

**Efeito do agonista (G-1) do receptor de estrogênio
acoplado a proteína G (GPER) sobre a reatividade
vascular mesentérica de ratos espontaneamente
hipertensos de ambos os sexos**

Nathalie Tristão Banhos Delgado

Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas

**Universidade Federal do Espírito Santo
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**

Vitória, agosto de 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Vitória, agosto de 2021

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

T838e Tristão Banhos Delgado, Nathalie, 1989-
Efeito do agonista (G-1) do receptor de estrogênio acoplado
a proteína G (GPER) sobre a reatividade vascular mesentérica
de ratos espontaneamente hipertensos de ambos os sexos :
Vasodilatação mediada pelo GPER em SHR / Nathalie Tristão
Banhos Delgado. - 2021.
118 f. : il.

Orientador: Roger Lyrio dos Santos.
Coorientadora: Nazaré Souza Bissoli.
Tese (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Hipertensão. 2. Artéria mesentérica. 3. Estrógenos. 4.
Receptores de células. I. Lyrio dos Santos, Roger. II. Souza
Bissoli, Nazaré. III. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 612

DEDICATÓRIA

À Deus e aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, sem a sua glória não teria completado mais uma importante etapa em minha vida. Aos meus pais Betânia e Omar, me ensinaram a nunca desistir! Aos meus professores Dr Roger Lyrio dos Santos e Dr^a Margareth Ribeiro Moyses, as verdadeiras imagens inspiradoras! Obrigada pelo apoio, oportunidade, confiança e compreensão. Sou o que sou graças aos seus ensinamentos. Agradeço as minhas lindas filhas Sara e Maria Cecília, minhas maiores incentivadoras! Me ajudaram seguir e acreditar em sonhos, por cada beijo, cada abraço e por todas as manifestações de carinho! Ao meu esposo Robson, pela paciência, compreensão e apoio.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Estudos em Reatividade Vascular – LABERV: Tagana Rosa, Izabela Bonfim, Victoria Maia, Caio Ferriguetto, Letícia Tinoco, Jessyca Giesen, Matheus Zucolotto, Jocimar Pitol, Ana Dária, Lucas Borges e Lara Amaro. A todos os demais colegas do PPGCF, meus calorosos agradecimentos! Aos professores Leonardo dos Santos e Carmem Luiza Sartório, por toda ajuda durante meu doutoramento. Estendo meus agradecimentos a todos os professores do PPGCF. Agradeço também a todos os profissionais técnicos, em especial, Anderson Almeida, Cíntia Silva Lirio, Enildo Broetto Pimentel, Rodolpho José da Silva Barros, Cynara Oliveira Possamai e Rodrigo Coffler Batista, pelo suporte na demanda do dia a dia do PPGCF. A parceria com a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), a professora Dr^a Virgínia Soares Lemos e Ildernandes Vieira Alves. Parceria com a Universidade de São Paulo (USP) com a professora Dr^a Rita Tostes e Josiane Fernandes da Silva.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo – FAPES e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas – PPGCF, pelo fomento científico oriundo de recursos públicos cobrados sob a forma de tributos ao povo brasileiro.

A todos, recebam a minha especial gratidão!!

“Todo saber é vã, exceto quando há trabalho. E todo trabalho é vazio, exceto quando há amor. E quando trabalhais com amor, vós vos unis a vós próprios, e uns aos outros, e a Deus.”

Khalil Gibran

SUMÁRIO

| | |
|---|--------------|
| RESUMO | xi |
| ABSTRACT | xiii |
| LISTA DE FIGURAS | xv |
| LISTA DE TABELAS | xxiii |
| LISTA DE ABREVIATURAS | xxiv |
| 1. INTRODUÇÃO | 26 |
| 2. OBJETIVOS | 38 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 38 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 38 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 41 |
| 3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS | 41 |
| 3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS | 41 |
| 3.2.1 Esfregaço vaginal | 41 |
| 3.2.2 Avaliação da pressão arterial | 42 |
| 3.2.3 Reatividade Vascular | 42 |
| 3.2.4 Imunofluorescência para GPER | 47 |
| 3.2.5 Avaliação <i>in situ</i> da produção de óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e espécies reativas de oxigênio (EROs) | 47 |
| 3.2.6 Western blot para GPER | 48 |
| 3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 49 |
| 4. RESULTADOS | 52 |
| 4.1 REATIVIDADE VASCULAR..... | 52 |
| 4.2 IMUNOLOCALIZAÇÃO PARA GPER | 63 |
| 4.3 AVALIAÇÃO <i>IN SITU</i> DA PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H ₂ O ₂) E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) | 64 |

| | |
|---|------------|
| 4.4 WESTERN BLOT PARA O GPER | 66 |
| 4.5 REATIVIDADE VASCULAR- INCUBAÇÃO COM G-1 | 67 |
| 4.5.1 Reatividade vascular em fêmeas | 67 |
| 4.5.2 Reatividade vascular em machos..... | 68 |
| 4.5.3 Diferença sexual na resposta de relaxamento induzida pela ACh | 69 |
| 4.5.4 Diferença sexual na resposta de contração induzida pela PE | 70 |
| 4.6. TRATAMENTO SUBAGUDO COM G36 | 71 |
| 4.6.1. Dados ponderais | 71 |
| 4.6.2. Parâmetros hemodinâmicos | 72 |
| 4.6.3. Reatividade vascular | 72 |
| 5. DISCUSSÃO | 75 |
| 6. CONCLUSÃO | 84 |
| 7. REFERÊNCIAS..... | 86 |
| APÊNDICES | 104 |

RESUMO

Introdução: O efeito protetor do estrogênio no sistema cardiovascular (SCV) não pode ser explicado apenas por sua ação por meio dos receptores ER α e ER β . Os receptores de estrogênio acoplados à proteína G (GPER) também podem estar envolvidos nessa resposta. Portanto, neste estudo avaliamos a resposta vascular mediada por GPER utilizando um agonista específico, G-1, em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Nossa hipótese é que o G-1 induz uma resposta de relaxamento em artérias mesentéricas de resistência de SHR de ambos os sexos.

Métodos: Curvas concentração-resposta com G-1 (1 nM-10 μ M) foram realizadas em artérias mesentéricas de SHR de ambos os sexos (10 – 12 semanas) antes e após a remoção endotelial ou incubação com os inibidores das enzimas óxido nítrico sintase (L-NAME 300 μ M), ciclooxigenase (Indometacina, INDO - 10 μ M), isolados ou combinados com um inibidor inespecífico da citocromo P450 (Clotrimazol, CLOT - 0,75 μ M) ou um degradador do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Catalase, CAT - 1000 unidades / mL). Avaliamos também, o efeito do bloqueio não seletivo dos canais para K⁺ (Tetraetilamônio, TEA - 5 mM). Técnicas de imunofluorescência foi utilizada para o GPER, H₂O₂ e espécies reativas de oxigênio (EROs). Curva concentração reposita à acetilcolina (ACh, 0,1 nM - 10 μ M) e à fenilefrina (PE, 1 nM - 100 μ M) também foram avaliadas após incubações com 0,1 e 10 μ M de G-1. Avaliamos parâmetros ponderais e hemodinâmicos, bem como a reatividade à bradicinina (BK, 0,1 nM - 10 μ M) e PE (1 nM - 100 μ M) após tratamento por 15 dias com G36, antagonista seletivo do GPER (160 μ g/Kg/dia) em fêmeas SHR.

