquel Santos de Medeiros Garcia e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sonia Alves Gouvea, meu agradecimento não somente por aceitarem o convite de compor a banca examinadora desta dissertação, mas, sobretudo, pelas significativas contribuições.

Aos meus queridos amigos que contribuíram para tornar esta caminhada possível, através do incentivo, parceria e conselhos. Em especial, agradeço ao Moacir Rocha Neto, Pedro Ernesto Massariol de Oliveira e Tainara de Oliveira Santos por todo zelo e cuidado. Vocês foram incríveis em cada detalhe!

Aos alunos e ex-alunos de iniciação científica, Amanda Herbst Tesch, Arthur Kurtlin Soares Dias, Edgar Mendes Souza Wan Der Maas, Mariana dos Reis Couto, Matheus Icaro Vaz e Nara Rubia Dalla Bernardina, parceiros fundamentais no cumprimento das rotinas dos experimentos.

A toda equipe do Laboratório de Hipertensão Experimental (LHE – UFES) por todo companheirismo e ajuda especialmente aos alunos Ewelyne Miranda de Lima, Girlandia Alexandre Brasil e Phablo Wendell Costalonga Oliveira.

Aos colegas do Laboratório de Regulação Neurohumoral da Circulação, mas de modo particular aos alunos Erick Roberto Gonçalves Claudio, Fabrício Bragança da Silva e Laís Almeida Menezes pelo auxílio e disponibilidade em todos os momentos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gláucia Rodrigues de Abreu, Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Nyam Florencio da Silva e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Suely Gomes de Figueiredo pelos conselhos, disposição em ajudar e suporte na realização do referido estudo.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Virgínia Soares Lemos e todos os alunos do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular (ICB – UFMG) particularmente aos alunos Eduardo Damasceno Costa, Josiane Fernandes da Silva e Rosária Dias Aires pela excelente contribuição na realização deste estudo.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Simão Padilha, Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Leonardo dos Santos e as alunas Priscila Rossi de Batista e Sabrina Bertoli Rodrigues do Laboratório de Eletromecânica Cardíaca (LEMC – UFES) pela parceria e auxílio neste trabalho. Aproveito para agradecer de forma especial à Sabrina Bertoli Rodrigues, uma amiga em todas as horas que deixa transparecer de modo suave todo seu cuidado e atenção para com o próximo. Obrigada pela sua generosidade, companhia e conselhos.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF – UFES) pelo empenho em ensinar e a atual coordenadora deste programa de pós-graduação, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Simão Padilha. Aos técnicos de laboratório, em especial ao Anderson de Almeida Barbosa, ao médico veterinário Rodolpho José da Silva Barros e aos demais funcionários que direta ou indiretamente me ajudaram de alguma maneira.

Ao apoio financeiro da CAPES e FAPES.

Muito obrigada!!!

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	24
2.1. OBJETIVO GERAL .....	24
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	26
3.2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....	26
3.2.1. Determinação da Fase do Ciclo Estral .....	26
3.2.2. Reatividade Vascular .....	26
3.2.3. Western Blot .....	27
3.2.4. Dihidroetídio – DHE .....	29
3.2.5. Diclorofluoresceína – DCF .....	30
3.2.6. Imunofluorescência .....	31
3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	32
<b>4. RESULTADOS</b> .....	33
4.1. REATIVIDADE VASCULAR EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RESISTÊNCIA .....	33
4.1.1. Avaliação da resposta vasodilatadora dependente do endotélio .....	34
4.1.2. Avaliação da participação dos mediadores endoteliais (NO, PGI <sub>2</sub> e EDHF) .....	35
4.1.3. Avaliação da via de sinalização rápida PI3k-Akt .....	37
4.1.4. Avaliação da participação dos canais para K <sup>+</sup> .....	38
4.2. EXPRESSÃO PROTEICA .....	39
4.2.1. Expressão proteica do GPER .....	39
4.2.2. Expressão proteica de enzimas antioxidantes (catalase, SOD-1 e SOD-2) .....	40
4.2.3. Expressão proteica da isoforma endotelial da óxido nítrico sintase (eNOS) .....	41
4.3. MEDIDA DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs) .....	42
4.3.1. Quantificação da produção de ânions superóxidos (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) .....	42
4.3.2. Quantificação da produção de peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	43
4.4. IMUNOLOCALIZAÇÃO DO GPER .....	44
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	45
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	51
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	52

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Vias de relaxamento vascular induzidas pelo estrogênio. Estrogênio se liga a ER $\alpha$ , ER $\beta$  ou GPER e provoca a liberação dos mediadores endoteliais (NO, PGI $_2$  e EDHF) que podem ativar canais para potássio, promovendo hiperpolarização e consequente relaxamento do MLV. O estrogênio também poderia inibir a liberação de ET-1 e TXA $_2$ , o que atenuaria a resposta vascular de constrição. No MLV, o estrogênio modula o tônus por mecanismos diretos, reduzindo a probabilidade de abertura dos canais de cálcio do tipo L voltagem dependente ou ativação de BKca, levando à hiperpolarização da membrana.....19
- Figura 2: Estrutura molecular do GPER.....21
- Figura 3: Ações do GPER em condições fisiológicas (mostrada em preto) e patológicas (mostrada em vermelho) em ambos os sexos.....22
- Figura 4: Estrutura molecular do (A) estrogênio e (B) G-1.....23
- Figura 5: Curva concentração-resposta do agonista seletivo do GPER [G-1 (1 nM – 10  $\mu$ M)] em artérias mesentéricas de resistência na ausência de inibidores [fêmeas (n=31) e machos (n=34)]. Os valores foram expressos com média  $\pm$  EPM.....33
- Figura 6: Curva concentração-resposta do agonista seletivo do GPER [G-1 (1 nM – 10  $\mu$ M)] em artérias mesentéricas de resistência (A) na presença do inibidor seletivo do GPER (G36 – 1  $\mu$ M) [fêmeas (n=8) e machos (n=8)], (B) na presença do inibidor do ER $\alpha$  e ER $\beta$  (ICI 182,780 – 1  $\mu$ M) [fêmeas (n=8) e machos (n=8)] e (C) resposta ao veículo (DMSO) [fêmeas (n=5) e machos (n=5)]. Os valores foram expressos com média  $\pm$  EPM. \*\* p < 0.01 vs curva obtida antes da inibição. Para a análise utilizou-se ANOVA duas vias, seguida do teste *post hoc* de Bonferroni.....34
- Figura 7: Efeito do agonista seletivo do GPER (1 nM – 10  $\mu$ M) na presença [fêmeas (n=31) e machos (n=34)] ou ausência [fêmeas (n=10) e machos (n=8)] do endotélio. Os valores foram expressos com média  $\pm$  EPM. \*\* p < 0.01 vs curva obtida antes da remoção do endotélio. <sup>†††</sup> p < 0.001 vs macho após a remoção endotelial. Para a análise utilizou-se ANOVA duas vias, seguida do teste *post hoc* de Bonferroni.....35
- Figura 8: Participação dos mediadores endoteliais nos efeito vasodilatador do G-1 em artérias mesentéricas de resistência de ambos os sexos. Efeito da (A) inibição não seletiva da óxido nítrico sintase (NOS) com N<sup>w</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME – 300  $\mu$ M) [fêmeas (n=8) e machos (n=10)], (B) inibição da ciclooxigenase (COX) com indometacina (INDO – 10  $\mu$ M) [fêmeas (n=8) e machos (n=9)], (C) inibição combinada da NOS e COX com L-NAME + INDO [fêmeas (n=8) e machos (n=9)] e (D) inibição inespecífica da citocromo endotelial P450 (CYP) com clotrimazol (0.75  $\mu$ M) [fêmeas (n=8) e machos (n=10)]. Os valores foram expressos com média  $\pm$  EPM. \*\* p < 0.01 vs curva obtida antes da inibição. Para a análise utilizou-se ANOVA duas vias, seguida do teste *post hoc* de Bonferroni.....36
- Figura 9: Participação da via de sinalização rápida PI3k-Akt (LY-294,002, 2.5  $\mu$ M) na resposta vasodilatadora do agonista seletivo do GPER em artérias mesentéricas de resistência de ambos os sexos [fêmeas (n=8) e machos (n=8)]. Os valores foram expressos com média  $\pm$  EPM. \*\* p < 0.01 vs curva obtida antes da inibição. Para a



análise utilizou-se ANOVA duas vias, seguida do teste *post hoc* de Bonferroni.....37

Figura 10: Efeito do bloqueio inespecífico de canais para potássio com tetraetilamônio (TEA, 5 mM) no relaxamento induzido por G-1 de artérias mesentéricas de resistência [fêmeas (n = 8) e machos (n = 9)]. Os valores foram expressos com média ± EPM. \*\* p < 0.01 vs curva obtida antes da inibição. Para a análise utilizou-se ANOVA duas vias, seguida do teste *post hoc* de Bonferroni.....38

Figura 11: Análise representativa western blot com quantificação da expressão proteica relativa do GPER (38 kDa) normalizada pela β-actina (42 kDa) dos ramos vasculares de resistência do leito mesentérico em fêmeas (n=5) e machos (n=5). Os valores foram expressos com média ± EPM. \* p < 0.05 vs fêmea. Para a análise utilizou-se teste *t de student* não pareado.....39

Figura 12: Análise representativa western blot com quantificação da expressão proteica relativa da (A) catalase (64 kDa), (B) SOD-1 (45 kDa) e (C) SOD-2 (51 kDa) normalizadas pela β-actina (42 kDa) dos ramos vasculares de resistência do leito mesentérico em fêmeas (n=5) e machos (n=5). Os valores foram expressos com média ± EPM.....40

Figura 13: Análise representativa western blot com quantificação da expressão proteica relativa da (A) eNOS (135 kDa) e (B) eNOS fosforilada (140 kDa) normalizadas pela β-actina (42kDa) dos ramos vasculares de resistência do leito mesentérico em fêmeas (n=5) e machos (n=5). Os valores foram expressos com média ± EPM.....41

Figura 14: Análise representativa da microscopia de fluorescência emitida por dihidroetídio em artérias mesentéricas de (A) fêmeas (n=5) e (B) machos (n=5) na ausência ou presença de estímulos com quantificação da fluorescência produzida. Barra de escala = 20 μm. Os valores foram expressos com média ± EPM. \* p < 0.05 vs Fêmea basal. † p < 0.05 vs Macho basal. # p < 0.05 vs Fêmea G-1. § p < 0.05 vs Macho G-1. Para a análise utilizou-se ANOVA duas vias, seguida do teste *post hoc* de Tukey.....42

Figura 15: Análise representativa da microscopia de fluorescência emitida por diclorofluoresceína em artérias mesentéricas de (A) fêmeas (n=5) e (B) machos (n=5) na ausência ou presença de estímulos com quantificação da fluorescência produzida. Barra de escala = 20 μm. Os valores foram expressos com média ± EPM. \* p < 0.05 vs Fêmea basal. † p < 0.05 vs Macho basal. # p < 0.05 vs Fêmea G-1. § p < 0.05 vs Macho G-1. Para a análise utilizou-se ANOVA duas vias, seguida do teste *post hoc* de Tukey.....43

Figura 16: Imunodeteção do GPER em artérias mesentéricas de fêmeas (A; n=5) e machos (B; n=5). A imunolocalização para GPER é demonstrada tanto no endotélio (setas) como no músculo liso (traço). Barra de escala = 20 μm.....44

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ACh</b> Acetilcolina	<b>ET<sub>B2</sub></b> Receptor de endotelina B2
<b>Akt</b> Proteína quinase B	<b>G-1</b> 1-[4-(6-bromobenzo[1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]quinolin-8-yl]-ethanone
<b>BH<sub>4</sub></b> Tetrahidrobiopterina	<b>G36</b> 4-(6-bromo-benzo[1,3]dioxol-5-yl)-8-isopropyl-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]quinolone
<b>BK<sub>Ca</sub></b> Canal para potássio ativado por cálcio de larga condutância	<b>GCs</b> Guanilato ciclase solúvel
<b>cAMP</b> 3'5' Monofosfato cíclico de adenosina	<b>GP<sub>ER</sub></b> Receptor de estrogênio acoplado a proteína G
<b>cGMP</b> 3'5' Monofosfato cíclico de guanosina	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> Peróxido de hidrogênio
<b>CMLV</b> Célula do músculo liso vascular	<b>IK<sub>Ca</sub></b> Canal para potássio ativado por cálcio de condutância intermediária
<b>COX</b> Ciclooxygenase	<b>INDO</b> Indometacina
<b>CYP</b> Citocromo P450	<b>IP3</b> Inositol 1,4,5-trifosfato
<b>DAG</b> Diacilglicerol	<b>K<sub>ATP</sub></b> Canal para potássio sensível a ATP
<b>DCF</b> Diclorofluoresceína	<b>K<sub>Ca</sub></b> Canal para potássio ativado por cálcio
<b>DCVs</b> Doenças Cardiovasculares	<b>K<sub>IR</sub></b> Canal para potássio retificador de influxo
<b>DHE</b> Dihidroetídio	<b>K<sub>V</sub></b> Canal para potássio ativado por voltagem
<b>DMSO</b> Dimetilsulfóxido	<b>L-NAME</b> N <sup>ω</sup> -nitro-L-arginina metil éster
<b>EDHF</b> Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio	<b>MLV</b> Músculo Liso Vascular
<b>EETs</b> Ácidos epoxieicosatrienoicos	<b>NADPH</b> Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
<b>eNOS</b> Óxido Nítrico Sintase Endotelial	<b>NO</b> Óxido Nítrico
<b>ERK</b> Quinase regulada por sinais extracelulares	<b>NOS</b> Óxido Nítrico Sintase
<b>EROs</b> Espécies reativas de oxigênio	<b>NOX</b> NADPH oxidase
<b>ERα</b> Receptor de estrogênio alfa	<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b> Ânion superóxido
<b>ERβ</b> Receptor de estrogênio beta	
<b>ET-1</b> Endotelina	
<b>ET<sub>A</sub></b> Receptor de endotelina A	

**PGI<sub>2</sub>** Prostaciclina

**Phe** Fenilefrina

**PI3k** Fosfatidilinositol-3-quinase

**PLA<sub>2</sub>** Fosfolipase A2

**PLC** Fosfolipase C

**SK<sub>Ca</sub>** Canal para potássio ativado por cálcio de baixa condutância

**SOD** Superóxido dismutase

**TEA** Tetraetilamônio

**TP** Receptor tromboxano-prostanóide

**TXA<sub>2</sub>** Tromboxano

## RESUMO

Ainda que as ações do estrogênio tenham sido atribuídas à ativação de receptores nucleares (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ), um terceiro receptor de estrogênio (receptor de estrogênio acoplado à proteína G – GPER) tem sido apontado como mediador da ação rápida do hormônio. Contudo, são escassos os estudos que relacionam as diferenças sexuais à ativação seletiva do GPER, principalmente em vasos de resistência, tornando essa investigação necessária.

Foram utilizados ratos Wistar de ambos os sexos. Artérias de terceira ordem foram isoladas para estudo das curvas concentração-resposta obtidas por adições cumulativas do agonista G-1 (1 nM – 10  $\mu$ M) ou veículo (DMSO) após pré-contracção com fenilefrina. O efeito do G-1 foi avaliado antes e após a remoção endotelial ou incubação por 30 minutos com inibidores da NOS e COX (L-NAME e INDO, respectivamente), inibidor inespecífico da CYP (clotrimazol), inibidor da via de sinalização rápida PI3k-Akt (LY-294,002), bloqueador inespecífico de canal para K<sup>+</sup> (TEA), antagonista específico do GPER (G36) e antagonista do ER $\alpha$  e ER $\beta$  (ICI 182,780). Adicionalmente, as artérias mesentéricas de resistência foram dissecadas e a expressão proteica do GPER, da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), da catalase e da superóxido dismutase (SOD) teciduais foi analisada. Além disso, avaliamos a fluorescência aos ânions superóxidos e peróxido de hidrogênio vascular, bem como a imunolocalização específica do GPER.

O agonista do GPER induziu relaxamento concentração-dependente em artérias de fêmeas e machos. Não houve diferença entre os grupos na quantificação da produção de ânions superóxidos e peróxido de hidrogênio assim como na expressão de enzimas antioxidantes. A expressão proteica do GPER foi maior nos machos. Na ausência do endotélio a resposta do G-1 foi reduzida em ambos os grupos, sendo maior nas fêmeas. A imunolocalização para GPER foi maior no endotélio das fêmeas, enquanto que nos machos não houve diferença entre o endotélio e músculo liso vascular. O vasorelaxamento também foi atenuado na presença de L-NAME, LY-294,002 e TEA de forma semelhante em fêmeas e machos. INDO, clotrimazol ou ICI 182,780 não reduziram a vasodilatação. L-NAME + INDO não alteram o padrão de resposta observado na inibição individual com L-NAME. Não houve diferença de

sexo na expressão e atividade enzimática da eNOS. A seletividade do agonista GPER foi confirmada na presença do G36.

Concluimos que o relaxamento vascular mediado pelo GPER em artérias mesentéricas de resistência não é influenciado pelo sexo, mas em parte, por mecanismos relacionados à via do NO endotelial e ativação de canais para potássio.

**Palavras chave:** GPER, Artérias mesentéricas de resistência, Endotélio, PI3k-Akt-eNOS, Canais para K<sup>+</sup>, Relaxamento vascular.

## ABSTRACT

Despite estrogen actions have been attributed to the activation of nuclear receptors (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ), a third estrogen receptor (G-protein-coupled estrogen receptor - GPER) has been shown to mediate the rapid action of the hormone. However, there are few studies that relate the sexual differences to the selective activation of the GPER, especially in resistance vessels, become necessary this investigation.

Wistar rats of both sexes were used in this study. Mesenteric third-order branches were isolated for the study of concentration-response curves obtained by cumulative doses of the G-1 agonist (1 nM - 10  $\mu$ M) or the vehicle (DMSO) in phenylephrine-precontracted vessels. The effect of G-1 activation was evaluated before and after endothelium removal or incubation for 30 minutes with NOS and COX inhibitors (L-NAME and INDO, respectively), non-specific CYP inhibitor (clotrimazole), phosphoinositide 3-kinase (PI3k)-Akt inhibitor (LY-294,002), non-specific K<sup>+</sup> channel blocker (TEA), specific GPER antagonist (G36) or ER $\alpha$ /ER $\beta$  antagonist (ICI 182,780). In addition, mesenteric resistance arteries were dissected and the protein expression of GPER, endothelial nitric oxide synthase (eNOS), catalase and superoxide dismutase (SOD) were analyzed. Moreover, we evaluated the vascular production of superoxide anion and hydrogen peroxide by fluorescence techniques, as well as the immunolocalization of the GPER.