Resultados: A ativação do GPER promoveu uma resposta de relaxamento similar entre machos e fêmeas SHR. Nos machos, o relaxamento depende do músculo liso vascular, da via do NO e do H₂O₂, enquanto as fêmeas do endotélio e H₂O₂. A intensidade de fluorescência para o GPER foi maior em fêmeas e o G-1 foi capaz de estimular a produção somente de H₂O₂ em ambos os sexos. A presença de 0,1 μ M de G-1 melhorou a resposta de relaxamento induzida pela ACh e reduziu a resposta vasoconstritora induzida pela PE somente em fêmeas. O tratamento com G36 não alterou os parâmetros ponderais, hemodinâmicos e a reatividade vascular.

Conclusão: A ativação do GPER induz resposta de relaxamento nas artérias mesentéricas de ratos SHR de ambos os sexos com participação de diferentes mediadores endoteliais e modula respostas de agonistas vasodilatadores e vasoconstritores. Esses resultados contribuem para melhorar o entendimento acerca das ações do GPER na reatividade vascular dentro da hipertensão essencial.

Palavras-chave: GPER, G-1, hipertensão, artérias mesentéricas de resistência, estrogênio, reatividade vascular.

ABSTRACT

Introduction: The protective effect of oestrogen on the cardiovascular system (CVS) cannot be explained only by its actions through ER α and ER β receptors. G-protein-coupled oestrogen receptors (GPER) may also be involved in this response. Therefore, in this study, we evaluated the GPER-mediated vascular response using a specific agonist, G-1, in spontaneously hypertensive rats (SHR). Our hypothesis is that G-1 induces a relaxation response in SHR resistance mesenteric arteries of both sexes.

Methods: Concentration-response curves with G-1 (1 nM-10 μ M) were performed in SHR mesenteric arteries of both sexes (10 – 12 weeks) before and after endothelial removal or incubations with nitric oxide synthase inhibitor (L-NAME 300 μ M), cyclooxygenase inhibitor (Indomethacin, INDO - 10 μ M), isolated or combined with a nonspecific cytochrome P450 inhibitor (Clotrimazol, CLOT - 0.75 μ M) or a hydrogen peroxide (H₂O₂) degrader (Catalase, CAT - 1000 units / mL). We also evaluated the effect of Tiron, an O₂^{•-} scavenging, and a non-selective blocking of K⁺ channels (Tetraethylammonium, TEA - 5 mM). Immunofluorescence techniques were used for GPER, H₂O₂, and reactive oxygen species (ROS). Concentration curve for acetylcholine (ACh, 0.1 nM - 10 μ M) and phenylephrine (PE, 1 nM - 100 μ M) were also evaluated after incubations with 0.1 and 10 μ M of G-1. We evaluated weight and hemodynamic parameters, as well as reactivity to bradykinin (BK, 0.1 nM - 10 μ M) and PE (1 nM - 100 μ M) after treatment for 15 days with G36, a selective GPER antagonist (160 μ g/Kg/ day) in SHR females.

Results: GPER activation promoted a similar relaxation response between SHR males and females. In males, relaxation depends on vascular smooth muscle, NO, and H₂O₂ pathway, while in females, on the endothelium and H₂O₂. The fluorescence intensity for GPER was higher in females and G-1 was able to stimulate the production of only H₂O₂ in both sexes. The presence of 0.1 μ M G-1 improved the ACh-induced relaxation response and reduced the PE-induced vasoconstrictor response only in females. Treatment with G36 did not change weight, hemodynamic and vascular reactivity parameters.

Conclusion: GPER activation induces a relaxation response in the mesenteric arteries of SHR rats of both sexes with the participation of different endothelial

mediators and modulates vasodilator and vasoconstrictor agonist responses. These results contribute to improve the understanding of GPER actions on vascular reactivity within essential hypertension.

Keywords: GPER, G-1, hypertension, mesenteric resistance arteries, oestrogen, vascular reactivity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Representação esquemática de eventos associados à hipertensão.** A hipertensão não está somente envolvida em diversos mecanismos que contribuem para o desenvolvimento e progressão de doenças cardiovasculares, mas tem em sua base fisiopatológica todos esses mecanismos. 27
- Figura 2 - Ações vasculoprotetoras mediadas pelo estrogênio.** É possível observar ações tanto ao nível endotelial quando ao nível do músculo liso vascular. O estrogênio é capaz de reduzir a adesão de células pró-inflamatórias, aumentar a síntese de fatores de relaxamento derivados do endotélio (EDRF), tais como o óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI₂) e a hiperpolarização dependente do endotélio (EDH). Além disso, é capaz de reduzir a proliferação de células do músculo liso vascular (MLV), aumentar a probabilidade de abertura dos canais para K⁺ favorecendo a hiperpolarização e reduzir a probabilidade de abertura dos canais para Ca²⁺ reduzindo o efeito contrátil do músculo. FONTE: Modificada de DOS SANTOS et al. (2014). 31
- Figura 3 - Mecanismos de ação dos hormônios sexuais.** Enfatizando as ações estrogênicas, estas acontecem após ativação de receptores de estrogênio (RE) clássicos que estão envolvidos nas respostas genômicas, uma vez que estes são capazes de ativar fatores transcricionais e posteriormente a síntese de proteínas. Além destes receptores, o estrogênio é capaz de ativar um terceiro grupo de receptor, e receptor de estrogênio acoplado a proteína G (GPER) localizado na membrana plasmática, embora apresente um predomínio na membrana do retículo endoplasmático. Este grupo de receptor está envolvido nas ações não genômicas do estrogênio, uma vez que alguns estudos já tenham demonstrado também seus efeitos genômicos. FONTE: DOS SANTOS et al. (2014)..... 33
- Figura 4 - Representação esquemática da estrutura transmembrana heptahelical do receptor de estrogênio acoplado à proteína G (GPER).** O GPER está envolvido nas ações não genômicas ou denominadas de ações rápidas do estrogênio. Este receptor apresenta 7 domínios transmembrana com extremidade N na região do

domínio extracelular e C terminal no domínio intracelular. FONTE: PEIXOTO (2017).

..... 34

Figura 5 - Esquema representativo do processo de dissecação dos segmentos mesentéricos de terceira ordem. (A) disposição do leito mesentérico, (B) identificação e dissecação dos segmentos de terceira ordem e (C) ramos arteriais mesentéricos finais..... 43

Figura 6 -Esquema representativo da fixação do segmento arterial com 2 mm de comprimento no miógrafo de resistência. (A) fixação do primeiro fio de tungstênio, acoplado a uma haste fixa e (B) fixação do segundo fio, acoplado a uma haste móvel conectada a um transdutor de força isométrica. 44

Figura 7 - Esquema representativo do processo de normalização. (A) Ilustração do procedimento de normalização gradual e (B) ilustração do ajuste da curva para determinação do IC100. Adaptado do manual de utilização: Wire Myograph System - 620m - user guide. 44

Figura 8 - Fluxograma do protocolo experimental. Representação esquemática do 1º protocolo de reatividade vascular..... 45

Figura 9 - Fluxograma do protocolo experimental. Representação esquemática do 2º protocolo de reatividade vascular..... 46

Figura 10 – Fluxograma do protocolo experimental referente ao tratamento com G36 ou veículo. Representação esquemática do 3º protocolo de reatividade vascular..... 46

Figura 11 - Curvas concentração-resposta ao agonista seletivo de GPER, G-1 (1 nM – 10 µM) em artérias mesentéricas de resistência são semelhantes em ambos os sexos. SHR fêmeas (n = 10) estão representados pelo círculo e os SHR machos (n = 13) pelos quadrados. Os valores foram expressos como média ± EPM. 52

Figura 12 - A resposta vasodilatadora induzida pelo G-1 é parcialmente dependente

do endotélio em SHR fêmeas. Efeito da remoção endotelial sobre a resposta de relaxamento em (A) Machos (n = 5) e (B) Fêmeas (n = 6) SHR. (C) Área abaixo da curva (AUC) antes e após a remoção endotelial. Os valores foram expressos como média ± EPM. * P < 0.05 comparado com a mesma concentração da curva controle (antes da remoção endotelial), # P < 0.05 comparado com a AUC da curva controle de SHR Fêmeas e & P < 0.05 comparado com a AUC após a remoção endotelial do grupo SHR Macho. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (two-way ANOVA) seguida pelo Sidak post hoc test. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (one-way ANOVA) seguida pelo Tukey post hoc test. 53

Figura 13 - A resposta vasodilatadora induzida pelo G-1 é parcialmente dependente

da via do NO em ambos os sexos, porém com uma maior participação em Machos SHR. Efeito do inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase com N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 300 μM) em (A) Machos (n = 8) e (B) Fêmeas (n = 6) SHR. (C) Área abaixo da curva (AUC) antes e após 30 minutos com L-NAME. Os valores foram expressos como média ± EPM. * P < 0.05 comparado com a mesma concentração da curva controle (antes da incubação com L-NAME), + P < 0.05 comparado com a AUC da curva controle de Machos SHR, # P < 0.05 comparado com a AUC da curva controle de Fêmeas SHR e & P < 0.05 comparado com as AUC da curva controle após a incubação com L-NAME do grupo Macho SHR. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (two-way ANOVA) seguida pelo Sidak post hoc test. Para AUC a estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (one-way ANOVA) seguida pelo Tukey post hoc test. 54

Figura 14 - A inibição da via dos prostanoídes potencializa o relaxamento induzido

pelo G-1 em machos SHR e não altera a resposta em fêmeas SHR. Efeito do inibidor não seletivo da ciclooxigenase com indometacina (INDO, 10 μM) em (A) Machos (n = 8) e (B) Fêmeas (n = 7) SHR. (C) Área abaixo da curva (AUC) antes e após incubação com INDO. Valores foram expressos como média ± EPM. * P < 0.05 comparado com a mesma concentração da curva controle (antes da incubação), +

P < 0.05 comparado com a AUC da curva controle do grupo Macho SHR e & P < 0.05 comparado com a AUC da curva após incubação com INDO no grupo Macho SHR. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (two-way ANOVA) seguida pelo Sidak post hoc test. Para AUC a estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (one-way ANOVA) seguida pelo Tukey post hoc test. 55

Figura 15 - A inibição combinada de 2 vias, NO e prostanoídes, não altera a resposta vasodilatadora induzida pelo G-1, indicando a participação da hiperpolarização dependente do endotélio em ambos os sexos. Efeito dos inibidores não seletivos das enzimas óxido nítrico sintase com N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 300 μM) e da ciclooxigenase com indometacina (INDO, 10 μM) em (A) Machos (n = 8) e (B) Fêmeas (n = 7) SHR. (C) Área abaixo da curva (AUC) antes e após incubações conjugadas com L-NAME mais INDO. Valores foram expressos como média ± EPM. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (two-way ANOVA) seguida pelo Sidak post hoc test. Para AUC a estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (one-way ANOVA) seguida pelo Tukey post hoc test. 56

Figura 16 - A via da citocromo P450 (CYP), uma das vias da hiperpolarização dependente do endotélio, não participa da resposta vasodilatadora induzida pelo G-1 em ambos os sexos. Efeito dos inibidores não seletivos das enzimas óxido nítrico sintase com N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 300 μM), ciclooxigenase com indometacina (INDO, 10 μM) e citocromo P450 (CYP) (Clotrimazol, 0.75 μM) em (A) Machos (n = 5) e (B) Fêmeas (n = 5) SHR. (C) Área abaixo da curva (AUC) antes e após incubações conjugadas com L-NAME, INDO e Clotrimazol. Valores foram expressos como média ± EPM. 57

Figura 17 - O peróxido de hidrogênio (H₂O₂), outra via de hiperpolarização dependente do endotélio, participa da resposta vasodilatadora induzida pelo G-1 em ambos os sexos. Efeito dos inibidores não seletivos das enzimas óxido nítrico sintase com N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 300 μM), ciclooxigenase com indometacina (INDO, 10 μM) e uma enzima que degrada

especificamente o H₂O₂ (Catalase, 1000 unid./mL) em (A) Machos (n = 6) e (B) Fêmeas (n = 6) SHR. (C) Área abaixo da curva (AUC) antes e após as incubações conjugadas com L-NAME, INDO e Catalase. Valores foram expressos como média ± EPM. * P < 0.05 comparado a mesma concentração da curva controle (antes das incubações), + P < 0.05 comparado com a AUC da curva controle do grupo Macho SHR e # P < 0.05 comparado a AUC da curva controle do grupo Fêmea SHR. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo Sidak *post hoc test*. Para AUC a estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo Tukey *post hoc test*. 58

Figura 18 - Curva concentração resposta ao agonista seletivo do GPER, G-1 (1 nM–10 µM), em artérias mesentéricas de resistência de SHR de ambos os sexos. Efeitos isolados da enzima que degrada de forma específica o H₂O₂ (Catalase, 1000 und. /mL) em (A) Macho (n = 7) e (B) Fêmea (n = 5) SHR. (C) Área abaixo da curva (AUC) antes e após a incubação com catalase. Valores foram expressos como média ± EPM. * P < 0.05 comparado com a mesma concentração da curva controle (antes da incubação), + P < 0.05 comparado com a AUC da curva controle do grupo Macho SHR e & P < 0.05 comparado com a AUC da curva após incubação com catalase no grupo Macho SHR. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo Sidak *post hoc test*. Para AUC a estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo Tukey *post hoc test*. 59

Figura 19 – A presença de um varredor de O₂^{•-} prejudicou o relaxamento induzido pelo G-1 somente nas fêmeas. A presença do Tiron (1 mM) nos (A) Machos (n = 4) e (B) Fêmeas (n = 4) SHR. (C) Área abaixo da curva (AUC) antes e após incubações com Tiron. * P < 0.05 comparado com a mesma concentração da curva controle (antes da incubação) e # P < 0.05 comparado a AUC da curva controle do grupo Fêmea SHR. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo Sidak *post hoc test*. Para AUC a estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo Tukey *post hoc test*. 60

Figura 20 - Os canais para potássio não participam da resposta de relaxamento induzida pelo G-1 em ambos os sexos. Bloqueio inespecífico dos canais para potássio com tetraetilamônio (TEA, 5 mM) em (A) Machos (n = 5) e (B) Fêmeas (n = 5) SHR. (C) Área abaixo da curva (AUC) antes e após incubação com TEA. Valores foram expressos como média ± EPM..... 61

Figura 21 - Maior intensidade de fluorescência para o GPER em artérias mesentéricas de resistência de SHR Fêmeas em comparação com os machos. Imunolocalização para GPER (A) e quantificação da fluorescência na área total vascular (B) endotélio (C) e no músculo liso vascular (D) em Macho (n = 5) e Fêmea (n = 4) SHR. Barra de escala = 20 µm. Valores foram expressos como média ± EPM. * P < 0,05 comparado com o grupo Macho SHR e + P < 0,05 comparado com a marcação de intensidade de fluorescência na camada endotelial (VWF) do grupo Macho SHR. Análise estatística foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. 63