The GPER agonist induced concentration-dependent relaxation in both sexes. There was no difference between the groups in the production of superoxide anions and hydrogen peroxide as well as in the expression of antioxidant enzymes. The protein expression of the GPER was higher in males. In the absence of the endothelium the response induced by G-1 was reduced in both groups with greater degree in the females. The immunolocalization showed greater presence of GPER in the endothelium than in vascular smooth muscle of the female rats, whereas there were no difference in the males rats. Vasorelaxation was attenuated in males and females in the presence of L-NAME, LY-294,002 and TEA, and this effect was similar in both groups. INDO, clotrimazole or ICI 182,780 did not reduced vasorelaxation. L-NAME + INDO results were similar to individual inhibition with L-NAME alone. There was no

sex difference in protein expression and enzymatic activity of eNOS. The selectivity of the GPER agonist was confirmed in the presence of G36.

We conclude that the vascular relaxation mediated by the GPER in mesenteric resistance arteries is not influenced by sex, but partly, involve mechanisms related to the endothelial NO pathway and the activation of potassium channels.

**Key words:** GPER, Mesenteric resistance arteries, Endothelium, PI3k-Akt-eNOS, K<sup>+</sup> channels, Vascular relaxation.

## 1. INTRODUÇÃO

Os hormônios sexuais endógenos desempenham importante papel como moduladores envolvidos na regulação e manutenção da saúde cardiovascular (Orshal & Khalil, 2004; Maric-Bilkan & Manigrasso, 2012). Entretanto, é bem conhecido que a população masculina apresenta maior risco do desenvolvimento de eventos cardiovasculares quando comparados a mulheres em idade semelhante na fase pré-menopausa (Mark *et al.*, 2007; Ocarino *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2012), o que sugere forte associação entre o dimorfismo sexual e as diferenças observadas na ocorrência desses eventos. Além disso, com o aumento cada vez maior da expectativa de vida da população mundial, mais mulheres têm atingido a fase da pós-menopausa o que vem acompanhado de maior incidência epidemiológica de doenças cardiovasculares (DCVs) (Kannel *et al.*, 1976; Bush, 1990; Barrett-Connor & Bush, 1991), possivelmente por alterações dos níveis hormonais (Kurt & Buyukafsar, 2013), evidenciando a ação dos hormônios sexuais ovarianos no que se refere à cardioproteção (Barton & Meyer, 2009; Yang & Reckelhoff, 2011; Knowlton & Lee, 2012).

As DCVs representam a maior causa de mortalidade e morbidade mundial (Mensah & Browm, 2007; Wang *et al.*, 2014; Simsekyilmaz *et al.*, 2015), sendo estimada como principal causa de morte ao longo do século XXI (Murray & Lopez, 1997; Mozaffarian *et al.*, 2016). Não obstante, as DCVs também são as principais causas de morte entre indivíduos do sexo feminino em todo o mundo, sobretudo na segunda metade de vida, sendo responsável por um terço de todas as mortes (Mosca *et al.*, 2007; Heron, 2013), matando mais mulheres do que a soma de todos os tipos de câncer, tuberculose, HIV e malária juntos (World Heart Federation, 2012). A queda do nível hormonal de estrogênio, que caracteriza a fase da pós-menopausa, desempenha um papel crítico no surgimento e desenvolvimento dessas doenças, o que torna as mulheres mais susceptíveis a eventos cardiovasculares, tais como infarto do miocárdio (Kurt & Buyukafsar, 2013; Schenkel *et al.*, 2014).

A cardioproteção atribuída ao estrogênio endógeno (mais especificamente o 17  $\beta$ -estradiol), observada na fase pré-menopausa, deve-se a grande importância do seu papel funcional (Santollo & Daniels, 2015) que compreende efeitos



hemodinâmicos, metabólicos e vasculares (Dantas *et al.*, 1999). O efeito benéfico sobre a homeostase vascular se relaciona ao fato desse hormônio modular a liberação de fatores vasoativos, por meio de mecanismos dependentes e independentes do endotélio (Khalil, 2013; Dos Santos *et al.*, 2014).

Sobre o endotélio vascular é bem estabelecido que as células endoteliais desempenhem relevante papel funcional sobre a reatividade vascular (Furchgott & Zawadzki, 1980) por meio da manutenção do estreito balanço do processo de vasomotricidade (Donato *et al.*, 2009). A produção equilibrada dos fatores vasoativos ocorre por meio da liberação de potentes substâncias vasorelaxantes que regulam o tônus vascular, como o óxido nítrico (NO), o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), bem como pela liberação de fatores vasoconstritores, tais como endotelina (ET-1) e o tromboxano (TXA<sub>2</sub>) (Sandoo *et al.*, 2010). A ativação desses fatores nas células endoteliais depende da concentração intracelular de íons cálcio e o estrogênio parece ser capaz de elevar a concentração intracelular desse íon nessas células por meio da ativação rápida da fosfolipase C (PLC), com consequente formação dos segundos mensageiros inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG), no qual provoca a liberação de cálcio de seus depósitos intracelulares (Le Mellay *et al.*, 1997) ou por ativação direta de canais para potássio ativados por cálcio (Kca) na membrana dessas células o que levaria a hiperpolarização com resultante aumento do influxo de cálcio (Rusko *et al.*, 1995).

O relaxamento dependente do endotélio vascular em resposta ao estrogênio é geralmente atribuído à interação com fatores endoteliais (Bhuiyan *et al.*, 2007; Loyer *et al.*, 2007). O estrogênio possui uma forte ligação com o NO (Weiner *et al.*, 1994; White *et al.*, 1995), uma das moléculas de sinalização mais importante na regulação do tônus vascular (Félétoú & Vanhoutte, 2009; Mutchler & Straub, 2015). A biossíntese do NO ocorre via clivagem da L-arginina e oxigênio molecular, é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) com participação de cofatores tais como tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>) e da forma reduzida do complexo nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (Förstermann, 2010; Mutchler & Straub, 2015). A liberação desse potente vasodilatador endotelial por estimulação do estrogênio ocorre por aumento da atividade e

expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (Khalil, 2013). Um dos possíveis mecanismos envolvidos nessa resposta é a ativação rápida da fosfatidilinositol-3-quinase/proteína quinase B (PI3k-Akt) e subsequente fosforilação da NO sintase tipo III (eNOS) (Haynes *et al.*, 2000; Simoncini *et al.*, 2000). Uma vez sintetizado, sua principal ação fisiológica está associada à ativação da guanilato ciclase citosólica solúvel (GCs) e consequente formação de 3'5' monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), bem como relaxamento da musculatura lisa vascular através dos canais para potássio (Bolotina *et al.*, 1994; Arnold *et al.*, 1977; Félétoú & Vanhoutte, 2000; Pacher *et al.*, 2007) e ainda atividade da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Gupta *et al.*, 1994).

No que diz respeito às ações induzidas pelo EDHF, o estrogênio promove relaxamento por meio do aumento de sua produção (Orshal & Khalil, 2004) que ativa canais para potássio ativados por cálcio de condutância intermediária ( $\text{IK}_{\text{Ca}}$ ) e/ou canais para potássio ativados por cálcio de baixa condutância ( $\text{SK}_{\text{Ca}}$ ) provocando hiperpolarização e consequente relaxamento do músculo liso vascular (MLV) (Zygmunt *et al.*, 1997; Chataigneau *et al.*, 1998). O EDHF é um conjunto de diferentes fatores vasorelaxantes produzidos no endotélio vascular a partir de diferentes fontes que compreendem a via dos ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) derivados do ácido araquidônico pela via da enzima citocromo P450 (CYP) (Campbell & Harder 2001; Huang *et al.*, 2004), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) que é formado a partir da dismutação do ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) cuja maior fonte nos vasos é proveniente da NADPH oxidase (NOX) (Münzel *et al.*, 1999; Matoba *et al.*, 2000; Lucchesi *et al.*, 2005), o íon potássio (Edwards *et al.*, 1998) e as junções comunicantes endoteliais (junções GAP) (Griffith & Taylor, 1999; Sandow & Hill, 2000), potenciais agentes vasodilatadores em resposta ao estrogênio (Golding & Kepler, 2001).

Adicionalmente, o estrogênio possui efeito benéfico sobre a função endotelial por estimular a liberação da  $\text{PGI}_2$ , principal metabólito da enzima ciclooxygenase (COX) (Álvarez *et al.*, 2002; Sherman *et al.*, 2002). A  $\text{PGI}_2$  é formada a partir do ácido araquidônico, que é um metabólito da ação da fosfolipase  $\text{A}_2$  ( $\text{PLA}_2$ ) sobre os fosfolípidios de membrana (Chang *et al.*, 1987). O relaxamento vascular em resposta a  $\text{PGI}_2$  está geralmente associado à hiperpolarização das células do

músculo liso vascular (CMLV) podendo envolver a abertura de canais para potássio sensíveis a ATP ( $K_{ATP}$ ), ativados por cálcio de larga condutância ( $BK_{Ca}$ ), retificadores de influxo ( $K_{IR}$ ) e os ativados por voltagem ( $K_V$ ) (Félétou & Vanhoutte, 2006, 2009).

Além dos fatores vasodilatadores, as células endoteliais também liberam agentes vasoconstritores (Sandoo *et al.*, 2010). Em relação à ET-1, o efeito vasoconstritor ocorre por estimulação dos receptores  $ET_A$  e  $ET_{B2}$  presentes nas CMLV (Khalil, 2013). O estrogênio atenua a resposta vascular de constrição da ET-1 possivelmente via inibição da dinâmica de cálcio (Jiang *et al.*, 1992; Prakash *et al.*, 1999), redução da expressão da própria ET-1 ou ainda do seu receptor  $ET_{B2}$  (Khalil, 2013). O  $TXA_2$  por sua vez é sintetizado a partir do ácido araquidônico por ação da enzima tromboxano sintase e seu efeito vasoconstritor ocorre através dos receptores tromboxano-prostanóides (TP) presentes nas CMLV. De forma similar à ET-1, o estrogênio atenua o efeito vasoconstritor do  $TXA_2$  por meio da redução dos níveis intracelulares de cálcio no MLV (Sandoo *et al.*, 2010; Khalil, 2013).

Não obstante, o estrogênio também afeta o tônus vascular por mecanismos diretos sobre as CMLV através da inibição dos canais de cálcio do tipo L voltagem dependente (Crews & Khalil, 1999; Mazzuca *et al.*, 2015), atuando sobre os mecanismos de liberação intracelular de cálcio do retículo sarcoplasmático e entrada de cálcio a partir do espaço extracelular (Ruehlmann *et al.*, 1998). Os efeitos inibitórios sobre a mobilização de cálcio ocorrem por meio da redução na concentração intracelular desse íon desencadeada pelo antagonismo dos canais de cálcio (Sudhir *et al.*, 1995; Reslan & Khalil, 2012) e conseqüentemente relaxamento. E ainda, o estrogênio estimula diretamente a corrente de saída de potássio (White *et al.*, 1995; Rosenfeld *et al.*, 2000; Tepareenan *et al.*, 2003) com conseqüente hiperpolarização das CMLV, ao mesmo tempo, essa hiperpolarização modula a abertura de canais de cálcio do tipo L levando ao relaxamento do MLV (Valverde *et al.*, 1999).

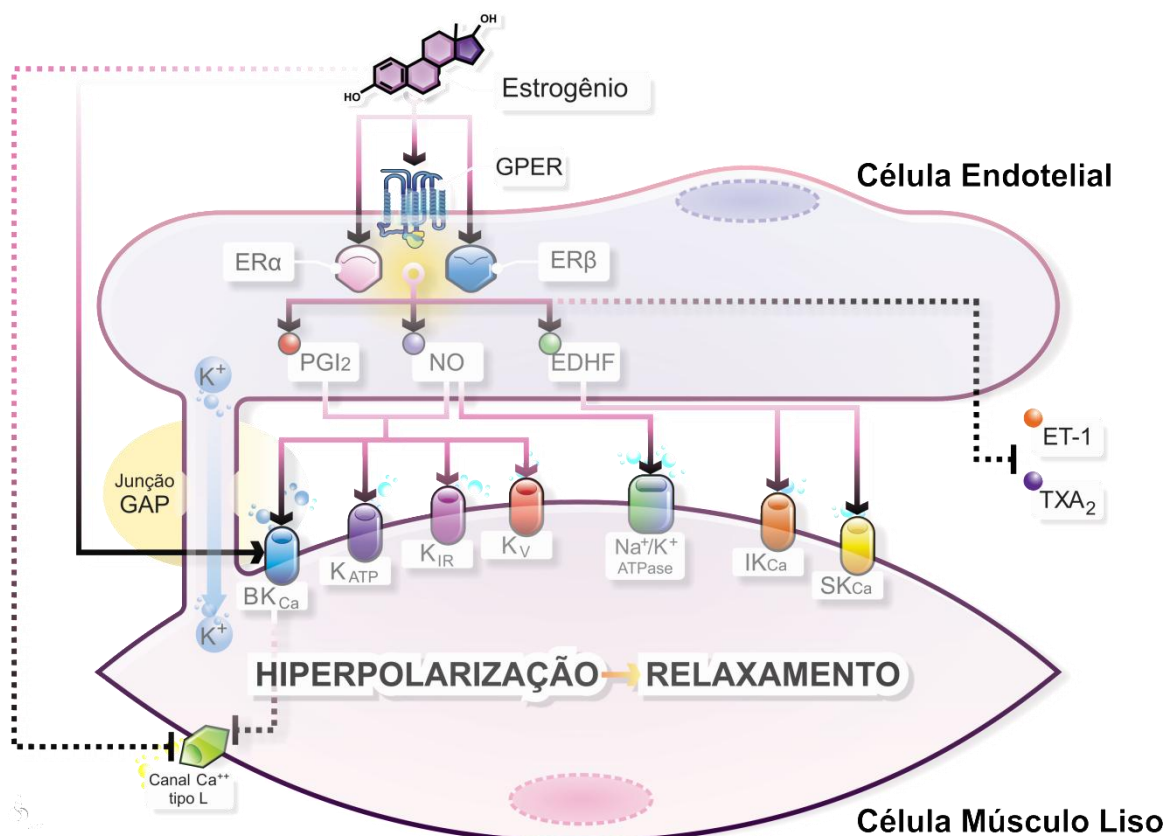


Figura 1: Vias de relaxamento vascular induzidas pelo estrogênio. Estrogênio se liga a ER $\alpha$ , ER $\beta$  ou GPER e provoca a liberação dos mediadores endoteliais (NO, PGI<sub>2</sub> e EDHF) que podem ativar canais para potássio, promovendo hiperpolarização e consequente relaxamento do MLV. O estrogênio também poderia inibir a liberação de ET-1 e TXA<sub>2</sub>, o que atenuaria a resposta vascular de constrição. No MLV, o estrogênio modula o tônico por mecanismos diretos, reduzindo a probabilidade de abertura dos canais de cálcio do tipo L voltagem dependente ou ativação de BK<sub>Ca</sub>, levando à hiperpolarização da membrana. BK<sub>Ca</sub>, canais para potássio ativados por cálcio de larga condutância; EDHF, fator hiperpolarizante derivado do endotélio; ER $\alpha$ , receptor de estrogênio alfa; ER $\beta$ , receptor de estrogênio beta; ET-1, endotelina; GPER, receptor de estrogênio acoplado a proteína G; MLV, músculo liso vascular; NO, óxido nítrico; PGI<sub>2</sub>, prostaciclina; TXA<sub>2</sub>, tromboxano (acervo do laboratório).

No entanto, o prejuízo no balanço entre a biodisponibilidade dos fatores endoteliais de relaxamento e consequente ação acentuada dos agentes vasoconstritores leva a dano na função vascular, processo caracterizado como disfunção endotelial e o estresse oxidativo pode interferir nesse mecanismo colaborando consequentemente com aumento do risco cardiovascular (Furchgott & Vanhoutte, 1989; Stankevičius *et al.*, 2003; Leung *et al.*, 2006; Qiao *et al.*, 2008). O processo de estresse oxidativo decorre de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa

antioxidante, sendo a NOX a principal enzima formadora de  $O_2^{\bullet-}$  na parede dos vasos (Arnal *et al.*, 1996; Münzel *et al.*, 1999; Cai & Harrison, 2000; Muller & Morawietz, 2009). As enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase) por sua vez atuam frente à produção de espécies reativas de oxigênio (ERO<sub>S</sub>) evitando seu acúmulo (Yu, 1994). Nesse contexto, é bem estabelecido que o estrogênio previne a disfunção endotelial por possuir propriedades antioxidantes que leva à regulação positiva da expressão e atividade de enzimas antioxidantes e potencialização da biodisponibilidade de NO com conseqüente redução na produção dos níveis de ERO<sub>S</sub> o que pode contribuir para um menor quadro de estresse oxidativo vascular (Wagner *et al.*, 2001; Strehlow *et al.*, 2003).

Assim, os estrógenos parecem desempenhar papel significativo sobre a função vascular que contribui para sua ação cardioprotetora tanto em mulheres (Barton & Meyer, 2009; Yang & Reckelhoff, 2011) quanto em homens (Hess, 2003; Dos Santos *et al.*, 2014; Hsu *et al.*, 2016). Esses hormônios podem ter sua ação mediada pela regulação da transcrição de genes ou via sinalização intracelular responsável pelos efeitos agudos do estrogênio (Meyer *et al.*, 2006; Meyer & Barton, 2009; Meyer *et al.*, 2011). Além dos receptores estrogênicos que medeiam as ações clássicas, ou seja, a ligação do estrogênio aos receptores intracelulares alfa (ER $\alpha$ ) e beta (ER $\beta$ ), um terceiro receptor de estrogênio acoplado a proteína G (GPER) tem sido apontado como um dos responsáveis pela via de sinalização intracelular que medeia efeitos agudos (extra-nucleares) do estrogênio (Revankar *et al.*, 2005; Lindsey *et al.*, 2013).