Figura 22 - (A) Análise da microscopia de fluorescência emitida pelo H2DCF-DA em artérias mesentéricas de resistência de SHR. Os protocolos foram realizados na ausência e presença de G-1 (10 µM) e catalase (1000 unid./mL). (B) Quantificação da fluorescência produzida nos grupos Macho (n = 5) e Fêmea (n = 6) SHR. Barra de escala = 50 µm. Valores foram expressos como média ± EPM. * P < 0.05 comparado com a condição basal do mesmo grupo e # P < 0.05 comparado com estimulação com G-1 do mesmo grupo. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (two-way ANOVA) seguida pelo Sidak post hoc test. 64

Figura 23 - (A) Análise da microscopia de fluorescência emitida pelo DHE em artérias mesentéricas de resistência de SHR. Os protocolos foram realizados na ausência e presença de G-1 (10 µM) e Tiron (10 µM). (B) Quantificação da fluorescência produzida nos grupos Macho (n = 5) e Fêmea (n = 6) SHR. Barra de escala = 50 µm. Valores foram expressos como média ± EPM. # P < 0.05 comparado com estimulação com G-1 do mesmo grupo. Análise estatística foi realizada por

meio da análise de variância de 2 vias (two-way ANOVA) seguida pelo Sidak post hoc test..... 65

Figura 24 - Quantificação dos níveis de expressão relativa do (A) GPER (38 kDa) normalizado pela (B) β -actina (43 kDa) em artérias mesentéricas de SHR de ambos os sexos. Análise representativa de Western blot de artérias de resistência mesentérica em Fêmea (n = 6) e Macho (n = 6) SHR. Os valores foram expressos como média \pm EPM. Para a análise estatística foi utilizado o teste t de Student não pareado..... 66

Figura 25 - Reatividade vascular à acetilcolina (ACh, 0,1 nM - 10 μ M) e a fenilefrina (PE, 1 nM - 100 μ M) em artérias mesentéricas de resistência em Fêmeas SHR. (A) Curva concentração-resposta à ACh após incubações com 0,1 e 10 μ M de G-1, (B) área abaixo da curva (AUC) e (C) resposta de relaxamento máximo à ACh (RM_{ax}) (n = 6). (D) Curva concentração-resposta à PE após incubações com 0,1 e 10 μ M de G-1, (E) área abaixo da curva (AUC) e (F) resposta de contração máxima à PE (E_{max}) (n = 8). Os valores foram expressos como média \pm EPM. * 0,1 μ M comparado com controle, + 10 μ M comparado com controle e 10 μ M comparado com 0,1 μ M. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (two-way ANOVA) seguida pelo Sidak post hoc test. Para AUC a estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (one-way ANOVA) seguida pelo Tukey post hoc test. 67

Figura 26 - Reatividade vascular à acetilcolina (ACh, 0,1 nM - 10 μ M) e a fenilefrina (PE, 1 nM - 100 μ M) em artérias mesentéricas de resistência em Machos SHR. (A) Curva concentração-resposta à ACh após incubações com 0,1 e 10 μ M de G-1, (B) área abaixo da curva (AUC) e (C) resposta de relaxamento máximo à ACh (RM_{ax}) (n = 6). (D) Curva concentração-resposta à PE após incubações com 0,1 e 10 μ M de G-1, (E) área abaixo da curva (AUC) e (F) resposta de contração máxima à PE (E_{max}) (n = 8). Os valores foram expressos como média \pm EPM. * 0,1 μ M comparado com controle e # 10 μ M comparado com 0,1 μ M. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (two-way ANOVA) seguida

pelo Sidak post hoc test. Para AUC a estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (one-way ANOVA) seguida pelo Tukey post hoc test. 68

Figura 27 - Reatividade vascular à acetilcolina (ACh, 0,1 nM - 10 µM) em artérias mesentéricas de resistência em Fêmeas e Machos SHR. Curva concentração-resposta à ACh após incubações com **(A)** 0,1 µM e **(C)** 10 µM de G-1, **(B)** e **(D)** área abaixo da curva (AUC) (n = 6). Os valores foram expressos como média ± EPM. * comparado com o grupo Fêmea SHR. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (two-way ANOVA) seguida pelo Sidak post hoc test. Para a análise estatística da AUC foi utilizado o teste t de Student não pareado. 69

Figura 28 - Reatividade vascular à fenilefrina (PE, 1 nM - 100 µM) em artérias mesentéricas de resistência em Fêmeas e Machos SHR. Curva concentração-resposta à PE após incubações com **(A)** 0,1 µM e **(C)** 10 µM de G-1, **(B)** e **(D)** área abaixo da curva (AUC) (n = 6). Os valores foram expressos como média ± EPM. * comparado com o grupo Fêmea SHR. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (two-way ANOVA) seguida pelo Sidak post hoc test. Para a análise estatística da AUC foi utilizado o teste t de Student não pareado. 70

Figura 29 - Reatividade vascular à bradicinina (BK, 0,1 nM - 10 µM) e a fenilefrina (PE, 1 nM - 100 µM) em artérias mesentéricas de resistência de Fêmeas SHR após tratamento G36. **(A)** Curva concentração-resposta à BK e **(B)** Curva concentração-resposta à PE em ratas hipertensas tratadas com 160 mg/Kg (i.p.) de G36 ou veículo (óleo de girassol) durante 15 dias (n = 6). Os valores foram expressos como média ± EPM. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (two-way ANOVA) seguida pelo Sidak post hoc test e o teste t de Student não pareado. 73

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1**- Sumarização dos mediadores envolvidos na resposta de relaxamento induzida pelo G-1 em artérias mesentéricas de resistências de ambos de machos e fêmeas SHR..... 62
- Tabela 2** - Dados ponderais de SHR fêmeas dos grupos veículo e tratadas com G36 durante 15 dias..... 71
- Tabela 3** - Parâmetros hemodinâmicos de SHR fêmeas dos grupos Veículo e tratadas com G36 durante 15 dias. 72

LISTA DE ABREVIATURAS

AC: adenilil ciclase

ACh: Acetilcolina

Akt: Proteína cinase B

ANOVA: Análise de variância

AUC: Área abaixo da curva (*Area Under Curve*)

BH₄: (6R) - 5, 6, 7, 8 – tetrahydro-L-biopterina

Ca²⁺: Íon cálcio

cAMP: 3', 5'-adenosina monofosfato cíclico

CAT: Catalase

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CLOT: Clotrimazol

cGMP: 3' 5' – guanosina monofosfato cíclico

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CO₂: Dióxido de carbono

COX: Ciclooxygenase

DAF-2: Diacetato de 4,5-diaminofluoresceína

DCV: Doenças cardiovasculares

DHE: Dihidroetídeo

DHEA: Desidroepiandrosterona

E_{max}: resposta máxima

ECA: Enzima conversora de angiotensina

EDCFs: Fatores de contração derivados do endotélio

EDH: Hiperpolarização dependente do endotélio

EDRFs: Fatores de relaxamento derivados do endotélio

EROs: Espécies reativas de oxigênio

eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial

EPM: Erro padrão da média

EETs: Ácidos epoxieicosatrienoicos

FAD: Dinucleotídeo de adenina

FAPES: Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo

FMN: Mononucleotídeo de flavina

GPÉR: Receptor de estrogênio acoplado à proteína G

GPCR: Receptores órfãos acoplados à proteína G

HAS: Hipertensão arterial sistêmica

H2DCF-DA: Diacetato de 2', 7' diclorodihidrofluoresceína

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

INDO: Indometacina

iNOS: Óxido nítrico sintase induzível

K⁺: Íon potássio

L-NAME: N^ω-nitro-L-arginina metil éster

MLV: Músculo liso vascular

NADPH: Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintase

nNOS: Óxido nítrico sintase neuronal

O₂: Oxigênio

O₂^{•-}: Ânion superóxido

ONOO⁻: Peroxinitrito

PAD: Pressão arterial diastólica

PAM: Pressão arterial média

PAS: Pressão arterial sistólica

PBS: Tampão fosfato salina

PE: Fenilefrina

PI3K: Fosfatidilinositol-3-cinase

PKA: Proteína cinase dependente de cAMP

PNs: Prostanoides

PPGCF: Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas

RE β : Receptor de estrogênio do tipo beta

RE α : Receptor de estrogênio do tipo alfa

SHR: Ratos espontaneamente hipertensos

SOD: Superóxido dismutase

SRAA: Sistema renina-angiotensina-aldosterona

TEA: Tetraetilamônio

U.A.: Unidades arbitrárias

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são responsáveis por quase 17 milhões de mortes em todo mundo, sendo que a hipertensão arterial sistêmica (HAS) é considerada como a principal contribuinte para mais da metade destes casos (55 %) (BENJAMIN et al., 2018; MOZAFFARIAN et al., 2016). No Brasil, as DCV são a primeira causa de morte, caracterizando-as como grave problema de saúde pública (FREIRE et al., 2017). Este problema é evidenciado pelo alto investimento do governo federal por meio do Sistema Único de Saúde (SUS), o qual teve, apenas em 2012, 1.137.024 internações por doenças cardiovasculares e gastou um total de R\$ 2.381.639.909,14 (CARDIOLOGIA, 2016). HAS é considerada um dos fatores de risco mais prevalentes para DCV e cerebrovasculares, tais como doença cardíaca coronariana, insuficiência cardíaca congestiva, acidente vascular cerebral, doença renal em estágio terminal, doença vascular periférica, comprometimento cognitivo e deficiência visual entre outros (DREGAN; STEWART; GULLIFORD, 2013; MACMAHON et al., 1990; VASAN et al., 2001). Surpreendentemente, estimativas apontam que a mortalidade por estes tipos de doenças continuará liderando as causas de morte ao longo do século 21 (MOSCA et al., 2007; MOZAFFARIAN et al., 2016), principalmente nos países ocidentais e em desenvolvimento, ultrapassando os óbitos de neoplasias e AIDS (MUST et al., 1999; SIMSEKYILMAZ et al., 2015).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a cada ano, são registradas milhões de mortes no mundo por DCV e uma alta frequência de internações hospitalares devido às complicações clínicas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004). Desta forma, como a HAS apresenta prognóstico para DCV, ela pode ser considerada um importante problema de saúde pública mundial, o que ressalta a importância de estudos com drogas potencialmente úteis para o tratamento desta doença tão prevalente no Brasil e no mundo.

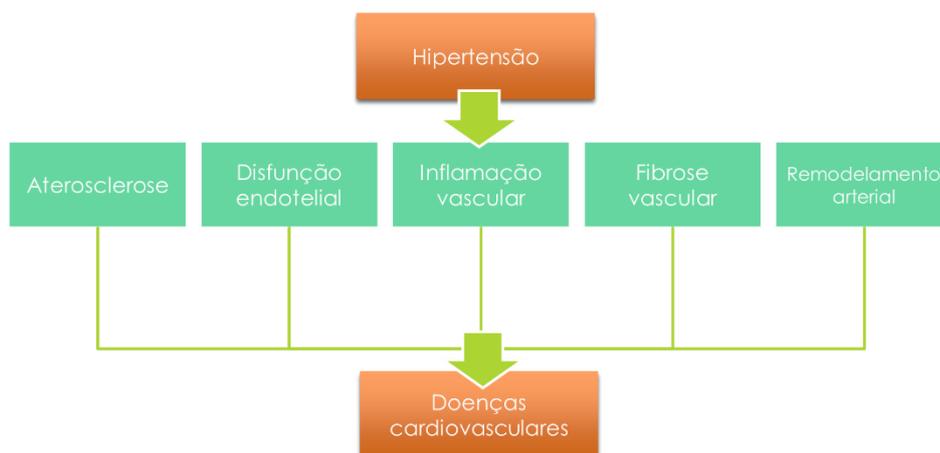


Figura 1- Representação esquemática de eventos associados à hipertensão. A hipertensão não está somente envolvida em diversos mecanismos que contribuem para o desenvolvimento e progressão de doenças cardiovasculares, mas tem em sua base fisiopatológica todos esses mecanismos.

A HAS é uma doença poligênica, que resulta de anormalidades dos mecanismos de controle da pressão arterial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial, e pelo aumento da resistência vascular periférica, devido às anormalidades no músculo liso e no endotélio vascular, e às alterações morfológicas e funcionais dos vasos sanguíneos que causam o aumento do tônus vascular (DOGGRELL; BROWN, 1998; TAHVANAINEN et al., 2006). A HAS pode ser classificada em primária ou essencial e secundária ou adquirida. A HAS primária representa aproximadamente 95 % dos casos de HAS e é caracterizada por não possuir etiologia definida, tendo um importante componente genético e ambiental, tais como o consumo elevado de álcool, a predisposição genética, o sedentarismo e a obesidade. Já os outros 5 % restantes estão relacionados à HAS secundária, com etiologia bem definida apresentando possibilidade de cura com tratamento da doença primária, ou seja, a causa é identificável e passível ou não de correções e pode ser expressa como: hipertensão arterial renovascular, hipertensão arterial por excesso de mineralocorticoides (hiperaldosteronismo), por excesso de glicocorticoides (síndrome de Cushing) e por excesso de catecolaminas (feocromocitoma) (ZAHAR, 2005).

A HAS apresenta como mecanismo fisiopatológico a disfunção endotelial, definida como o desequilíbrio entre a produção e biodisponibilidade de fatores de

relaxamento derivados do endotélio (*Endothelium-Derived Relaxing Factors* - EDRFs) e fatores de contração derivados do endotélio (*Endothelium Derived Contracting Factors* - EDCFs), associado ao aumento de radicais livres, tais como as espécies reativas de oxigênio (EROs) e redução da capacidade antioxidante (SILVA; PERNOMIAN; BENDHACK, 2012). Estudos apontam que muitas doenças crônico-degenerativas estão relacionadas com a presença de altas concentrações destes radicais produzidos pelos diversos sistemas intracelulares gerando assim, um quadro denominado de estresse oxidativo (BAYNES, 1991; SLATER et al., 1995).

O aumento do estresse oxidativo induz a ativação de uma série de mediadores inflamatórios como moléculas de adesão e citocinas pró-inflamatórias na parede arterial potencializando a disfunção endotelial em indivíduos hipertensos. Além disso, a disfunção endotelial promove a redução da biodisponibilidade de NO por meio de reações do óxido nítrico (NO) com o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) gerando EROs mais tóxicas, como o peroxinitrito ($ONOO^-$) e radical hidroxila (OH^{\cdot}) no endotélio, favorecendo ainda mais o desequilíbrio entre EDRFs e EDCFs (MEYRELLES et al., 2011). Os animais SHR exibem uma disfunção endotelial característica que não é somente devida à redução da liberação de EDRF, mas é o resultado da liberação simultânea de EDCF (LUSCHER; VANHOUTTE, 1986a; SILVA; PERNOMIAN; BENDHACK, 2012). Além disso, evidências diretas apontam uma maior contratilidade de vasos de resistência de animais hipertensos em associação a um espessamento da camada média do vaso devido a processos hipertróficos do músculo liso vascular (MLV) e a instalação do estresse oxidativo (MULVANY; HANSEN; AALKJAER, 1978).