O terceiro receptor de estrogênio (GPER) foi identificado no final da década de 1990 como um receptor órfão, sem nenhum ligante conhecido, e assim nomeado primariamente como GPR30 (baseado no esquema de numeração sequencial para receptores órfãos) (Carmeci *et al.*, 1997; Takada *et al.*, 1997; Prossnitz & Arterburn, 2015). Posteriormente, GPR30 passou a ser designado de GPER, por possuir boa afinidade e induzir sinalização rápida em resposta a ligação do estrogênio (Alexander *et al.*, 2008). Este receptor pertence à família dos receptores acoplados à proteína G, está localizado no cromossomo 7 locus 22, é composto por três éxons, apresenta um peso molecular de aproximadamente 38

KDa e possui 375 aminoácidos (Mizukami, 2010). Com relação à localização celular deste receptor, existe descrição na membrana plasmática (Funakoshi *et al.*, 2006), na membrana do retículo endoplasmático e do aparelho de Golgi (Revankar *et al.*, 2005; Sakamoto *et al.*, 2007) possivelmente devido ao processo de endocitose após estimulação (Cheng *et al.*, 2011).

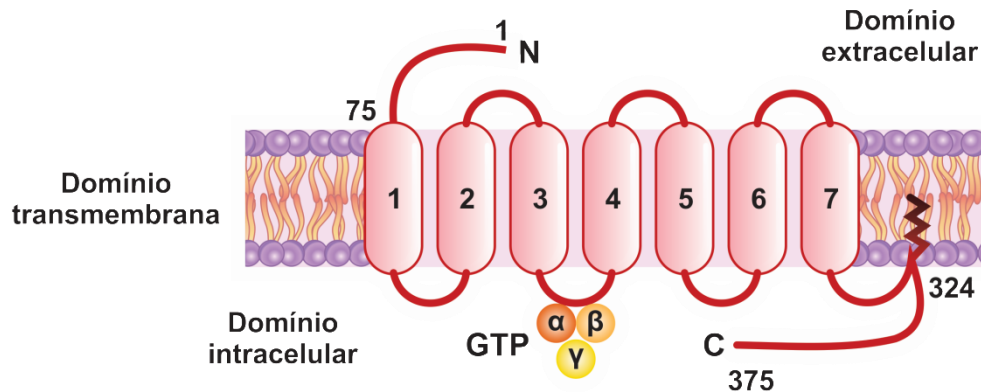


Figura 2: Estrutura molecular do GPER. GPER, receptor de estrogênio acoplado a proteína G (acervo do laboratório).

O GPER possui ampla distribuição sistêmica e mostra forte expressão especialmente no sistema cardiovascular, sugerindo papel fisiológico na regulação da função vascular e miocárdica (Deschamps & Murphy 2009; Filice *et al.*, 2009; Haas *et al.*, 2009; Jessup *et al.*, 2010; Meyer *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2012), o que torna os efeitos do estrogênio mais complexos (Prossnitz & Barton, 2014). Não obstante, estudos experimentais de imunorreatividade mostraram que o GPER é expresso nas células endoteliais e do MLV de artéria carótida de rato de ambos os sexos e aorta de rato, bem como em artéria mamária e veia safena humana. Sendo assim, a expressão do GPER se dá ao longo da parede arterial e agonistas desse receptor poderiam provocar relaxamento dependente e independente do endotélio (Arefin *et al.*, 2014). E ainda, as ações do GPER têm sido associada a ativação de vias de sinalização rápidas como quinase regulada por sinais extracelulares (ERK 1/2) (Filardo *et al.*, 2000), PI3k-Akt (Meyer *et al.*, 2014) e geração de 3'5' monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) (Filardo *et al.*, 2002). Ademais, vários grupos têm relacionado a ativação do GPER com efeitos cardiovasculares benéficos em modelos animais, como

redução da pressão sanguínea (Lindsey *et al.*, 2009), manutenção da glicemia (Martensson *et al.*, 2009) e proteção contra aterosclerose (Meyer *et al.*, 2014).

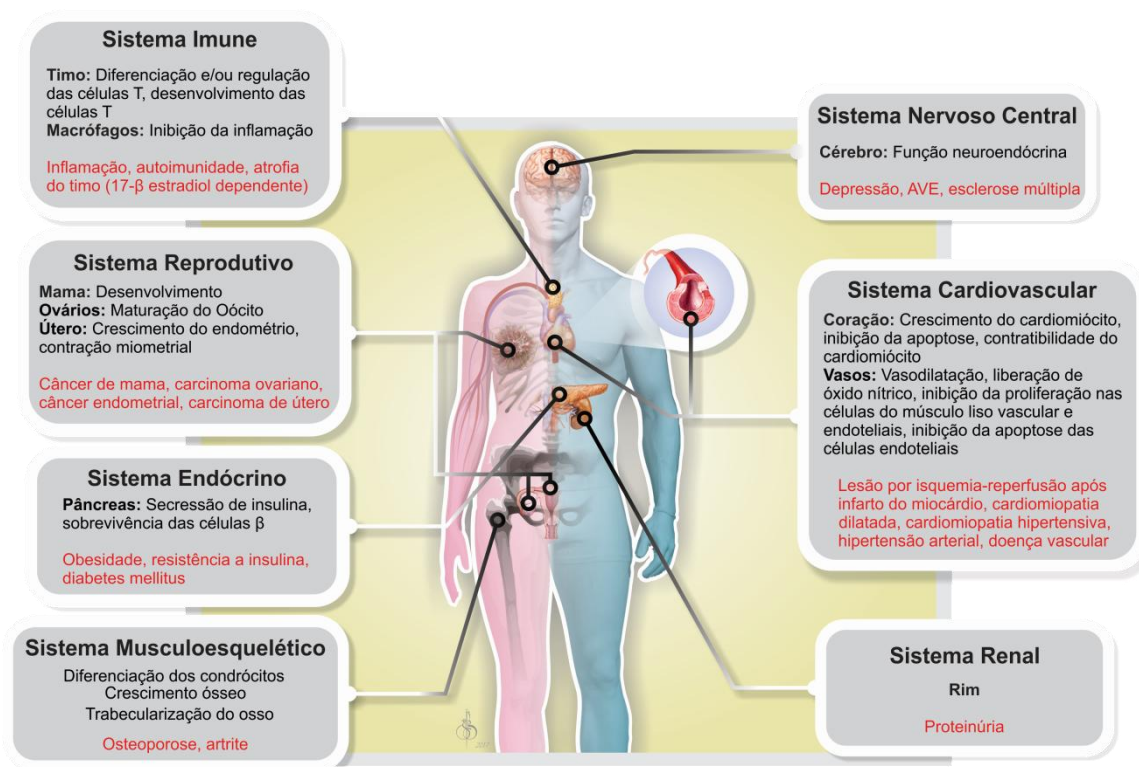


Figura 3: Ações do GPER em condições fisiológicas (mostrada em preto) e patológicas (mostrada em vermelho) em ambos os sexos. GPER, receptor de estrogênio acoplado a proteína G (adaptado de Prossnitz & Barton, 2014).

Terapias que envolvem compostos em esquema de reposição capazes de oferecer benefícios semelhantes ao estrogênio, sem os efeitos secundários indesejáveis da terapia de reposição hormonal clássica têm despertado interesse, dentre eles: fitoesteróides (Dos Santos *et al.*, 2016), tibolona (De Medeiros *et al.*, 2012), moduladores seletivos de receptor de estrogênio, tais como o tamoxifeno e raloxifeno (Borgo *et al.*, 2011; Romero *et al.*, 2012; Lamas *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2015), principalmente por se tratar de um possível fator protetor contra o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Dentre esses compostos farmacológicos, destaca-se o G-1, a mais recente alternativa utilizada nas pesquisas experimentais sobre reposição hormonal (Bologa *et al.*, 2006; Nilsson *et al.*, 2011).

O G-1 foi o primeiro agonista seletivo do GPER descrito (Bologa *et al.*, 2006) como ligante específico e de alta afinidade em relação a esse receptor com pouca ou nenhuma ligação a ER $\alpha$  ou ER $\beta$  (Revankar *et al.*, 2005). Os efeitos desse agonista como vasodilatador foram determinados na aorta (Lindsey *et al.*, 2009), artéria carótida (Broughton *et al.*, 2010), artérias mesentéricas (Lindsey *et al.*, 2011a; Lindsey *et al.*, 2013; Lindsey *et al.*, 2014), arteríolas intracerebrais (Murata *et al.*, 2013), artérias uterinas (Tropea *et al.*, 2015), assim como, em artérias coronárias suínas (Meyer *et al.*, 2010) e nas artérias mamárias internas humanas (Haas *et al.*, 2007). Contudo, também foi constatado o efeito vasoconstritor do G-1 no rim isolado e perfundido de ratos, sugerindo ações bivalentes deste fármaco (Kurt & Buyukafsar, 2013).



Figura 4: Estrutura molecular do (A) estrogênio e (B) G-1. G-1, 1-[4-(6-bromobenzo[1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]quinolin-8-yl]-ethanone (acervo do laboratório).

Embora as ações do G-1 sobre a função vascular estão sendo exploradas, os reais e potenciais efeitos desse fármaco sobre o sistema cardiovascular ainda não foram totalmente esclarecidos. Além disso, são escassos os estudos que abrangem as diferenças sexuais relacionadas à ativação seletiva do GPER, principalmente em vasos de resistência, os mais importantes na regulação da homeostase vascular. Desse modo, fez-se necessário maiores avaliações experimentais a fim de melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na ativação do GPER em ambos os sexos.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta de relaxamento induzida pelo agonista seletivo de receptor de estrogênio acoplado a proteína G (GPER) em artérias mesentéricas de resistência de ratos normotensos de ambos os sexos.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as diferenças sexuais na ação induzida pelo G-1 em artérias mesentéricas de resistência;
- Verificar a participação do GPER na ação induzida pelo G-1;
- Verificar a modulação dos receptores estrogênicos clássicos (ER $\alpha$ /ER $\beta$ ) na ação induzida pelo G-1;
- Verificar a participação do endotélio na resposta de vasorelaxamento induzida pelo agonista seletivo do GPER;
- Avaliar a contribuição dos mediadores endoteliais na ação induzida pelo G-1 mediante a:
  - Inibição da síntese do óxido nítrico (NO);
  - Inibição da síntese de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>);
  - Inibição combinada da síntese de NO e PGI<sub>2</sub>;
  - Inibição da síntese do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF);
- Analisar a participação da via de sinalização rápida PI3k-Akt;
- Verificar a participação dos canais para potássio na ação induzida pelo G-1;
- Quantificar a expressão do GPER bem como das enzimas óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), catalase e superóxido dismutase (SOD) teciduais;

- Quantificar a produção de ânions superóxidos vascular;
- Quantificar a produção de peróxido de hidrogênio vascular;
- Avaliar a imunolocalização específica do GPER.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) adultos (10 - 12 semanas) de ambos os sexos fornecidos pelo biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram mantidos em ambiente com iluminação (ciclo claro-escuro de 12 h), temperatura (22 °C) e umidade (50 %) controladas e livre acesso à água e ração (ração padrão para biotérios, Purina Labina, SP – Brasil). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes de pesquisa biomédica para cuidado e uso de animais de laboratório, como indicado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (031/2015).

#### **3.2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS**

##### **3.2.1. Determinação da Fase do Ciclo Estral**

O ciclo estral das fêmeas foi monitorado por meio de esfregaços vaginais. As células epiteliais vaginais foram coletadas diariamente entre 08:00 h e 09:00 h e examinados por microscopia óptica conforme descrito por Marcondes *et al.* (2002) para identificação dos tipos de células presentes nas diferentes fases do ciclo estral. As fêmeas foram consideradas aptas para os protocolos experimentais quando estavam na fase do proestro, caracterizada por altos níveis de estrogênio, para evitar quaisquer influências provocadas pela variação hormonal em diferentes fases do ciclo (Dalle Lucca *et al.*, 2000). Os machos foram submetidos ao mesmo procedimento de pega diário, em horário semelhante, com o intuito de reproduzir o possível estresse sofrido pelas fêmeas.

##### **3.2.2. Reatividade Vascular**

Os animais foram sacrificados por decapitação, sem utilização de anestésicos, a fim de evitar a interferência nos padrões de resposta (Hatano *et al.*, 1989) e tiveram as artérias mesentéricas de terceira ordem identificadas, isoladas e dissecadas dos tecidos circundantes não vasculares. Os segmentos arteriais

foram seccionados em anéis de 2 mm e montados entre dois fios de tungstênio (40  $\mu\text{m}$  de diâmetro) dentro de câmaras do miógrafo de resistência (Modelo 620M; Danish Myo Tecnologia, Aarhus, Dinamarca) preenchidas com solução de Krebs (composição em mM): NaCl (119), KCl (4.7),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.4),  $\text{NaHCO}_3$  (14.9),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1.17),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (2.5) e glicose (5.5) a 37 °C e gaseificada com mistura carbogênica (5 %  $\text{CO}_2$  e 95 %  $\text{O}_2$ ), como descrito por Mulvany & Halpern (1977). A circunferência interna foi normalizada para 0,9-IC100, onde os anéis foram gradualmente estirados até que o diâmetro interno correspondesse a uma pressão transmural de 100 mmHg. A viabilidade e integridade do endotélio foram testadas em resposta a administração de acetilcolina (10  $\mu\text{M}$ , ACh), nos anéis previamente contraídos com fenilefrina (3  $\mu\text{M}$ , Phe). Os anéis foram considerados com endotélio intacto quando o relaxamento obtido foi > 50 % em resposta a ACh. Por outro lado, foram considerados sem endotélio vasos cujo relaxamento à ACh foi < 10 % após a remoção mecânica. As curvas concentração-resposta foram obtidas por adições cumulativas de G-1 (1 nM – 10  $\mu\text{M}$ ; Azano Pharmaceuticals, Albuquerque, NM–USA) ou veículo (dimetilsulfóxido – DMSO) após prévia contração com 3  $\mu\text{M}$  Phe. O efeito vasodilatador do agonista foi estudado na ausência e na presença de endotélio e dos inibidores  $\text{N}^\omega$ -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, inibidor da NOS, 300  $\mu\text{M}$ ; Sigma, St. Louis, MO – USA), indometacina (INDO, inibidor da COX, 10  $\mu\text{M}$ ; Sigma, St. Louis, MO – USA), L-NAME (300  $\mu\text{M}$ ) associado a INDO (10  $\mu\text{M}$ ), clotrimazol (inibidor inespecífico da CYP, 0.75  $\mu\text{M}$ ; Sigma, St. Louis, MO – USA), LY-294,002 (inibidor da PI3k-Akt, 2.5  $\mu\text{M}$ ; Sigma, St. Louis, MO – USA), tetraetilamônio (TEA, bloqueador inespecífico de canais para  $\text{K}^+$ , 5 mM; Sigma, St. Louis, MO – USA), G36 (antagonista específico do GPER, 1  $\mu\text{M}$ ; Azano Pharmaceuticals, Albuquerque, NM– USA), ou ICI 182,780 (antagonista do  $\text{ER}\alpha$  e  $\text{ER}\beta$ , 1  $\mu\text{M}$ ; Sigma, St. Louis, MO – USA) incubados 30 minutos antes da curva concentração-resposta de G-1. A porcentagem de relaxamento foi determinada usando o sistema de aquisição de dados LabChart 8 (AD Instruments Pty Ltd, New South Wales, Austrália).

### 3.2.3. Western Blot

O leito mesentérico foi dissecado e as artérias de resistência foram removidas e livres do tecido conectivo e adiposo. Após a dissecação, as artérias foram

congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posterior homogeneização na presença de tampão de lise (NaCl 150 mmol/L; Tris 50 mmol/L; EDTA.2Na 5 mmol/L;  $\text{MgCl}_2$  1 mmol/L) acrescido de 0,3 % de Triton X-100, 0,5 % de SDS e de *cocktail* de inibidores de proteases (SigmaFast®, Sigma), na proporção de 25 mg de tecido para 100  $\mu\text{l}$  de tampão de lise enriquecido com o *cocktail* de inibidores de proteases. Para se evitar a desfosforilação dos resíduos de aminoácidos avaliados, foram acrescidos ao tampão de lise inibidores de fosfatase (NaF 20 mM;  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  0,1 mM e PMSF 0,1 mM). Após o processamento, as amostras foram centrifugadas a 7200x g por 10 minutos. O sobrenadante foi aliqotado e congelado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posterior utilização.

A determinação de proteína total das amostras foi mensurada de acordo com o método de Bradford (Bradford, 1976) com algumas modificações (Reagente de Bradford, Sigma®, número de catálogo B6916). As amostras foram diluídas em tampão da amostra (4X tris HCl/SDS, pH = 6.8, 3 % Glycerol, 1 % SDS, 0.6 % b-mercaptoetanol, 0,012 % Azul de Bromofenol) e aquecidas a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Para separação, foram aplicados 30  $\mu\text{g}$  de proteína em gel de SDS-PAGE (sodium dodecyl (lauryl) sulfato-poliacrilamida) a 10 %. Após serem separadas no gel de poliactilamida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Millipore®, USA) com poro de 0,45  $\mu\text{m}$ . A qualidade da transferência foi monitorada através da coloração da membrana com solução de Ponceau 0,3 %. A membrana foi então lavada em água destilada e colocada por 4 horas em solução de bloqueio (TBS-Tween 0,1 % mais 3 % de albumina). Após o bloqueio, a membrana foi incubada *overnight* em câmara fria ( $6-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), com o anticorpo primário específico diluído em 1,5 % de albumina em TBS-Tween. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-GPER (policlonal feito em coelho; diluição de 1:1000), anti-catalase (policlonal feito em coelho; diluição de 1:1000), anti-SOD-1 (policlonal feito em coelho; diluição de 1:1000), anti-SOD-2 (policlonal feito em coelho; diluição de 1:1000), anti-eNOS (monoclonal feito em camundongo; diluição de 1:1000), anti-phospho-eNOS-Ser1177 (1:500; policlonal feito em cabra; Santa Cruz Biotechnology Inc - Santa Cruz, CA, EUA) e anti- $\beta$ -actina (monoclonal feito em camundongo; diluição de 1:3000). Em seguida, a membrana foi lavada com TBS contendo 0.1 % de Tween 20 (TBS-T) por 5 minutos (por três vezes) e incubada por duas horas

com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP) (1:10000, anti-cabra IgG-HRP, anti-coelho IgG-HRP e anti-camundongo IgG-HRP, Millipore, Massachusetts, EUA) diluído em 2 % de albumina em TBS-Tween. Após o período de incubação a membrana foi novamente lavada em TBS-T (5 minutos por quatro vezes). As bandas proteicas foram detectadas por uma reação de quimioluminescência (*kit* ECL plus – Amersham Biosciences do Brasil Ltda) e a intensidade das mesmas foi avaliada por análise densitométrica através do software ImageQuant TL 8.1 (GE company, UK). Foram utilizados o sistema Mini Protean III-Tetracell e Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BIORAD®, CA, USA).

#### **3.2.4. Dihidroetídio – DHE**

Após realização dos cortes de mesentérica, as lâminas foram incubadas com a sonda dihidroetidina (DHE; Invitrogen), que é permeável à membrana celular. É postulado que o DHE reage com o superóxido e forma dois produtos fluorescentes, etídio e 2-hidroxi-etídio que se intercalam com o DNA da célula e podem ser visualizados com a fluorescência vermelha. Sendo assim, através de um microscópio de fluorescência com comprimentos de onda de excitação e emissão de 518 e 605 nm, respectivamente, esta sonda é utilizada como um marcador indireto da presença desta espécie reativa (Fernandes *et al.*, 2007).

O protocolo foi realizado de acordo com Silva *et al.* (2016), com algumas modificações. Brevemente, foram incubadas 4 lâminas para cada animal (fêmea ou macho) ao abrigo da luz. A primeira lâmina foi incubada com DHE (5 µM) por 30 minutos, em 37 °C, para investigar a produção basal de superóxido. A segunda lâmina foi incubada com DHE + G-1 (10 µM) pelo mesmo tempo, para investigar se a incubação com o agonista do receptor de estrógeno induzia alteração na produção de superóxido. A terceira lâmina foi incubada com tyron (1 mM) por 30 minutos, antes de passar por nova incubação com DHE + G-1 (10 µM), sendo um controle de que a fluorescência observada era proveniente do ânion superóxido. A quarta e última lâmina era incubada apenas com o G-1, para observar se este produto produzia alguma fluorescência.

Imagens digitais foram obtidas na objetiva de 63x, usando o microscópio de fluorescência Zeiss Axio Imager com módulo Apotome do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do ICB/UFMG. As imagens foram analisadas no programa Image J 1.48, usando a função de análise de densidade óptica de fluorescência da área de interesse (ROI manager). Dez áreas de interesse foram selecionadas em cada corte analisado, sendo que 5 cortes de cada animal foram analisados. Um número amostral de cinco animais por grupo experimental foi utilizado.

### **3.2.5. Diclorofluoresceína – DCF**

A análise da produção de  $H_2O_2$  em cortes de artéria mesentérica através da microscopia de fluorescência foi realizada de maneira indireta, através da utilização das sonda 2',7' Diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCF-DA; Invitrogen). O DCF é uma sonda permeável à membrana celular e não fluorescente. Entretanto, na presença de espécies reativas, especialmente o  $H_2O_2$ , este composto é oxidado no interior da célula e produz um composto fluorescente, 2', 7'- diclorofluoresceína (DCF) que permanece intracelular. Os comprimentos de onda de excitação e emissão utilizados foram de 480 e 530 nm, respectivamente.

O protocolo foi realizado de acordo com Somberg *et al.* (2016), com algumas modificações. Brevemente, foram incubadas 4 lâminas para cada animal (fêmea ou macho) ao abrigo da luz. A primeira lâmina foi incubada com DCF (10  $\mu$ M) por 30 minutos, em 37 °C, para investigar a produção basal de  $H_2O_2$ . A segunda lâmina foi incubada com DCF + G-1 (10  $\mu$ M) pelo mesmo tempo, para investigar se a incubação com o agonista do receptor de estrógeno induzia alteração na produção de  $H_2O_2$ . A terceira lâmina foi incubada com catalase (1000 UI/ml), sendo um controle de que a fluorescência observada era proveniente do  $H_2O_2$ . A quarta e última lâmina era incubada apenas com o G-1, para observar se este produto produzia alguma fluorescência.

Imagens digitais foram obtidas na objetiva de 63x, usando o microscópio de fluorescência Zeiss Axio Imager com módulo Apotome do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do ICB/UFMG. As imagens foram analisadas no

programa Image J 1.48, usando a função de análise de densidade óptica de fluorescência da área de interesse (ROI manager). Dez áreas de interesse foram selecionadas em cada corte analisado, sendo que 5 cortes de cada animal foram analisados. Um número amostral de cinco animais por grupo experimental foi utilizado.

### **3.2.6. Imunofluorescência**

A detecção por imunofluorescência do GPER foi realizada em cortes de artérias mesentéricas, de acordo com Aires *et al.* (2013) com algumas modificações. Para tal, as artérias foram cuidadosamente removidas, lavadas em PBS para remoção do excesso de sangue e embebidas em meio para congelamento de tecidos (Tissue-Tek optimum cutting temperature – OCT - compound, Sakura®). Posteriormente foram cortadas a 10 µm de espessura em um criostato (Minotome Plus, IEC). As lâminas com os cortes foram armazenadas em freezer -80 °C.

No dia da realização da imunofluorescência, as lâminas foram retiradas do freezer, e os cortes foram fixados com acetona PA gelada por 15 minutos seguido de permeabilização com 1 % albumina (BSA) + 0.3 % Triton X-100 em PBS, por 15 minutos. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com 3 % albumina (BSA) + 0.3 % Triton X-100 em PBS por 30 minutos. Após o bloqueio e a devida lavagem, os cortes foram incubados overnight com o anticorpo anti-GPER (1:100; monoclonal feito em coelho; Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz) em câmara fria e úmida. Após lavagens, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário específico marcado com o fluoróforo Alexa fluor-555 (1:500; goat anti-rabbit; Invitrogen) por 1,5 hora em câmara fria e ao abrigo da luz. Após lavagens, as lâminas receberam um meio de montagem (Fluorescent Mounting Media, Calbiochem) e foram cobertos com lamínula. Uma vez montadas, as lâminas foram analisadas em um microscópio de fluorescência Zeiss Axio Imager com módulo Apotome com excitação a 555 nm e emissão a 580 nm para detecção do Alexa flúor-555. A autofluorescência das artérias foi visualizada em verde.



As imagens adquiridas no microscópio de fluorescência foram processadas e analisadas pelo software ImageJ® 1.42q (Wayne Rasband, NIH). A intensidade de fluorescência dos vasos foi expressa em intensidade relativa de fluorescência (unidades arbitrárias). Foram analisados 16 campos por lâmina, sendo 8 na camada endotelial e 8 na camada de músculo liso vascular.

### 3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As curvas concentração-resposta foram analisadas por ANOVA duas vias seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni. Para comparação dos valores referentes a formação de espécies reativas de oxigênio foi utilizado ANOVA duas vias seguida do teste *post-hoc* de Tukey, e para as demais comparações foi utilizado teste *t de student* não pareado, ambos analisados via software (Graphpad Prism 6, La Jolla, CA –USA). O nível de significância estabelecido foi  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. REATIVIDADE VASCULAR EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RESISTÊNCIA

A influência do sexo sobre a resposta vascular mediada por GPER foi avaliada em segmentos arteriais isolados. O agonista GPER [G-1 (1 nM – 10  $\mu$ M)] foi capaz de induzir relaxamento concentração dependente em artérias mesentéricas de resistência tanto de fêmeas ( $77.3 \pm 2.0$  %) quanto de machos ( $78.2 \pm 2.6$  %), sem apresentar diferença entre os sexos (Fig. 5).

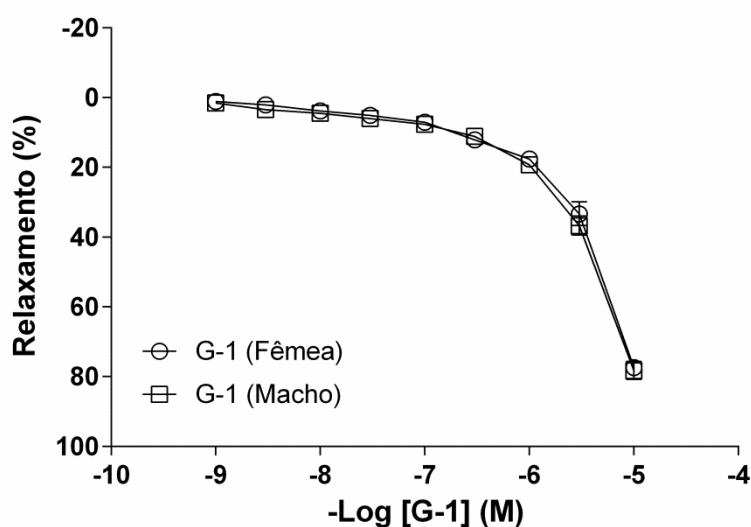


Figura 5: Curva concentração-resposta ao agonista seletivo do GPER [G-1 (1 nM – 10  $\mu$ M)] em artérias mesentéricas de resistência na ausência de inibidores [fêmeas (n=31) e machos (n=34)]. Os valores foram expressos com média  $\pm$  EPM.

A seletividade do agonista GPER foi testada na presença do inibidor seletivo G36 (1  $\mu$ M). O pré-tratamento com o antagonista específico do GPER reduziu o relaxamento de forma significativa, mas ainda manteve uma resposta residual (fêmea – F:  $40.3 \pm 5.8$  %; macho – M:  $33.1 \pm 2.6$  %) (Fig. 6A). Essa resposta possivelmente foi devido ao solvente (DMSO), uma vez que este causou pequeno relaxamento em ambos os grupos estudados quando foi administrado isoladamente como veículo (F:  $23.3 \pm 6.0$  %; M:  $24.1 \pm 1.4$  %) (Fig. 6C). Além disso, a especificidade do agonista G-1 foi confirmada na presença do antagonista do ER $\alpha$  e ER $\beta$  [ICI 182,780 (1  $\mu$ M)], o qual não alterou o

relaxamento induzido por G-1 em nenhum dos grupos (F:  $77.4 \pm 3.8$  %; M:  $74.7 \pm 6.6$  %) (Fig. 6B).

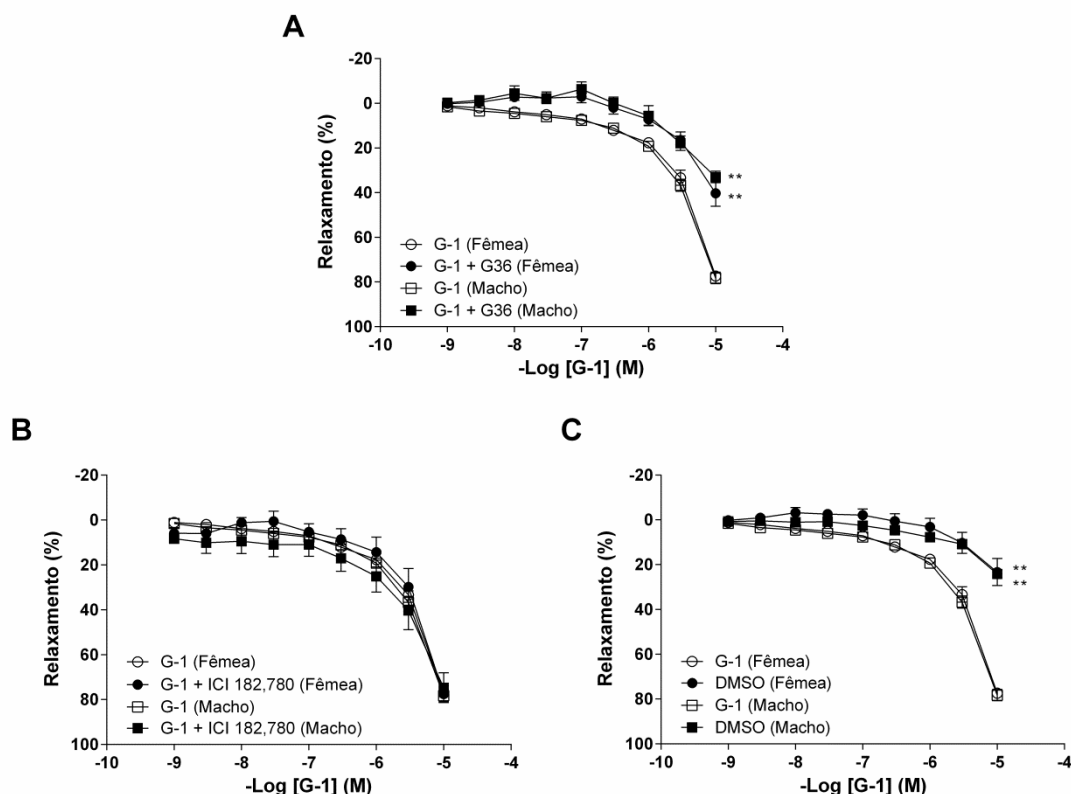


Figura 6: Curva concentração-resposta do agonista seletivo do GPER [G-1 (1 nM – 10  $\mu$ M)] em artérias mesentéricas de resistência (A) na presença do inibidor seletivo do GPER (G36 – 1  $\mu$ M) [fêmeas (n=8) e machos (n=8)], (B) na presença do inibidor do ER $\alpha$  e ER $\beta$  (ICI 182,780 – 1  $\mu$ M) [fêmeas (n=8) e machos (n=8)] e (C) resposta ao veículo (DMSO) [fêmeas (n=5) e machos (n=5)]. Os valores foram expressos com média  $\pm$  EPM. \*\* p < 0.01 vs curva obtida antes da inibição. Para a análise utilizou-se ANOVA duas vias seguida do teste *post hoc* de Bonferroni.

#### 4.1.1. Avaliação da resposta vasodilatadora dependente do endotélio

Para investigar a participação do endotélio no relaxamento induzido por G-1 em ambos os grupos, o endotélio das artérias foi removido. Na ausência do endotélio, a resposta ao G-1 produziu relaxamento reduzido tanto nas fêmeas ( $43.1 \pm 3.0$  %) quanto nos machos ( $63.3 \pm 4.9$  %). Entretanto, a resposta ao G-1 não foi abolida em ambos os grupos, indicando que este agonista também é capaz de agir sobre o MLV. Nas fêmeas, o relaxamento dependente do endotélio

parece ser mais acentuado (44.2 %), enquanto que os machos (19 %) parecem ser mais dependentes de mecanismos do MLV (Fig. 7).

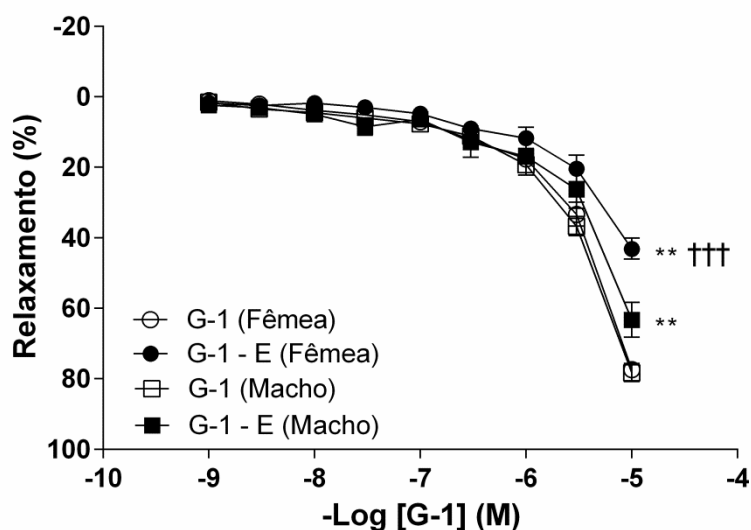


Figura 7: Efeito do agonista seletivo do GPER (1 nM – 10  $\mu$ M) na presença [fêmeas (n=31) e machos (n=34)] ou ausência [fêmeas (n=10) e machos (n=8)] do endotélio. Os valores foram expressos com média  $\pm$  EPM. \*\* p < 0.01 vs curva obtida antes da remoção do endotélio. ††† p < 0.001 vs macho após a remoção endotelial. Para a análise utilizou-se ANOVA duas vias seguida do teste *post hoc* de Bonferroni.

#### 4.1.2. Avaliação da participação dos mediadores endoteliais (NO, PGI<sub>2</sub> e EDHF)

Para avaliar quais mediadores endoteliais estariam envolvidos no relaxamento induzido pelo G-1 em artérias mesentéricas de resistência, investigamos a participação das principais vias de relaxamento (NO, PGI<sub>2</sub> e EDHF) nessa resposta (Fig. 8).

A modulação do NO sobre o relaxamento induzido pelo G-1 foi avaliada após inibição inespecífica da NOS (L-NAME – 300  $\mu$ M). Quando inibida a enzima NOS, observamos redução no efeito vasodilatador induzido por G-1 de forma semelhante em ambos os sexos (F: 46.1  $\pm$  5.4 %, M: 59.1  $\pm$  4.7 %; Fig. 8A). O papel dos prostanóides foi avaliado na presença do inibidor da ciclooxygenase (INDO, 10  $\mu$ M) e nenhum efeito sobre a resposta vasodilatadora do G-1 foi observado em ambos os grupos (F: 74.2  $\pm$  5.7 %, M: 75.2  $\pm$  6.4 %; Fig. 8B).

Ademais, com intuito de avaliar a participação de outro mediador endotelial além do NO e PGI<sub>2</sub>, isto é o EDHF, os anéis foram incubados concomitantemente com L-NAME e INDO. Essa inibição combinada atenuou o relaxamento quando comparado com a curva na ausência desses inibidores (F: 56.6 ± 5.8 %, M: 50.4 ± 5.3 %; Fig. 8C). Entretanto, essa resposta não foi diferente quando comparada com a inibição individual com L-NAME, indicando o NO como principal mediador dessa resposta em ambos os sexos. Além disso, testamos uma provável via relacionada ao EDHF, a via dos EETs (clotrimazol – 0.75 μM), e não observamos diferença no vasorelaxamento induzido pelo G-1 na presença desse inibidor (F: 77.0 ± 4.3 %; M: 71.4 ± 2.5 %) (Fig. 8D).