Devido as consequências causadas pela hipertensão, vários modelos de hipertensão experimental foram desenvolvidos em animais para o estudo da hipertensão, com o intuito de elucidar mecanismos fisiopatológicos e promover o controle clínico da HAS. Existem modelos de animais hipertensos que foram desenvolvidos com o objetivo de estudar os fatores responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção da hipertensão essencial (PINTÉROVÁ; KUNEŠ; ZICHA, 2011). Sendo assim, o modelo mais estudado e utilizado é a linhagem

isogênica de ratos espontaneamente hipertensos (*Spontaneously Hypertensive Rats* - SHR) desenvolvida por Okamoto e Aoki (1963), em Kyoto, no Japão, resultado do cruzamento entre irmãos (ratos Wistar-Kyoto) com pressão elevada gerando 100 % de progênie com hipertensão espontânea. Desde então, vários especialistas relatam que a linhagem SHR é um excelente modelo para o estudo da hipertensão essencial (TRIPPODO; FROHLICH, 1981), pois o desenvolvimento de níveis pressóricos elevados possui uma fisiopatologia cardiovascular comparável com a hipertensão primária humana (DÍEZ-FREIRE et al., 2006). A pressão arterial sistólica pode atingir valores entre 180 e 200 mmHg, e caracteriza a fase sustentada da hipertensão. Neste momento, os SHR apresentam alterações cardiovasculares, tais como: hipertrofia cardíaca e vascular e disfunção endotelial (BING et al., 2002; LERMAN et al., 2019).

Nas DCV, outra característica epidemiológica que podemos observar relaciona-se com a maior susceptibilidade de homens ao desenvolvimento de DCV quando comparados a mulheres na pré-menopausa (HERON, 2016; MOSCA et al., 2007; RECKELHOFF; FORTEPIANI, 2004). Além disso, estudos demonstram que mulheres que se encontram no período da pré-menopausa apresentam menor risco de desenvolver outras DCV ou HAS quando comparadas a mulheres que já estão na pós-menopausa. Fato este, que tem atribuído ao estrogênio um papel cardioprotetor (FARHAT; LAVIGNE; RAMWELL, 1996; MOSCA et al., 2007).

Considerando que os hormônios sexuais femininos exercem efeitos sobre o sistema cardiovascular, para elucidar as suas ações foram realizados ensaios clínicos ao final da década de 90 [*Heart and Estrogen/ Progestin Replacement Study (HERS)* & *Women's Health initiative (WHI)*] com a proposta da aplicabilidade da terapia de reposição hormonal na prevenção de DCV. Conclusões acerca destes estudos indicaram que 0,625 mg de estrogênios conjugados com 2,5 mg de acetato de medroxiprogesterona elevavam risco para eventos de DCV e neoplasias quando comparadas com o grupo placebo (HULLEY et al., 1998, 2002; ROSSOUW et al., 2002).

Estes resultados geraram grande impacto junto à comunidade científica no que diz respeito ao estrogênio, apontado como uma molécula contraditória podendo ser ao mesmo tempo importante para a saúde da mulher como também nocivo (HALE; HUGHES; CLINE, 2002; PLATET et al., 2004). Ressaltamos que análises metodológicas mais detalhadas realizadas após os estudos acima geraram algumas críticas, tais como, idade avançada das mulheres, longo intervalo após a menopausa (cerca de 12 anos após) para o início do tratamento, o fato de todas as mulheres apresentarem doença coronariana e o tipo de progestina utilizada em associação com o estrogênio, uma vez que o acetato de medroxiprogesterona aumenta o risco de DCV (BRANDIN et al., 2010; MANSON et al., 2003).

Classicamente é atribuída ao estrogênio a capacidade de exercer efeitos protetores sobre diversos sistemas, entre eles ressaltamos o cardiovascular (DOS SANTOS et al., 2014; MENDELSON; KARAS, 1999). Sintetizado principalmente nos ovários, o estrogênio possui um importante papel no preparo do sistema genital feminino para o transporte de gametas e a fertilização (OGAWA et al., 1998). No entanto, as ações estrogênicas não são restritas ao sistema reprodutor feminino. Vários são os seus efeitos em outros sistemas, inclusive o cardiovascular de homens e mulheres (MORSELLI et al., 2017). Vários efeitos do estrogênio sobre esse sistema já foram descritos, tais como, a redução da transcrição da enzima conversora de angiotensina (ECA), angiotensina II circulante e conseqüentemente a inibição do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (GALLAGHER et al., 1999), *downregulation* de receptores de angiotensina II (AT-1) (DEAN et al., 2005), melhora a composição de lipoproteínas plasmáticas (CHAMBLISS; SHAUL, 2002). Nos vasos sanguíneos, o estrogênio promove efeitos antiproliferativos nas células do MLV (TAKAHASHI et al., 2003), redução na síntese de EDCFs (DUBEY et al., 2001), tais como serotonina (ao ativar receptores do tipo 5-HT_{2A}) ou endotelina-1 (MEYER et al., 2010; SUDHIR et al., 1997). O estrogênio ainda estimula a liberação de EDRFs (SANTOS et al., 2010) atuando como um potente estimulador para ativação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) ou aumentando a biodisponibilidade do NO por meio de vários mecanismos dos quais podemos citar:

- I. Redução da concentração de EROs, atuando como um sequestrador das mesmas (YEN et al., 2001).
- II. *Upregulation* da expressão do RNAm da eNOS (STIRONE et al., 2003).
- III. Inibição da expressão da subunidade gp91phox do sistema NADPH oxidase e conseqüentemente redução da formação de EROs em células endoteliais (WAGNER; SCHROETER; HECKER, 2001).

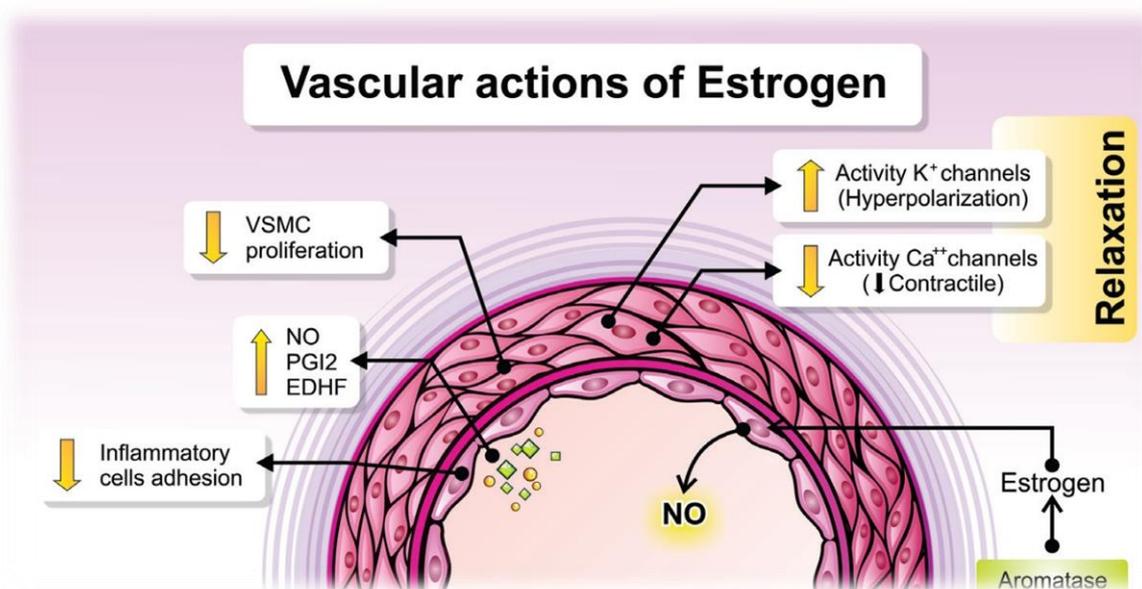


Figura 2 - Ações vasculoprotetoras mediadas pelo estrogênio. É possível observar ações tanto ao nível endotelial quanto ao nível do músculo liso vascular. O estrogênio é capaz de reduzir a adesão de células pró-inflamatórias, aumentar a síntese de fatores de relaxamento derivados do endotélio (EDRF), tais como o óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI₂) e a hiperpolarização dependente do endotélio (EDH). Além disso, é capaz de reduzir a proliferação de células do músculo liso vascular (MLV), aumentar a probabilidade de abertura dos canais para K⁺ favorecendo a hiperpolarização e reduzir a probabilidade de abertura dos canais para Ca²⁺ reduzindo o efeito contrátil do músculo. FONTE: Modificada de DOS SANTOS et al. (2014).