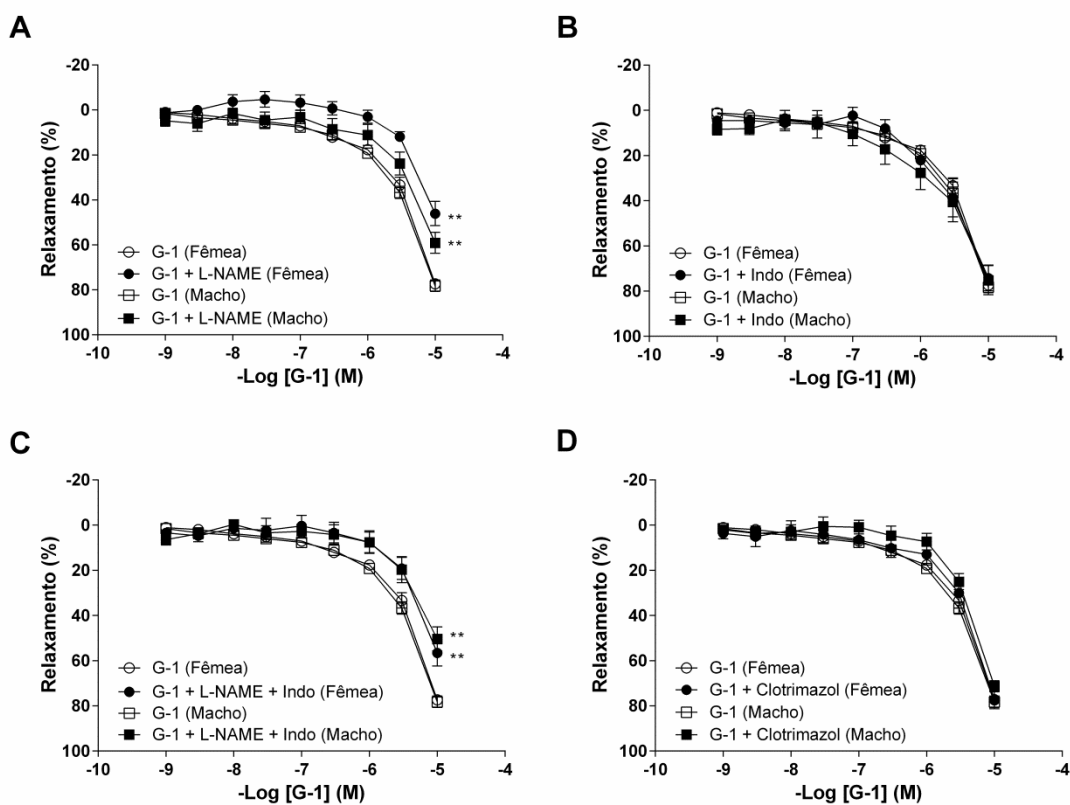


Figura 8: Participação dos mediadores endoteliais nos efeito vasodilatador do G-1 em artérias mesentéricas de resistência de ambos os sexos. Efeito da (A) inibição não seletiva da óxido nítrico sintase (NOS) com N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME – 300 μM) [fêmeas (n=8) e machos (n=10)], (B) inibição da ciclooxigenase (COX) com indometacina (INDO – 10 μM) [fêmeas (n=8) e machos (n=9)], (C) inibição combinada da NOS e COX com L-NAME + INDO [fêmeas (n=8) e machos (n=9)] e (D) inibição inespecífica da citocromo endotelial P450 (CYP) com clotrimazol (0.75 μM) [fêmeas (n=8) e machos (n=10)]. Os valores foram expressos com média ± EPM. \*\* p < 0.01 vs curva obtida antes da inibição. Para a análise utilizou-se ANOVA duas vias seguida do teste *post hoc* de Bonferroni.

#### 4.1.3. Avaliação da via de sinalização rápida PI3k-Akt

Buscando identificar o mecanismo envolvido na produção do NO mediado por GPER segmentos foram incubados na presença de LY-294,002 (2.5  $\mu$ M), um inibidor da via de sinalização rápida PI3k-Akt. Essa inibição reduziu a resposta vasodilatadora ao G-1 (F:  $58.8 \pm 2.2$  %, M:  $59.9 \pm 1.1$  %; Fig. 9). Esses resultados foram semelhantes aos obtidos com a curva após inibição individual com L-NAME, sugerindo ser esta a principal via envolvida na resposta relaxante mediada pelo GPER.

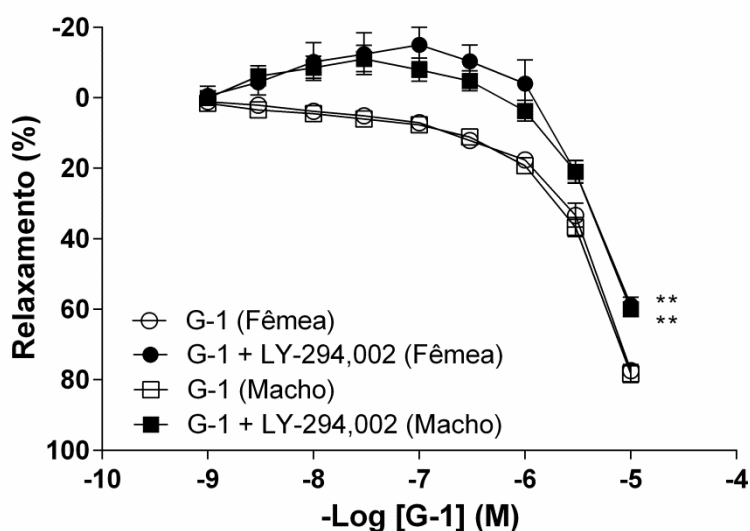


Figura 9: Participação da via de sinalização rápida PI3k-Akt (LY-294,002, 2.5  $\mu$ M) na resposta vasodilatadora do agonista seletivo do GPER em artérias mesentéricas de resistência de ambos os sexos [fêmeas (n=8) e machos (n=8)]. Os valores foram expressos com média  $\pm$  EPM. \*\*  $p < 0.01$  vs curva obtida antes da inibição. Para a análise utilizou-se ANOVA duas vias seguida do teste *post hoc* de Bonferroni.

#### 4.1.4. Avaliação da participação dos canais para K<sup>+</sup>

O papel dos canais para potássio na resposta vasodilatadora ao G-1 foi avaliado pelo bloqueio inespecífico desses canais. Na presença de TEA (5 mM), o relaxamento induzido por G-1 foi atenuado tanto em fêmeas ( $54.4 \pm 3.0$  %) quanto em machos ( $59.1 \pm 6.1$  %) (Fig. 10).

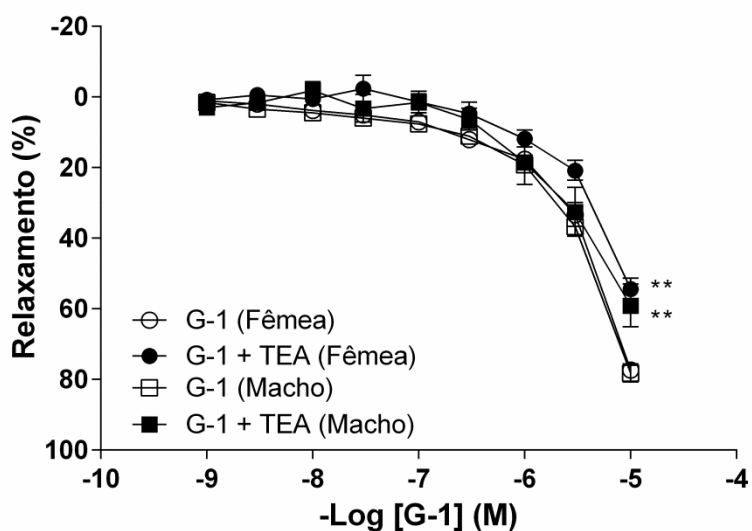


Figura 10: Efeito do bloqueio inespecífico de canais para potássio com tetraetilamônio (TEA, 5 mM) no relaxamento induzido por G-1 de artérias mesentéricas de resistência [fêmeas (n = 8) e machos (n = 9)]. Os valores foram expressos com média  $\pm$  EPM. \*\* p < 0.01 vs curva obtida antes da inibição. Para a análise utilizou-se ANOVA duas vias seguida do teste *post hoc* de Bonferroni.

## 4.2. EXPRESSÃO PROTEICA

### 4.2.1. Expressão proteica do GPER

Na avaliação da expressão proteica relativa do GPER em artérias mesentéricas de resistência a quantificação por meio da técnica de western blot revelou que os machos expressam quantidades significativamente maiores desse receptor em relação as fêmeas (F:  $0.37 \pm 0.05$ ; M:  $0.62 \pm 0.07$ ) (Fig. 11).

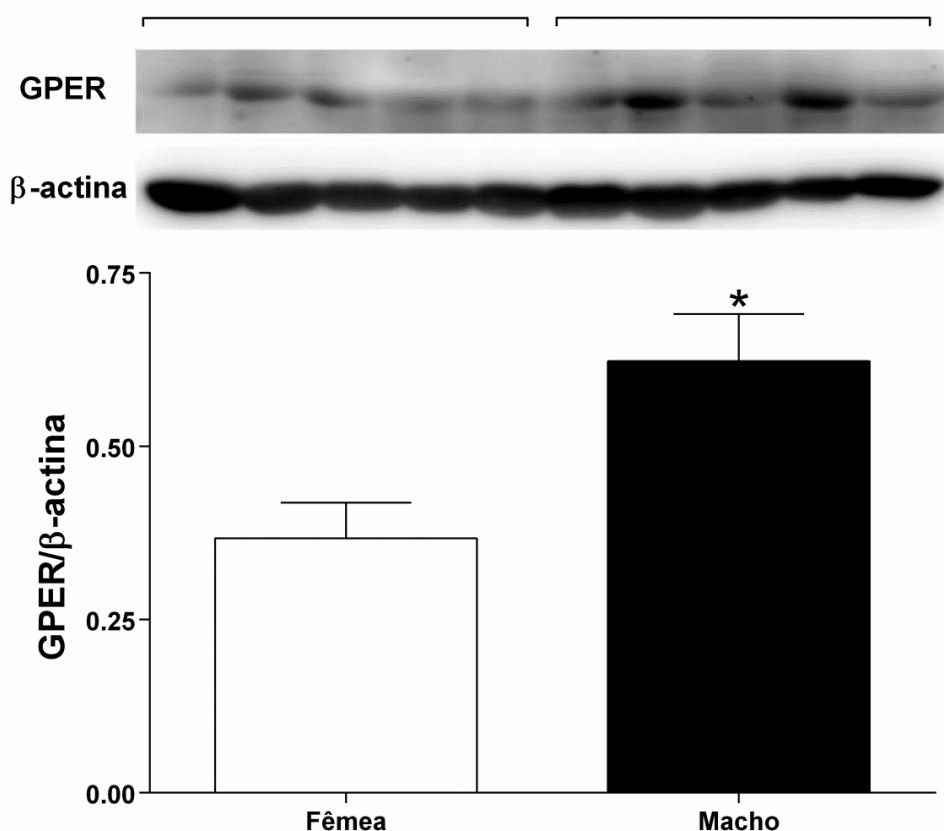


Figura 11: Análise representativa western blot com quantificação da expressão proteica relativa do GPER (38 kDa) normalizada pela  $\beta$ -actina (42 kDa) dos ramos vasculares de resistência do leito mesentérico em fêmeas (n=5) e machos (n=5). Os valores foram expressos com média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0.05$  vs fêmea. Para a análise utilizou-se teste *t de student* não pareado.



#### 4.2.2. Expressão proteica de enzimas antioxidantes (catalase, SOD-1 e SOD-2)

A expressão proteica das enzimas antioxidantes não mostrou diferença entre os grupos para as enzimas estudadas, sendo catalase (F:  $0.34 \pm 0.03$ ; M:  $0.42 \pm 0.03$ ), SOD-1 (F:  $0.56 \pm 0.03$ ; M:  $0.58 \pm 0.06$ ) e SOD-2 (F:  $0.58 \pm 0.03$ ; M:  $0.49 \pm 0.04$ ) (Fig.12).

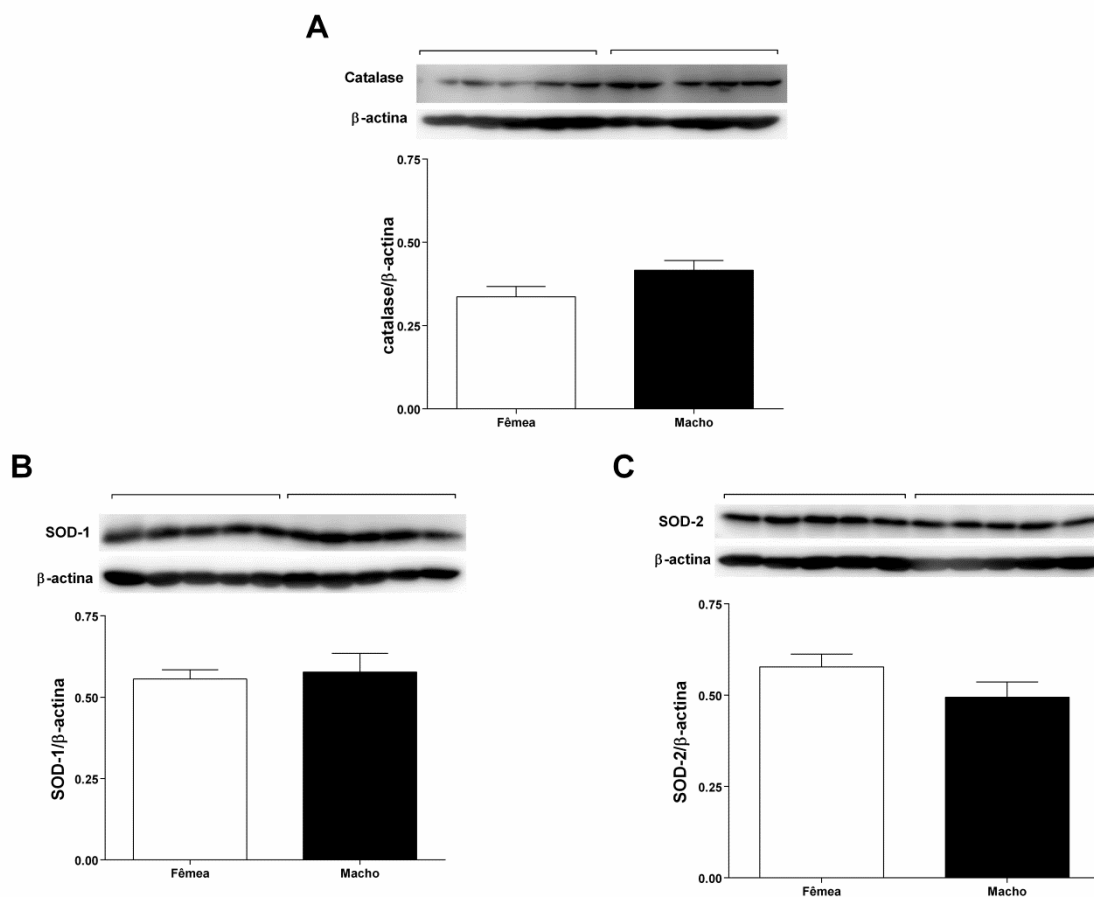


Figura 12: Análise representativa western blot com quantificação da expressão proteica relativa da (A) catalase (64 kDa), (B) SOD-1 (45 kDa) e (C) SOD-2 (51 kDa) normalizadas pela  $\beta$ -actina (42 kDa) dos ramos vasculares de resistência do leito mesentérico em fêmeas (n=5) e machos (n=5). Os valores foram expressos com média  $\pm$  EPM.

### 4.2.3. Expressão proteica da isoforma endotelial da óxido nítrico sintase (eNOS)

Na avaliação da expressão proteica da eNOS observamos que os grupos apresentaram quantidades similares da eNOS total (F:  $0.19 \pm 0.02$ ; M:  $0.26 \pm 0.05$ ) e phospho-ser1177-eNOS (F:  $0.55 \pm 0.12$ ; M:  $0.62 \pm 0.06$ ) (Fig. 13).

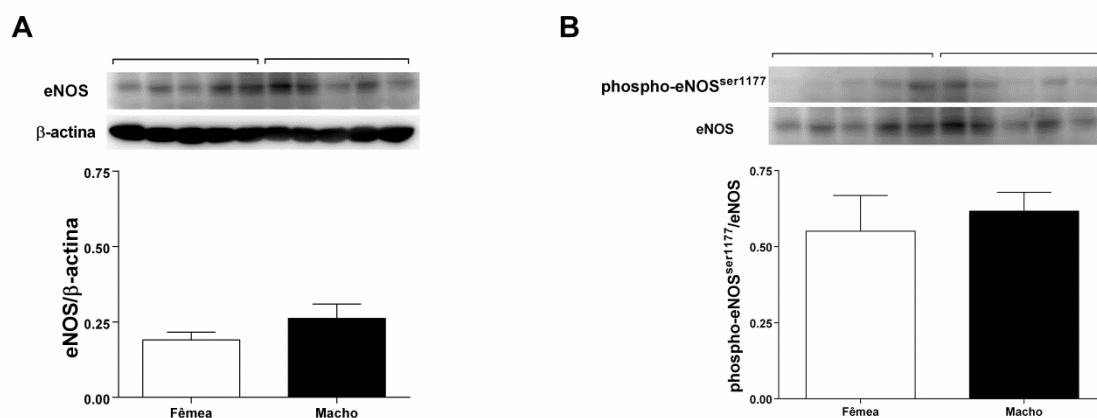


Figura 13: Análise representativa western blot com quantificação da expressão proteica relativa da (A) eNOS (135 kDa) e (B) eNOS fosforilada (140 kDa) normalizadas pela  $\beta$ -actina (42kDa) dos ramos vasculares de resistência do leito mesentérico em fêmeas (n=5) e machos (n=5). Os valores foram expressos com média  $\pm$  EPM.

### 4.3. MEDIDA DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs)

#### 4.3.1. Quantificação da produção de ânions superóxidos ( $O_2^{\bullet-}$ )

Em condições basais (ausência de estímulos), a análise da fluorescência produzida pela oxidação com dihidroetídio em artérias mesentéricas revelou similar produção de ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) em ambos os grupos. Da mesma forma, a fluorescência produzida após estimulação com G-1 não foi diferente. Na presença do inibidor (Tyron + G-1), um eliminador de superóxido, a fluorescência emitida foi reduzida. Além disso, o padrão de fluorescência produzido foi similar, tanto no basal quanto após estimulação com G-1, dentro do mesmo grupo (Fig. 14). O agonista GPER não foi capaz de emitir fluorescência quando utilizado sem a presença do dihidroetídio (dados não mostrados).