O NO é um fator parácrino, derivado do endotélio que exerce papel fundamental na regulação da função endotelial. Em mamíferos é sintetizado por três diferentes isoformas da óxido nítrico sintase (NOS), a NO sintase neuronal (nNOS ou NOS I), NO sintase induzível (iNOS ou NOS II) e a NO sintase endotelial (eNOS ou NOS III), e todas são homodímeras e apresentam um domínio redutase e um oxidase. Para a síntese de NO, todas as isoformas utilizam o L-arginina, oxigênio e a nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato (NADPH) reduzida como co-

substratos, dinucleotídeo de adenina (FAD), mononucleotídeo de flavina (FMN) e (6R) - 5,6,7,8-tetrahidro-L-biopterina (BH4) como cofatores. Não obstante, para a primeira etapa é necessária à sua dimerização para posterior hidroxilação da L-arginina em N^ω-hidroxi-L-arginina pela NOS. Em uma segunda etapa, a NOS oxida N^ω-hidroxi-L-arginina em L-citrulina e NO (FÖRSTERMANN; MÜNDEL, 2006; FÖRSTERMANN; SESSA, 2012; PALMER; ASHTON; MONCADA, 1988; THOMAS et al., 2008). Nos vasos sanguíneos, há uma maior expressão da isoforma endotelial, eNOS que desempenha diversas e importantes ações sobre o sistema vascular ao modular a agregação e adesão plaquetária, inibir a oxidação da lipoproteína de baixa densidade, inibir a proliferação de células do MLV, reduzir a expressão de genes pró-inflamatórios e promover a vasodilatação (FÖRSTERMANN, 2010). Sendo assim, uma síntese reduzida de NO é vista como fator de risco para as DCV, como é observada na HAS, a qual apresenta como principal característica a disfunção endotelial (LERMAN et al., 2019). A eNOS está associada à caveolina-1 (Cav-1), uma das proteínas que mantém a organização das cavéolas, que são invaginações da membrana plasmática, porém animais SHR apresentam expressão reduzida dessas cavéolas. Como a atividade da fração caveolar da eNOS é 10 vezes maior em comparação com a fração citoplasmática inteira, a redução das cavéolas em SHR gera consequências no relaxamento dependente do endotélio nesse animais (POTJE et al., 2019).

Para ativação da eNOS é necessário aumento do Ca²⁺ citoplasmático endotelial que induz a ligação entre a enzima e a calmodulina, além disso são necessárias várias outras proteínas interagindo com a eNOS para regular a sua atividade, como por exemplo, a proteína de choque térmico 90 (hsp90) (FÖRSTERMANN, 2010; FÖRSTERMANN; MÜNDEL, 2006; FÖRSTERMANN; SESSA, 2012; IGNARRO et al., 1986). A integridade endotelial é essencial para a saúde vascular, isso significa que o equilíbrio entre a produção de EDRFs e EDCFs é primordial. Em condições fisiológicas, o estímulo mais importante para a liberação de EDRFs é um aumento no fluxo sanguíneo, levando a um aumento do estresse de cisalhamento nas células endoteliais (*shear stress*). Outras substâncias também podem atuar como agonistas vasodilatadores sobre os receptores das células endoteliais estimulando não só a liberação de NO, mas também a liberação de

mediadores vasodilatadores como prostanoides (PNs) e a hiperpolarização dependente do endotélio (EDH). Sendo assim, a utilização desses agonistas, que agem especificamente sobre o endotélio, é considerada adequada para testar a função endotelial (HORNIG; DREXLER, 1997; TRIGGLE et al., 2012; VANHOUTTE et al., 2017). Não obstante, são vários agonistas que estimulam a liberação de EDRFs pelas células endoteliais e podem ser utilizadas para avaliar a função endotelial, são eles a acetilcolina (PUISSANT et al., 2014) e bradicinina (GRYGLEWSKI et al., 2002; HORNIG; DREXLER, 1997) e o estrogênio (ARORA et al., 1998; LIEBERMAN et al., 1994).

As ações do estrogênio sobre o sistema cardiovascular são mediadas por proteína intracelular de alta afinidade ao estrogênio, denominada receptor estrogênico (RE). O RE foi primeiramente descrito na década de 60 (SOLOFF; SZEGO, 1969). Posteriormente, em 1996, outro RE foi descrito e designado como RE β (NR3A2) (KUIPER et al., 1996) e o primeiro como RE α (NR3A1). Estes receptores, também denominados de RE clássicos, normalmente localizam-se no citoplasma ou no núcleo como podemos observar na **Figura 3**.

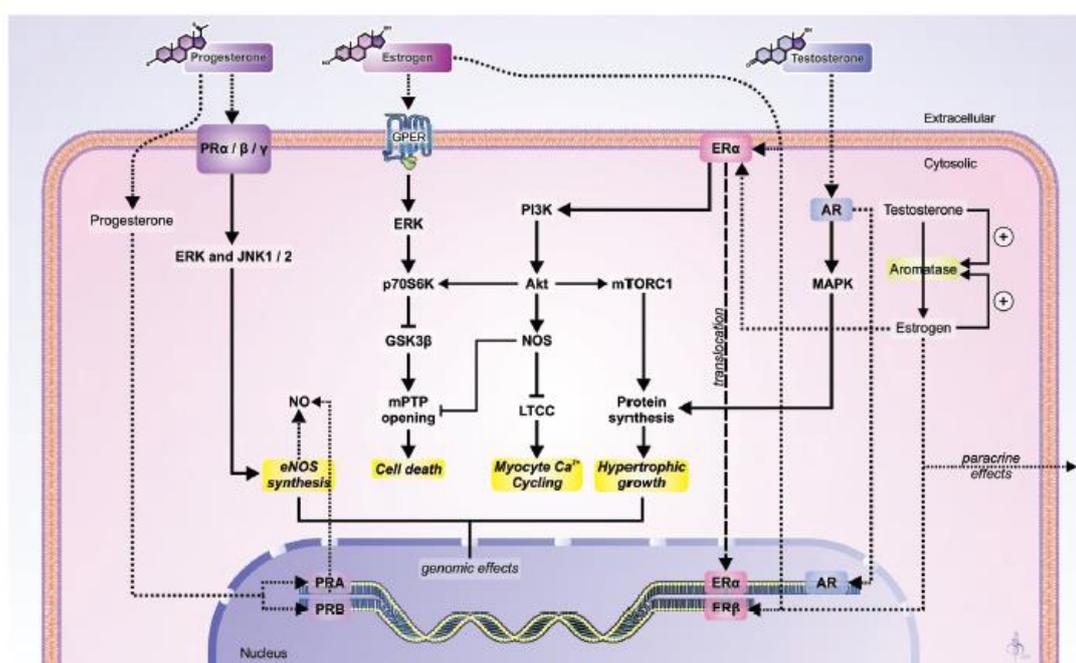


Figura 3 - Mecanismos de ação dos hormônios sexuais. Enfatizando as ações estrogênicas, estas acontecem após ativação de receptores de estrogênio (RE) clássicos que estão envolvidos nas respostas genômicas, uma vez que estes são capazes de ativar fatores transcripcionais e

posteriormente a síntese de proteínas. Além destes receptores, o estrogênio é capaz de ativar um terceiro grupo de receptor, e receptor de estrogênio acoplado a proteína G (GPER) localizado na membrana plasmática, embora apresente um predomínio na membrana do retículo endoplasmático. Este grupo de receptor está envolvido nas ações não genômicas do estrogênio, uma vez que alguns estudos já tenham demonstrado também seus efeitos genômicos. FONTE: DOS SANTOS et al. (2014)