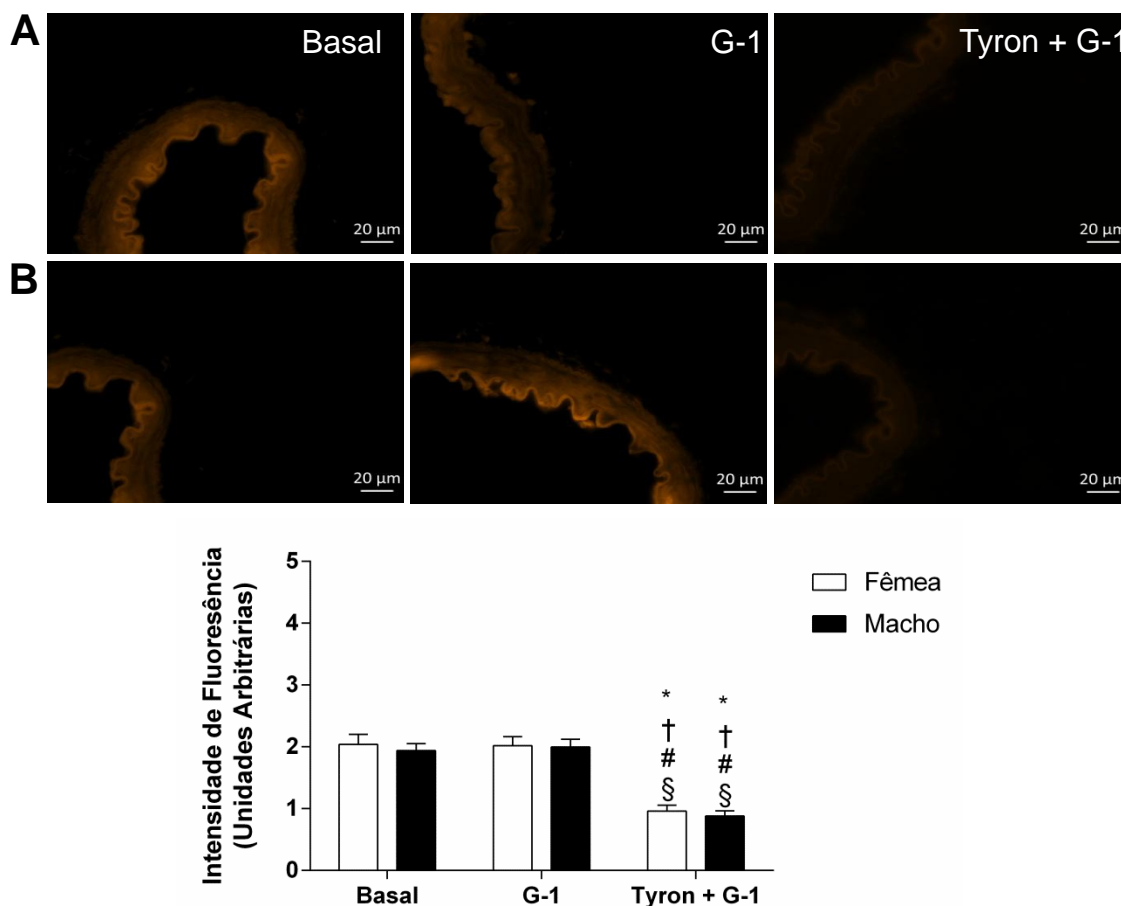


Figura 14: Análise representativa da microscopia de fluorescência emitida por dihidroetídio em artérias mesentéricas de (A) fêmeas (n=5) e (B) machos (n=5) na ausência ou presença de estímulos com quantificação da fluorescência produzida. Barra de escala = 20  $\mu$ m. Os valores foram expressos com média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0.05$  vs Fêmea basal.  $\dagger p < 0.05$  vs Macho basal.  $\# p < 0.05$  vs Fêmea G-1.  $\S p < 0.05$  vs Macho G-1. Para a análise utilizou-se ANOVA duas vias seguida do teste *post hoc* de Tukey.

### 4.3.2. Quantificação da produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Na ausência de estímulos (condições basais), a análise da fluorescência produzida pela oxidação com diclorofluoresceína em artérias mesentéricas revelou similar produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em fêmeas e machos. Da mesma forma, a fluorescência produzida após estimulação com agonista seletivo do GPER não foi diferente nos grupos estudados. Na presença do inibidor (Catalase + G-1), um decompositor de peróxido, a fluorescência emitida foi reduzida. Além disso, o padrão de fluorescência produzido foi similar, tanto no basal quanto após estimulação com G-1, dentro do mesmo grupo (Fig. 15). O agonista GPER não foi capaz de emitir fluorescência quando utilizado sem a presença da diclorofluoresceína (dados não mostrados).

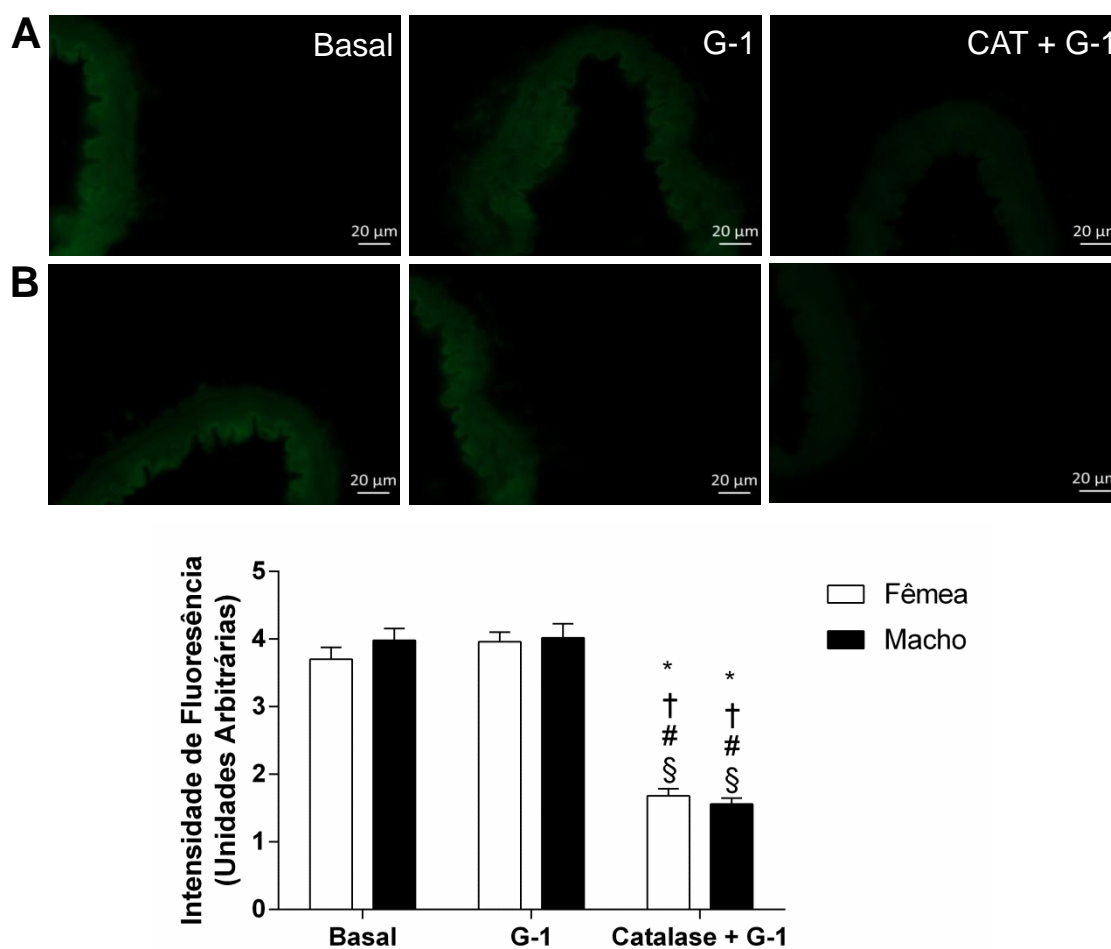


Figura 15: Análise representativa da microscopia de fluorescência emitida por diclorofluoresceína em artérias mesentéricas de (A) fêmeas (n=5) e (B) machos (n=5) na ausência ou presença de estímulos com quantificação da fluorescência produzida. Barra de escala = 20  $\mu$ m. Os valores foram expressos com média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0.05$  vs Fêmea basal. †  $p < 0.05$  vs Macho basal. #  $p < 0.05$  vs Fêmea G-1. §  $p < 0.05$  vs Macho G-1. Para a análise utilizou-se ANOVA duas vias seguida do teste *post hoc* de Tukey.

#### 4.4. IMUNOLocalização DO GPER

A microscopia de fluorescência foi realizada para avaliar a presença do GPER na parede vascular de artérias mesentéricas de resistência de ambos os sexos. Nas fêmeas, a imunocoloração para GPER foi vista com mais intensidade no endotélio, quando comparado ao MLV. Nos machos, entretanto, não houve diferença na fluorescência do receptor entre o endotélio e MLV (Fig. 16).

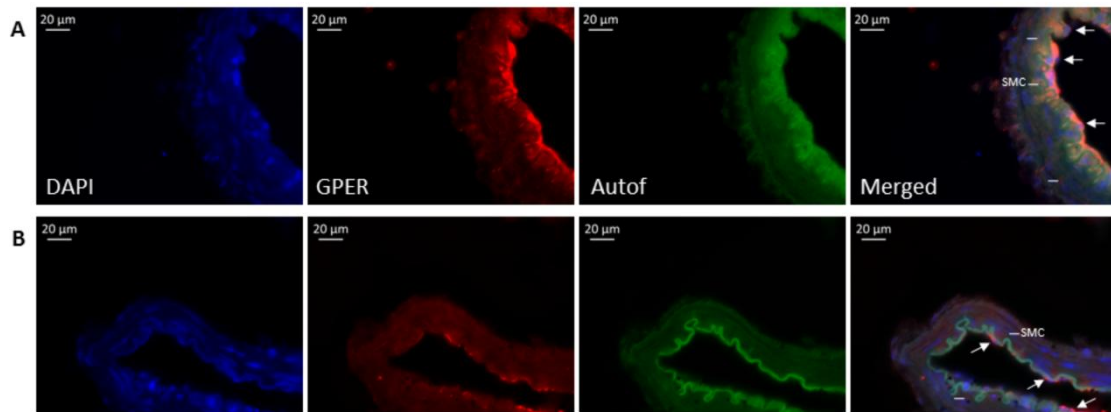


Figura 16: Imunodeteção do GPER em artérias mesentéricas de fêmeas (A; n=5) e machos (B; n=5). A imunolocalização para GPER é demonstrada tanto no endotélio (setas) como no músculo liso (traço). Barra de escala = 20 μm.

## 5. DISCUSSÃO

Nossos dados evidenciam que o relaxamento induzido pelo agonista seletivo do GPER em artérias mesentéricas de resistência não é influenciado pelo sexo, mas em parte, pela via PI3k-Akt-eNOS bem como pelos canais para potássio e, simultaneamente, demonstram a imunolocalização específica no endotélio e MLV assim como expressão proteica do GPER.

Os resultados deste estudo indicam que a ativação seletiva do GPER provoca relaxamento em artérias mesentéricas sem apresentar diferença entre fêmeas e machos. Embora Lindsey *et al.* (2013) tenham observado diferença sexual no relaxamento induzido por G-1 em artérias mesentéricas de ratos Lewis, nossos dados corroboram com estudos anteriores que não mostraram diferença na resposta mediada pelo GPER. De fato, Broughton *et al.* (2010) e Murata *et al.* (2013) não observaram diferenças sexuais em artérias carótidas e em arteríolas intracerebrais de ratos Sprague-Dawley, respectivamente, no relaxamento induzido por G-1, sugerindo que o efeito vasodilatador mediado pelo GPER não parece variar de acordo com o leito vascular, mas sim de acordo com a espécie estudada. Além disso, estudos têm demonstrado que o 17  $\beta$ -estradiol é capaz de promover relaxamento independente do sexo em artéria femoral (Kitazawa *et al.*, 1997), artéria aorta (Nilsson *et al.*, 2000) e no leito coronariano de ratos SHR (Santos *et al.*, 2010). Em geral, esses dados sugerem que mecanismos não-genômicos poderiam estar envolvidos no relaxamento desencadeado pelo estrogênio em ambos os sexos, uma vez que em todos estes estudos a ação do estrogênio ocorreu dentro de poucos segundos após a aplicação do hormônio.

Para melhor elucidar os mecanismos relacionados à resposta vascular, realizamos a quantificação da expressão proteica do GPER, uma vez que a variação na expressão vascular desse receptor entre os sexos poderia contribuir na reatividade (Lindsey *et al.*, 2013). De fato, a semelhante resposta de relaxamento induzida pelo G-1 observada em ambos os sexos provavelmente pode ser devido a maior expressão do GPER nas artérias mesentéricas do grupo macho, uma vez que os níveis circulantes de estrogênio são significativamente menores no sexo masculino (Hess *et al.*, 2003; Lindsey *et al.*, 2013). Em contraposição aos nossos dados, estudos mostram expressão do

GPER significativamente reduzida na veia cava inferior de ratos Sprague-Dawley (Raffetto *et al.*, 2010), ilhotas pancreáticas de ratos da estirpe NMRI (Balhuizen *et al.*, 2010), ilhotas pancreáticas humanas (Kumar *et al.*, 2011) e artérias mesentéricas de ratos mRen2.Lewis (Lindsey *et al.*, 2013). Por outro lado, outros estudos não apontam diferença sexual na expressão do GPER no hipocampo de ratos Sprague-Dawley com 10 semanas de idade (Matsuda *et al.*, 2008) e miocárdio de ratos dessa mesma linhagem (Deschamps & Murphy 2009). Apesar dos diferentes níveis de GPER, a expressão vascular reduzida desse receptor pode comprometer os efeitos benéficos do estrogênio relacionados a idade (Lindsey *et al.*, 2013), dessa forma, possivelmente a maior expressão do GPER observada nas artérias mesentéricas dos machos se configure em mecanismo que poderia justificar a resposta vascular similar às fêmeas.

O estresse oxidativo pode interferir na reatividade vascular pela interação com agentes vasoativos (Zou & Ulrich, 1996; Liu *et al.*, 2002; Förstermann, 2010). Em concordância com nossos estudos funcionais, não observamos diferença na quantificação da produção de ânions superóxidos e peróxido de hidrogênio assim como na expressão de enzimas antioxidantes, frequentemente relacionados ao prejuízo na resposta vasodilatadora quando em desequilíbrio (Mccord, 1993; Cai & Harrison 2000; Heitzer *et al.*, 2001; Landmesser *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2007b). De fato, as ações favoráveis dos estrógenos sobre o sistema vascular são bem conhecidas e contribuem para menor quadro de estresse oxidativo com consequente manutenção de um efeito vasodilatador dependente do endotélio (Nasr & Breckwoldt, 1998; Hassan & Abdel-Wahhab, 2012), sugerindo que agonistas de receptores de estrogênio poderiam promover o equilíbrio do efeito antioxidante por meio da regulação na formação de  $O_2^{\bullet-}$ , como já demonstrado para o 17  $\beta$ -estradiol (Lee *et al.*, 2005). Relatos prévios apontam uma relação entre a ativação do GPER e a redução de componentes do quadro de estresse oxidativo em diversos modelos como células endoteliais da veia umbilical humana (Kong *et al.*, 2014), túbulos renais de ratas mRen2.Lewis sensíveis ao sal (Lindsey *et al.*, 2011b) e no plasma de ratos Wistar (De Francesco *et al.*, 2016). Além disso, essa mesma ausência de diferença de gênero no que se refere a expressão de enzimas antioxidantes poderia ter contribuído para a resposta vasodilatadora similar mediada pelo

GPER. De fato, outros estudos também não relataram diferença na expressão de SOD-1 em artérias braquiais de porcos sedentários (Laughlin *et al.*, 2003) e SOD-1 e SOD-2 em artérias basílicas de ratos Sprague-Dawley (Miller *et al.*, 2007a) de ambos os sexos. Similarmente, não foram encontradas diferenças de gênero na atividade enzimática da SOD-1, SOD-2 e catalase no pulmão, rim e músculo esquelético de fetos de ovelhas aos 65 dias de gestação (Al-Gubory & Garrel, 2016). Por outro lado, Yao & Abdel-Rahman (2016) demonstraram que a ativação do GPER está associada a maior geração de EROs em ratas Sprague-Dawley ovariectomizadas e tratadas com etanol. Verificou-se também que ablação genética do GPER teve efeito benéfico sobre o surgimento de eventos cardiovasculares associados ao envelhecimento em camundongos knockout, reduzindo a formação de  $O_2^{\bullet-}$  pela NOX (Meyer *et al.*, 2016). Assim, a ação do GPER na regulação do menor quadro de estresse oxidativo parece ser paradoxal, indicando necessidade de exploração adicional para elucidar totalmente este potencial.

Tem sido demonstrado que os efeitos do agonista seletivo GPER sobre a reatividade vascular em ambos os sexos são o resultado do equilíbrio da ação sobre as células endoteliais e do músculo liso vascular (Murata *et al.*, 2013) inclusive em artérias mesentéricas (Lindsey *et al.*, 2011a; Lindsey *et al.*, 2014), o que sugere que o agonista GPER poderia provocar relaxamento de forma dependente do endotélio, bem como diretamente sobre o MLV. De fato, neste estudo a remoção do endotélio atenuou parcialmente o relaxamento induzido pelo G-1 em artérias mesentéricas de fêmeas e machos, mas não a aboliu, sendo essa resposta mais acentuada nas fêmeas. Isto sugere que a ativação do GPER em artérias mesentéricas de ambos os sexos é parcialmente mediada pelo endotélio, sendo as fêmeas mais dependentes desse mecanismo, similar ao que foi observado por Murata *et al.* (2013). O relaxamento remanescente após a inibição dos fatores de relaxamento endoteliais e bloqueio dos canais para potássio pode ter sido resultado da ação inibitória direta do G-1 sobre a mobilização de cálcio no MLV (Mata *et al.*, 2015), ação similar a do estrogênio (Crews & Khalil, 1999; Mazzuca *et al.*, 2015).



Consistente com os nossos resultados funcionais, a avaliação da imunolocalização do GPER indicou a presença deste receptor tanto no endotélio quanto no MLV de artérias mesentéricas em ambos os grupos. De fato, evidências sugerem que o GPER é expresso nas células endoteliais e do MLV de vários tecidos tanto em humanos quanto em animais de ambos os sexos (Haas *et al.*, 2007; Broughton *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012). Além disso, neste estudo os vasos das fêmeas apresentaram predominância do GPER no endotélio, enquanto que nos machos este receptor parece se distribuir de forma semelhante entre as células endoteliais e do MLV. A predominância do GPER no endotélio das fêmeas poderia explicar a menor resposta de relaxamento na ausência do mesmo, quando comparado com os machos em mesma condição indicando maior dependência das fêmeas em relação a esse mecanismo.

Uma vez identificada a participação do endotélio, nosso próximo passo foi avaliar a participação dos mediadores endoteliais nessa ação (NO, PGI<sub>2</sub> e EDHF). O estrogênio é capaz de induzir a liberação dos fatores vasoativos por meio do aumento da concentração intracelular de íons cálcio nas células endoteliais (Rusko *et al.*, 1995; Le Mellay *et al.*, 1997). Similarmente, Altmann *et al.* (2015) demonstraram que o G-1 é capaz de produzir rápido aumento na concentração intracelular de cálcio em células endoteliais de microvasos cerebrais de ratos, através dos canais de cálcio do tipo L, bem como promover hiperpolarização induzida pela ativação de canais de Kca, sugerindo que o GPER poderia modular os efeitos do estrogênio relacionados a mobilização intracelular do cálcio no endotélio. Observamos que na presença do L-NAME, a vasodilatação induzida pelo G-1 foi atenuada de forma semelhante em ambos os sexos. De fato, diversos estudos tem demonstrado a participação do NO como mediador do relaxamento após estimulação do GPER (Broughton *et al.*, 2010; Meyer *et al.*, 2010; Mata *et al.*, 2015; Tropea *et al.*, 2015), inclusive em artérias mesentéricas (Lindsey *et al.*, 2011a; Lindsey *et al.*, 2014). Portanto, os dados desses estudos em conjunto com os nossos indicam claramente que, pelo menos em parte, a ação vasodilatadora do GPER está ligada a liberação de NO. Oportunamente, pudemos observar ausência de diferença de gênero na expressão e atividade enzimática da eNOS, retratando a modulação do GPER sobre o NO vascular independente do sexo. Entretanto, Laughlin *et al.* (2003)

relataram diferença de gênero na expressão enzimática da eNOS em artérias braquiais e femorais suínas. Assim, nossos resultados fornecem evidências adicionais que sustentam a conclusão de Barber & Miller (1997) de que os mecanismos das diferenças de gênero na função vascular diferem por agonistas, espécies e origem anatômica da artéria.

Em contraste, o envolvimento de outros mediadores endoteliais na resposta induzida pelo G-1 não foi observado. A inibição individual com INDO não foi capaz de atenuar a resposta mediada pelo GPER em ambos os sexos, sugerindo que o agonista GPER pode promover relaxamento independente de PGI<sub>2</sub>, como tem sido previamente relatado (Lindsey *et al.*, 2014). Da mesma forma, a inibição dupla (L-NAME + INDO) revelou que o EDHF parece não participar do efeito vasodilatador pela ativação do GPER, uma vez que o efeito inibidor individual da NOS não foi modificado pela inibição concomitante da COX. Embora o EDHF seja definido como uma substância capaz de participar da resposta aguda de relaxamento induzido pelo 17  $\beta$ -estradiol, mesmo após a inibição combinada da NOS e COX (Santos *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2016), em nosso estudo após dupla inibição a resposta de relaxamento não foi alterada, sugerindo que o EDHF não é um importante mediador da vasodilatação induzida pelo G-1. De fato, Murata *et al.* (2013) também não observaram alteração no relaxamento mediado por GPER após o uso de inibidores da NOS e da COX. Em geral, estes dados implicam que a ativação do GPER não afeta componentes prostanoídes ou de EDHF de relaxamento, mas estimula a via do NO.

Buscando identificar qual o mecanismo molecular envolvido na liberação de NO induzido pelo G-1, realizamos a inibição da via de sinalização rápida associada a ativação da eNOS (PI3k-Akt) com o inibidor LY-294,002. Nossos resultados mostraram que o relaxamento induzido pelo G-1 foi atenuado na presença de LY-294,002, em fêmeas e machos. Estes resultados são indicativos de participação da via de sinalização rápida PI3k-Akt-eNOS na resposta de relaxamento mediada por GPER em ambos os sexos. De fato, a ativação da via PI3k-Akt por ação não-genômica tem sido relacionada a fosforilação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), resultando na produção e liberação de NO (Lee *et al.*, 2014; De Francesco *et al.*, 2013; Meyer *et al.*, 2014). Portanto, em

conjunto, esses dados sugerem fortemente que a liberação de NO induzida por G-1 seja proveniente de fonte endotelial, via eNOS.

Em nosso estudo, o bloqueio inespecífico dos canais para potássio atenuou o vasorelaxamento induzido por G-1 em ambos os grupos. Está bem estabelecido que o 17  $\beta$ -estradiol é capaz de agir modulando diretamente os canais para potássio (Valverde *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2016) e consequentemente causar vasorelaxamento. Entretanto, a contribuição dos canais para potássio para regulação do tônus vascular mediado por GPER tem sido pouco descrita e as informações que existem atualmente são controversas. Estudos prévios mostraram papel fundamental dos canais para potássio na resposta aguda de relaxamento mediado por GPER em células endoteliais de microvasos cerebrais de ratos (Altmann *et al.*, 2015), bem como no MLV de artéria coronária descendente anterior esquerda de suínos (Yu *et al.*, 2011). Em contraste, outro estudo relatou que os canais para potássio não participam da resposta dilatadora induzida por G-1 em artérias uterinas de fêmeas Sprague-Dawley (Tropea *et al.*, 2015). Assim, a participação dos canais para potássio na ação induzida pelo G-1 parece variar não apenas em relação ao leito vascular, mas também em relação a espécie estudada. Sugerimos com nossos resultados que o G-1 é capaz de exercer efeito modulatório sobre os canais para potássio em artérias mesentéricas de ambos os sexos, como demonstrado para ação do estrogênio nessas artérias (Tep-areenan *et al.*, 2003; Tsang *et al.*, 2003).

## 6. CONCLUSÃO

O relaxamento vascular induzido pelo G-1 em artérias mesentéricas de resistência não é influenciado pelo sexo e apresenta dependência parcial do endotélio em ambos os grupos, sendo essa dependência maior nas fêmeas, possivelmente pela maior presença do GPER no endotélio. Dentre os fatores endoteliais, o NO via ativação da PI3k-Akt-eNOS, bem como os canais para potássio parecem participar de maneira similar no relaxamento em ambos os sexos. Essas observações podem fornecer uma nova perspectiva para a compreensão dos mecanismos vasculares envolvidos nas respostas induzidas pelo estrogênio via GPER, que poderiam contribuir para o desenvolvimento de terapias que visam contrabalancear as alterações cardiovasculares que são observadas com a modificação na produção de hormônios sexuais.

## 7. REFERÊNCIAS

AIRES, R D et al. Paraquat poisoning induces TNF- $\alpha$ -dependent iNOS/NO mediated hyporesponsiveness of the aorta to vasoconstrictors in rats. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. 1-13, 2013.

ALEXANDER, S P H; MATHIE, A; PETERS, J A. Guide to receptors and channels (GRAC), 3rd edition. **British journal of pharmacology**, v. 153, n. S2, p. S1-S209, 2008.

ALTMANN, J B et al. G protein-coupled estrogen receptor-mediated effects on cytosolic calcium and nanomechanics in brain microvascular endothelial cells. **Journal of neurochemistry**, v. 133, n. 5, p. 629-639, 2015.

ÁLVAREZ, A et al. Estrogens inhibit angiotensin II-induced leukocyte-endothelial cell interactions in vivo via rapid endothelial nitric oxide synthase and cyclooxygenase activation. **Circulation research**, v. 91, n. 12, p. 1142-1150, 2002.

AL-GUBORY, K H & GARREL, C. Sex-specific divergence of antioxidant pathways in fetal brain, liver, and skeletal muscles. **Free radical research**, v. 50, n. 3, p. 366-373, 2016.

AREFIN, S et al. Vasodilatory effects of the selective GPER agonist G-1 is maximal in arteries of postmenopausal women. **Maturitas**, v. 78, n. 2, p. 123-130, 2014.

ARNAL, J F et al. Nitric oxide and superoxide anion production during endothelial cell proliferation. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 271, n. 5, p. C1521-C1526, 1996.

ARNOLD, W P et al. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3': 5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 8, p. 3203-3207, 1977.

BARBER, D A & MILLER, V M. Gender differences in endothelium-dependent relaxations do not involve NO in porcine coronary arteries. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 273, n. 5, p. H2325-H2332, 1997.

BARRETT-CONNOR, E & BUSH, T L. Estrogen and coronary heart disease in women. **Jama**, v. 265, n. 14, p. 1861-1867, 1991.

BARTON, M & MEYER, M R. Postmenopausal hypertension mechanisms and therapy. **Hypertension**, v. 54, n. 1, p. 11-18, 2009.

BALHUIZEN, A et al. Activation of G protein-coupled receptor 30 modulates hormone secretion and counteracts cytokine-induced apoptosis in pancreatic islets of female mice. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 320, n. 1, p. 16-24, 2010.

BHUIYAN, M D S; SHIODA, N; FUKUNAGA, K. Ovariectomy augments pressure overload-induced hypertrophy associated with changes in Akt and nitric oxide synthase signaling pathways in female rats. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 293, n. 6, p. E1606-E1614, 2007.

BOLOGA, C G et al. Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. **Nature chemical biology**, v. 2, n. 4, p. 207-212, 2006.

BOLOTINA, V M et al. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, p. 850-853, 1994.

BORGO, M V et al. Effect of tamoxifen on the coronary vascular reactivity of spontaneously hypertensive female rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 8, p. 786-792, 2011.

BRADFORD, M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BROUGHTON, B R S; MILLER, A A; SOBEY, C G. Endothelium-dependent relaxation by G protein-coupled receptor 30 agonists in rat carotid arteries. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 298, n. 3, p. H1055-H1061, 2010.

BUSH, T L. The epidemiology of cardiovascular disease in postmenopausal women. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 592, n. 1, p. 263-271, 1990.

CAI, H & HARRISON, D G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circulation research**, v. 87, n. 10, p. 840-844, 2000.

CAMPBELL, W B & HARDER, D R. Prologue: EDHF—what is it?. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 280, n. 6, p. H2413-H2416, 2001.

CARMECI, C et al. Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. **Genomics**, v. 45, n. 3, p. 607-617, 1997.

CHANG, J; MUSSER, J H; MCGREGOR, H. Phospholipase A2: function and pharmacological regulation. **Biochemical pharmacology**, v. 36, n. 15, p. 2429-2436, 1987.

CHATAIGNEAU, T et al. Epoxyeicosatrienoic acids, potassium channel blockers and endothelium-dependent hyperpolarization in the guinea-pig carotid artery. **British journal of pharmacology**, v. 123, n. 3, p. 574-580, 1998.

CHEN, Y et al. Testosterone replacement therapy promotes angiogenesis after acute myocardial infarction by enhancing expression of cytokines HIF-1 $\alpha$ , SDF-

1a and VEGF. **European journal of pharmacology**, v. 684, n. 1, p. 116-124, 2012.

CHENG, S B et al. Retrograde transport of the transmembrane estrogen receptor, G-protein-coupled-receptor-30 (GPR30/GPER) from the plasma membrane towards the nucleus. **Steroids**, v. 76, n. 9, p. 892-896, 2011.

CREWS, J K & KHALIL, R A. Antagonistic effects of 17 $\beta$ -estradiol, progesterone, and testosterone on Ca<sup>2+</sup> entry mechanisms of coronary vasoconstriction. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 19, n. 4, p. 1034-1040, 1999.

DALLE LUCCA, J J; ADEAGBO, A S O; ALSIP, N L. Influence of oestrous cycle and pregnancy on the reactivity of the rat mesenteric vascular bed. **Human Reproduction**, v. 15, n. 4, p. 961-968, 2000.

DANTAS, A P V et al. Influence of female sex hormones on endothelium-derived vasoconstrictor prostanoid generation in microvessels of spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 34, n. 4, p. 914-919, 1999.

DE FRANCESCO, E M et al. GPER mediates cardiotropic effects in spontaneously hypertensive rat hearts. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. 1-12, 2013.

DE FRANCESCO, E M et al. Protective role of GPER agonist G-1 on cardiotoxicity induced by doxorubicin. **Journal of Cellular Physiology**, 2016.

DE MEDEIROS, A R S et al. Tibolone has anti-inflammatory effects in estrogen-deficient female rats on the natriuretic peptide system and TNF-alpha. **Regulatory peptides**, v. 179, n. 1, p. 55-60, 2012.

DESCHAMPS, A M & MURPHY, E. Activation of a novel estrogen receptor, GPER, is cardioprotective in male and female rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 297, n. 5, p. H1806-H1813, 2009.

DONATO, A J et al. Role of NF $\kappa$ B in age-related vascular endothelial dysfunction in humans. **Aging (Albany NY)**, v. 1, n. 8, p. 678-680, 2009.

DOS SANTOS, R L et al. Sex hormones in the cardiovascular system. **Hormone molecular biology and clinical investigation**, v. 18, n. 2, p. 89-103, 2014.

DOS SANTOS, R L et al. Pomegranate peel extract attenuates oxidative stress by decreasing coronary angiotensin-converting enzyme (ACE) activity in hypertensive female rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 79, n. 21, p. 998-1007, 2016.

EDWARDS, G et al. K<sup>+</sup> is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. **Nature**, v. 396, n. 6708, p. 269-272, 1998.

FÉLÉTOU, M & VANHOUTTE, P M. Endothelium-dependent hyperpolarization of vascular smooth muscle cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 21, n. 1, p. 1-18, 2000.

FÉLÉTOU, M & VANHOUTTE, P M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor where are we now? **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 26, n. 6, p. 1215-1225, 2006.

FÉLÉTOU, M & VANHOUTTE, P M. EDHF: an update. **Clinical science**, v. 117, n. 4, p. 139-155, 2009.

FERNANDES, D C et al. Analysis of DHE-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 292, n. 1, p. C413-C422, 2007.

FILARDO, E J et al. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. **Molecular endocrinology**, v. 14, n. 10, p. 1649-1660, 2000.

FILARDO, E J et al. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. **Molecular endocrinology**, v. 16, n. 1, p. 70-84, 2002.

FILICE, E et al. A new membrane G protein-coupled receptor (GPR30) is involved in the cardiac effects of 17beta-estradiol in the male rat. **J Physiol Pharmacol**, v. 60, n. 4, p. 3-10, 2009.

FÖRSTERMANN, U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 459, n. 6, p. 923-939, 2010.

FUNAKOSHI, T et al. G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 346, n. 3, p. 904-910, 2006.

FURCHGOTT, R F & ZAWADZKI, J V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-376, 1980.

FURCHGOTT, R F & VANHOUTTE, P M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **The FASEB Journal**, v. 3, n. 9, p. 2007-2018, 1989.

GOLDING, E M & KEPLER, T E. Role of estrogen in modulating EDHF-mediated dilations in the female rat middle cerebral artery. **American Journal of Physiology**, v. 280, n. 2, p. H2417-H2423, 2001.

GRIFFITH, T M & TAYLOR, H J. Cyclic AMP mediates EDHF-type relaxations of rabbit jugular vein. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 263, n. 1, p. 52-57, 1999.



GUPTA, S et al. Role of endothelium-derived nitric oxide in stimulation of Na (+)-K (+)-ATPase activity by endothelin in rabbit aorta. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 266, n. 2, p. H577-H582, 1994.

HAAS, E et al. Differential effects of 17 $\beta$ -estradiol on function and expression of estrogen receptor  $\alpha$ , estrogen receptor  $\beta$  and GPR30 in arteries and veins of patients with atherosclerosis. **Hypertension**, v. 49, n. 6, p. 1358-1363, 2007.

HAAS, E et al. Regulatory role of G protein-coupled estrogen receptor for vascular function and obesity. **Circulation research**, v. 104, n. 3, p. 288-291, 2009.

HASSAN, H A & ABDEL-WAHHAB, M A. Effect of soybean oil on atherogenic metabolic risks associated with estrogen deficiency in ovariectomized rats. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 68, n. 2, p. 247-253, 2012.

HATANO, Y et al. The contractile responses of isolated dog cerebral and extracerebral arteries to oxybarbiturates and thiobarbiturates. **Anesthesiology**, v. 71, n. 1, p. 80-86, 1989.

HAYNES, M P et al. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. **Circulation research**, v. 87, n. 8, p. 677-682, 2000.

HEITZER, T et al. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. **Circulation**, v. 104, n. 22, p. 2673-2678, 2001.

HERON, M. Deaths: leading causes for 2010. **National vital statistics reports: from the Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System**, v. 62, n. 6, p. 1-96, 2013.

HESS, R A. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, n. 1, p. 1-14, 2003.

HSU, B et al. Temporal Changes in Androgens and Estrogens Are Associated With All-Cause and Cause-Specific Mortality in Older Men. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 101, n. 5, p. 2201-2210, 2016.

HUANG, A et al. Estrogen Elicits Cytochrome P450-Mediated Flow-Induced Dilation of Arterioles in NO Deficiency Role of PI3K-Akt Phosphorylation in Genomic Regulation. **Circulation research**, v. 94, n. 2, p. 245-252, 2004.

JESSUP, J A et al. Attenuation of salt-induced cardiac remodeling and diastolic dysfunction by the GPER agonist G-1 in female mRen2. Lewis rats. **PLoS One**, v. 5, n. 11, p. 1-9, 2010.

JIANG, C et al. Acute effect of 17 beta-estradiol on rabbit coronary artery contractile responses to endothelin-1. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 263, n. 1, p. H271-H275, 1992.

KANG, S et al. Chronic activation of the G protein-coupled receptor 30 with agonist G-1 attenuates heart failure. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. 1-9, 2012.

KANNEL, W B et al. Menopause and risk of cardiovascular disease: the Framingham study. **Annals of internal medicine**, v. 85, n. 4, p. 447-452, 1976.

KHALIL, R A. Estrogen, vascular estrogen receptor and hormone therapy in postmenopausal vascular disease. **Biochemical pharmacology**, v. 86, n. 12, p. 1627-1642, 2013.

KITAZAWA, T et al. Non-genomic mechanism of 17 beta-oestradiol-induced inhibition of contraction in mammalian vascular smooth muscle. **The Journal of Physiology**, v. 499, n. 2, p. 497-511, 1997.

KNOWLTON, A A & LEE, A R. Estrogen and the cardiovascular system. **Pharmacology & therapeutics**, v. 135, n. 1, p. 54-70, 2012.

KONG, B S; CHO, Y H; LEE, E J. G Protein-coupled estrogen receptor-1 is involved in the protective effect of protocatechuic aldehyde against endothelial dysfunction. **PloS one**, v. 9, n. 11, p. 1-11, 2014.

KUMAR, R et al. Insulinotropic and antidiabetic effects of 17 $\beta$ -estradiol and the GPR30 agonist G-1 on human pancreatic islets. **Endocrinology**, v. 152, n. 7, p. 2568-2579, 2011.

KURT, A H & BUYUKAFSAR, K. Vasoconstriction induced by G1, a G-protein-coupled oestrogen receptor1 (GPER-1) agonist, in the isolated perfused rat kidney. **European journal of pharmacology**, v. 702, n. 1, p. 71-78, 2013.

LAMAS, A Z et al. Comparative effects of estrogen, raloxifene and tamoxifen on endothelial dysfunction, inflammatory markers and oxidative stress in ovariectomized rats. **Life sciences**, v. 124, p. 101-109, 2015.

LANDMESSER, U et al. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. **Circulation**, v. 106, n. 24, p. 3073-3078, 2002.

LAUGHLIN, M H et al. Gender, exercise training, and eNOS expression in porcine skeletal muscle arteries. **Journal of Applied Physiology**, v. 95, n. 1, p. 250-264, 2003.

LE MELLAY, V; GROSSE, B; LIEBERHERR, M. Phospholipase C  $\beta$  and membrane action of calcitriol and estradiol. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 18, p. 11902-11907, 1997.

LEE, Y M et al. Oxidative stress induces vascular heme oxygenase-1 expression in ovariectomized rats. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 39, n. 1, p. 108-117, 2005.

LEE, T M; LIN, S Z; CHANG, N C. Both GPER and membrane oestrogen receptor- $\alpha$  activation protect ventricular remodelling in 17 $\beta$  oestradiol-treated

ovariectomized infarcted rats. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 18, n. 12, p. 2454-2465, 2014.

LEUNG, H S et al. Endothelial mediators of the acetylcholine-induced relaxation of the rat femoral artery. **Vascular pharmacology**, v. 44, n. 5, p. 299-308, 2006.

LI, Z L et al. Improvement of vascular function by acute and chronic treatment with the GPR30 agonist G1 in experimental diabetes mellitus. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. 1-8, 2012.

LINDSEY, S H et al. Chronic treatment with the G protein-coupled receptor 30 agonist G-1 decreases blood pressure in ovariectomized mRen2. Lewis rats. **Endocrinology**, v. 150, n. 8, p. 3753-3758, 2009.

LINDSEY, S H et al. Vasodilation in response to the GPR30 agonist G-1 is not different from estradiol in the mRen2. Lewis female rat. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 57, n. 5, p. 598-603, 2011a.

LINDSEY, S H et al. Estrogen receptor GPR30 reduces oxidative stress and proteinuria in the salt-sensitive female mRen2. Lewis rat. **Hypertension**, v. 58, n. 4, p. 665-671, 2011b.

LINDSEY, S H et al. Reduced vasorelaxation to estradiol and G-1 in aged female and adult male rats is associated with GPR30 downregulation. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 305, n. 1, p. E113-E118, 2013.

LINDSEY, S H; LIU, L; CHAPPELL, M C. Vasodilation by GPER in mesenteric arteries involves both endothelial nitric oxide and smooth muscle cAMP signaling. **Steroids**, v. 81, p. 99-102, 2014.

LIU, Y et al. Peroxynitrite inhibits Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel activity in smooth muscle of human coronary arterioles. **Circulation research**, v. 91, n. 11, p. 1070-1076, 2002.

LOYER, X et al. 17 $\beta$ -Estradiol regulates constitutive nitric oxide synthase expression differentially in the myocardium in response to pressure overload. **Endocrinology**, v. 148, n. 10, p. 4579-4584, 2007.

LUCCHESI, P A; BELMADANI, S; MATROUGUI, K. Hydrogen peroxide acts as both vasodilator and vasoconstrictor in the control of perfused mouse mesenteric resistance arteries. **Journal of hypertension**, v. 23, n. 3, p. 571-579, 2005.

MARCONDES, F K; BIANCHI, F J; TANNO, A P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4A, p. 609-614, 2002.

MARIC-BILKAN, C & MANIGRASSO, M B. Sex differences in hypertension: contribution of the renin-angiotensin system. **Gender medicine**, v. 9, n. 4, p. 287-291, 2012.

MARK, C J et al. Effects of estrogens and selective estrogen receptor modulators on vascular reactivity in the perfused mesenteric vascular bed. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 293, n. 5, p. R1969-R1975, 2007.

MARTENSSON, U E A et al. Deletion of the G protein-coupled receptor 30 impairs glucose tolerance, reduces bone growth, increases blood pressure, and eliminates estradiol-stimulated insulin release in female mice. **Endocrinology**, v. 150, n. 2, p. 687-698, 2009.

MATA, K M et al. Adaptive increases in expression and vasodilator activity of estrogen receptor subtypes in a blood vessel-specific pattern during pregnancy. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 309, n. 10, p. H1679-H1696, 2015.

MATOBA, T et al. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 106, n. 12, p. 1521-1530, 2000.

MATSUDA, K et al. Expression and intracellular distribution of the G protein-coupled receptor 30 in rat hippocampal formation. **Neuroscience letters**, v. 441, n. 1, p. 94-99, 2008.

MAZZUCA, M Q et al. Estrogen receptor subtypes mediate distinct microvascular dilation and reduction in  $[Ca^{2+}]_i$  in mesenteric microvessels of female rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 352, n. 2, p. 291-304, 2015.

MCCORD, J M. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. **Clinical biochemistry**, v. 26, n. 5, p. 351-357, 1993.

MENSAH, G A & BROWN, D W. An overview of cardiovascular disease burden in the United States. **Health affairs**, v. 26, n. 1, p. 38-48, 2007.

MEYER, M R; HAAS, E; BARTON, M. Gender differences of cardiovascular disease new perspectives for estrogen receptor signaling. **Hypertension**, v. 47, n. 6, p. 1019-1026, 2006.

MEYER, M R & BARTON, M. ER $\alpha$ , ER $\beta$ , and gpER: novel aspects of oestrogen receptor signalling in atherosclerosis. **Cardiovascular research**, v.83, n. 4, p. 605-610, 2009.

MEYER, M R et al. Dilation of epicardial coronary arteries by the G protein-coupled estrogen receptor agonists G-1 and ICI 182,780. **Pharmacology**, v. 86, n. 1, p. 58-64, 2010.

MEYER, M R; PROSSNITZ, E R; BARTON, M. The G protein-coupled estrogen receptor GPER/GPR30 as a regulator of cardiovascular function. **Vascular pharmacology**, v. 55, n. 1, p. 17-25, 2011.

MEYER, M R et al. G protein-coupled estrogen receptor protects from atherosclerosis. **Scientific reports**, v. 4, n. 7564, p. 1-9, 2014.

MEYER, M R et al. Obligatory role for GPER in cardiovascular aging and disease. **Science Signaling**, v. 9, n. 452, p. 1-10, 2016.

MILLER, A A et al. Effect of gender on NADPH-oxidase activity, expression, and function in the cerebral circulation role of estrogen. **Stroke**, v. 38, n. 7, p. 2142-2149, 2007a.

MILLER, A A et al. Effect of gender and sex hormones on vascular oxidative stress. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, n. 10, p. 1037-1043, 2007b.

MIZUKAMI, Y. In vivo functions of GPR30/GPER-1, a membrane receptor for estrogen: from discovery to functions in vivo. **Endocrine journal**, v. 57, n. 2, p. 101-107, 2010.

MOSCA, L et al. Evidence-based guidelines for cardiovascular disease prevention in women: 2007 update. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 49, n. 11, p. 1230-1250, 2007.

MOZAFFARIAN, D et al. Heart disease and stroke statistics—2016 update. **Circulation**, v. 133, n. 4, p. e38-e360, 2016.

MULLER, G & MORAWIETZ, H. Nitric oxide, NAD(P)H oxidase, and atherosclerosis. **Antioxidants & redox signaling**, v. 11, n. 7, p. 1711-1731, 2009.

MULVANY, M J & HALPERN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circulation research**, v. 41, n. 1, p. 19-26, 1977.

MÜNZEL, T et al. Role for NADPH/NADH Oxidase in the Modulation of Vascular Tone. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 874, n. 1, p. 386-400, 1999.

MURATA, T et al. G Protein–Coupled Estrogen Receptor Agonist Improves Cerebral Microvascular Function After Hypoxia/Reoxygenation Injury in Male and Female Rats. **Stroke**, v. 44, n. 3, p. 779-785, 2013.

MURRAY, C J L & LOPEZ, A D. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990–2020: Global Burden of Disease Study. **The Lancet**, v. 349, n. 9064, p. 1498-1504, 1997.

MUTCHLER, S M & STRAUB, A C. Compartmentalized nitric oxide signaling in the resistance vasculature. **Nitric Oxide**, v. 49, p. 8-15, 2015.

NASR, A & BRECKWOLDT, M. Estrogen replacement therapy and cardiovascular protection: lipid mechanisms are the tip of an iceberg. **Gynecological Endocrinology**, v. 12, n. 1, p. 43-59, 1998.

NILSSON, B O et al. Increased magnitude of relaxation to oestrogen in aorta from oestrogen receptor beta knock-out mice. **Journal of endocrinology**, v. 166, n. 2, p. R5-R9, 2000.

NILSSON, B O; OLDE, B; LEEB-LUNDBERG, L M. G protein-coupled oestrogen receptor 1 (GPER1)/GPR30: a new player in cardiovascular and metabolic oestrogenic signalling. **British journal of pharmacology**, v. 163, n. 6, p. 1131-1139, 2011.

OCARINO, N M et al. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from osteopenic rats subjected to physical activity with and without nitric oxide synthase inhibition. **Nitric Oxide**, v. 19, n. 4, p. 320-325, 2008.

ORSHAL, J M & KHALIL, R A. Gender, sex hormones, and vascular tone. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 286, n. 2, p. R233-R249, 2004.

PACHER, P; BECKMAN, J S; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological reviews**, v. 87, n. 1, p. 315-424, 2007.

PRAKASH, Y S et al. Estrogen increases Ca<sup>2+</sup> efflux from female porcine coronary arterial smooth muscle. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 276, n. 3, p. H926-H934, 1999.

PROSSNITZ, E R & ARTERBURN, J B. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVII. G Protein-Coupled Estrogen Receptor and Its Pharmacologic Modulators. **Pharmacological reviews**, v. 67, n. 3, p. 505-540, 2015.

PROSSNITZ, E R & BARTON, M. Estrogen biology: new insights into GPER function and clinical opportunities. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 389, n. 1, p. 71-83, 2014.

QIAO, X; MCCONNELL, K R; KHALIL, R A. Sex steroids and vascular responses in hypertension and aging. **Gender medicine**, v. 5, n. 1, p. S46-S64, 2008.

RAFFETTO, J D et al. Estrogen receptor-mediated enhancement of venous relaxation in female rat: implications in sex-related differences in varicose veins. **Journal of vascular surgery**, v. 51, n. 4, p. 972-981, 2010.

RESLAN, O M & KHALIL, R A. Vascular effects of estrogenic menopausal hormone therapy. **Reviews on recent clinical trials**, v. 7, n. 1, p. 47-70, 2012.

REVANKAR, C M et al. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. **Science**, v. 307, n. 5715, p. 1625-1630, 2005.

ROMERO, W G et al. Tamoxifen alters the plasma concentration of molecules associated with cardiovascular risk in women with breast cancer undergoing chemotherapy. **The oncologist**, v. 17, n. 4, p. 499-507, 2012.

ROSENFELD, C R et al. Calcium-activated potassium channels and nitric oxide coregulate estrogen-induced vasodilation. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 279, n. 1, p. H319-H328, 2000.

RUEHLMANN, D O et al. Environmental estrogenic pollutants induce acute vascular relaxation by inhibiting L-type Ca<sup>2+</sup> channels in smooth muscle cells. **The FASEB Journal**, v. 12, n. 7, p. 613-619, 1998.

RUSKO, J; LI, L; VANBREEMEN, C. 17- $\beta$ -Estradiol stimulation of endothelial K<sup>+</sup> channels. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 214, n. 2, p. 367-372, 1995.

SAKAMOTO, H et al. Expression of G protein-coupled receptor-30, a G protein-coupled membrane estrogen receptor, in oxytocin neurons of the rat paraventricular and supraoptic nuclei. **Endocrinology**, v. 148, n. 12, p. 5842-5850, 2007.

SANDOO, A et al. The endothelium and its role in regulating vascular tone. **The open cardiovascular medicine journal**, v. 4, n. 1, p. 302-312, 2010.

SANDOW, S L & HILL, C E. Incidence of myoendothelial gap junctions in the proximal and distal mesenteric arteries of the rat is suggestive of a role in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses. **Circulation Research**, v. 86, n. 3, p. 341-346, 2000.

SANTOLLO, J & DANIELS, D. Control of fluid intake by estrogens in the female rat: role of the hypothalamus. **Frontiers in systems neuroscience**, v. 9, n. 25 p. 1-11, 2015.

SANTOS, R L et al. Endothelial mediators of 17 $\beta$ -estradiol-induced coronary vasodilation in the isolated rat heart. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 37, n. 4, p. 569-575, 2004.

SANTOS, R L et al. Sex differences in the coronary vasodilation induced by 17  $\beta$ -oestradiol in the isolated perfused heart from spontaneously hypertensive rats. **Acta physiologica**, v. 200, n. 3, p. 203-210, 2010.

SANTOS, R L et al. Deficiency of sex hormones does not affect 17- $\beta$ -estradiol-induced coronary vasodilation in the isolated rat heart. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 5, p. 1-9, 2016.

SCHENKEL, P C et al. Catalase influence in the regulation of coronary resistance by estrogen: joint action of nitric oxide and hydrogen peroxide. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, p. 1-6, 2014.

SHERMAN, T S et al. Estrogen acutely activates prostacyclin synthesis in ovine fetal pulmonary artery endothelium. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 26, n. 5, p. 610-616, 2002.

SILVA, F B et al. Hormone therapy with tamoxifen reduces plasma levels of NT-B-type natriuretic peptide but does not change ventricular ejection fraction after chemotherapy in women with breast cancer. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 2, p. 154-160, 2015.

SILVA, J F et al. Mechanisms of vascular dysfunction in acute phase of Trypanosoma cruzi infection in mice. **Vascular pharmacology**, v. 82, p. 73-81, 2016.

SIMONCINI, T et al. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. **Nature**, v. 407, n. 6803, p. 538-541, 2000.

SIMSEKYILMAZ, S et al. Progress in interventional cardiology: challenges for the future. **Thrombosis and haemostasis**, v. 113, n. 3, p. 464-472, 2015.

SOMBERG, L B et al. Shock associated with endothelial dysfunction in omental microvessels. **European journal of clinical investigation**, v. 47, n. 1, p. 30-37, 2016.

STANKEVIČIUS, E et al. Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. **Medicina (Kaunas)**, v. 39, n. 4, p. 333-341, 2003.

STREHLOW, K et al. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. **Circulation research**, v. 93, n. 2, p. 170-177, 2003.

SUDHIR, K et al. Mechanisms of estrogen-induced vasodilation: in vivo studies in canine coronary conductance and resistance arteries. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 26, n. 3, p. 807-814, 1995.

TAKADA, Y et al. Cloning of cDNAs encoding G protein-coupled receptor expressed in human endothelial cells exposed to fluid shear stress. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 240, n. 3, p. 737-741, 1997.

TEP-AREENAN, P; KENDALL, D A; RANDALL, M D. Mechanisms of vasorelaxation to 17 $\beta$ -oestradiol in rat arteries. **European journal of pharmacology**, v. 476, n. 1, p. 139-149, 2003.

TROPEA, T et al. Pregnancy Augments G Protein Estrogen Receptor (GPER) Induced Vasodilation in Rat Uterine Arteries via the Nitric Oxide-cGMP Signaling Pathway. **PLoS one**, v. 10, n. 11, p. 1-9, 2015.

TSANG, S Y et al. Contribution of K<sup>+</sup> channels to relaxation induced by 17 $\beta$ -estradiol but not by progesterone in isolated rat mesenteric artery rings. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 41, n. 1, p. 4-13, 2003.

VALVERDE, M A et al. Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the  $\beta$  subunit. **Science**, v. 285, n. 5435, p. 1929-1931, 1999.

WAGNER, A H; SCHROETER, M R; HECKER, M. 17 $\beta$ -Estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 12, p. 2121-2130, 2001.

WANG, Q et al. Tetrahydrobiopterin improves endothelial function in cardiovascular disease: a systematic review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1-7, 2014.



WEINER, C P et al. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 11, p. 5212-5216, 1994.

WHITE, R E; DARKOW, D J; LANG, J L F. Estrogen relaxes coronary arteries by opening BKCa channels through a cGMP-dependent mechanism. **Circulation research**, v. 77, n. 5, p. 936-942, 1995.

World Heart Federation. Cardiovascular disease in women. WHF, Geneva, 2012.

YANG, X P & RECKELHOFF, J F. Estrogen, hormonal replacement therapy and cardiovascular disease. **Current opinion in nephrology and hypertension**, v. 20, n. 2, p. 133-138, 2011.

YAO, F & ABDEL-RAHMAN, A A. Estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  play major roles in ethanol-evoked myocardial oxidative stress and dysfunction in conscious ovariectomized rats. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 41, n. 2, p. 279-290, 2016.

YU, B P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological reviews**, v. 74, n. 1, p. 139-162, 1994.

YU, X et al. Activation of G protein-coupled estrogen receptor induces endothelium-independent relaxation of coronary artery smooth muscle. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 301, n. 5, p. E882-E888, 2011.

ZOU, M H & ULLRICH, V. Peroxynitrite formed by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide selectively inhibits bovine aortic prostacyclin synthase. **FEBS letters**, v. 382, n. 1-2, p. 101-104, 1996.

ZYGMUNT, P M et al. Involvement of voltage-dependent potassium channels in the EDHF-mediated relaxation of rat hepatic artery. **British journal of pharmacology**, v. 121, n. 1, p. 141-149, 1997.