Porém, no início da década de 90 foram clonados a partir de células B linfoblásticas humana, receptores órfãos acoplados à proteína G (*G-Protein-Coupled Receptor Superfamily* - GPCR), ou seja, receptores que não apresentavam ligante endógeno ou exógeno descrito (OWMAN et al., 1996). Estes receptores foram inicialmente designados com GPR30 devido a numeração consecutiva de receptores órfãos GPCR informados na literatura. No entanto, somente em 1997, Carmeci et al. descreveram os primeiros indícios que o GPR30 poderia estar relacionado à responsividade ao estrogênio. Thomas et al. (2005) estabeleceram o conceito de que o GPR30 é um receptor de estrogênio, levando à sua descrição como GPER, um terceiro grupo de receptor transmembrana heptahelical acoplado à proteína G como indicado pela **Figura 4**, localizado na membrana celular e predominantemente na membrana do retículo endoplasmático responsável pela sinalização de mecanismos rápidos dependentes do estrogênio (GAUDET et al., 2015; PROSSNITZ et al., 2008; REVANKAR et al., 2005). Com a síntese do primeiro agonista seletivo, o G-1 (BOLOGA et al., 2006) e subsequente identificação de antagonista seletivo, o G36 (DENNIS et al., 2011) estudos que abordam as funções celulares e fisiológicas do GPER cresceram.

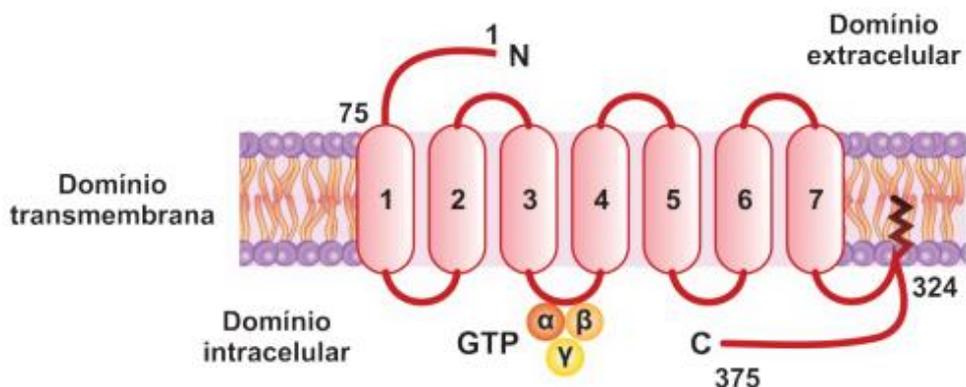


Figura 4 - Representação esquemática da estrutura transmembrana heptahelical do receptor de estrogênio acoplado à proteína G (GPER). O GPER está envolvido nas ações não genômicas

ou denominadas de ações rápidas do estrogênio. Este receptor apresenta 7 domínios transmembrana com extremidade N na região do domínio extracelular e C terminal no domínio intracelular. FONTE: PEIXOTO (2017).

As funções do GPER foram descritas em quase todos os sistemas fisiológicos, incluindo reprodutivo, endócrino, urinário, nervoso, imunológico e musculoesquelético (PROSSNITZ; BARTON, 2011) que em combinação com as ações do estrogênio por meio dos REs clássicos, o GPER aumenta a complexidade dos mecanismos envolvidos nas respostas fisiológicas ao estrogênio. No sistema cardiovascular GPER está amplamente distribuído (DESCHAMPS; MURPHY, 2009; HAAS et al., 2009; JESSUP et al., 2010). Em artérias mesentéricas de resistência de ratos normotensos foi observada diferenças sexuais na expressão de GPER. Uma maior expressão foi encontrada em machos, embora as fêmeas tivessem níveis mais elevados de GPER no endotélio do que no MLV (PEIXOTO et al., 2017, 2018). A ativação do GPER fornece efeitos protetores, como a manutenção da glicemia (MÅRTENSSON et al., 2009), efeitos antiaterogênicos (MEYER et al., 2014) e relaxamento das artérias mesentéricas de resistência (DESCHAMPS; MURPHY, 2009). Sharma et al. (2013) demonstraram que camundongos *knockout* para GPER apresentaram alterações em parâmetros metabólicos associados à obesidade e diabetes, tais como: aumento da adiposidade, piora em valores de perfil lipídico, intolerância à glicose e resistência à insulina e elevação nos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, o comprometimento da função do GPER pode estar associado ao aumento da pressão arterial e ao risco de HAS (Feldman et al., 2014). Por fim, camundongos *knockout* para GPER apresentaram disfunção cardíaca por meio do aumento do estresse oxidativo (WANG et al., 2018).

Contraditoriamente, estudos recentes têm indicado que a ausência do GPER previne DCV associadas com a síntese de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pela NADPH oxidase (MEYER et al., 2016, 2017). Diante deste novo contexto, esses estudos têm sugerido a utilização de bloqueadores farmacológicos do GPER na hipertensão, devido a sua adequada eficácia na redução do estresse oxidativo (MEYER et al., 2017). Sendo assim, pouco se sabe sobre as ações provenientes da ativação do GPER, bem como de seu agonista e antagonista nas DCV. Portanto, o papel vascular do GPER na HAS permanece incerto tanto em fêmeas quanto em machos.

Por muito tempo as ações dos receptores de estrogênio foram descritas somente nas fêmeas. No entanto, foi demonstrado essas ações em machos também (COOKE et al., 2017). A formação do estrogênio ocorre a partir da conversão de androgênios pela aromatase, enzima expressa em células de Leydig, epitélio seminífero e outros órgãos masculinos (Simpson et al., 1994). Portanto, é razoável esperar que os estrogênios desempenhem importantes papéis fisiológicos nos machos (SIMPSON, 2003). De fato, estudos experimentais demonstraram que camundongos machos *knockout* para GPER são obesos com resistência à insulina e dislipidemia (HAAS et al., 2009; SHARMA et al., 2013). A ausência de GPER tem efeitos metabólicos no sexo masculino, bem como efeitos na fisiologia cardiovascular (PROSSNITZ; HATHAWAY, 2015). Portanto, o papel global da GPER na sinalização do estrogênio em homens permanece incerto (GAUDET et al., 2015).

Baseado nos estudos acima, hipotetizamos que o agonista do GPER, o G-1, de forma aguda induz o relaxamento de segmentos arteriais mesentéricos de resistência em SHR de ambos os sexos contribuindo assim, para possíveis aplicações terapêuticas do G-1 na HAS.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as diferenças sexuais nas respostas provenientes da ativação do GPER pelo seu agonista, G-1, sobre a reatividade vascular em artéria mesentérica de SHR.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar diferenças sexuais na resposta de relaxamento induzida pelo agonista seletivo do GPER, G-1, em artérias mesentéricas de resistência.
- Investigar a participação dos mediadores endoteliais (NO, PNs e EDH) na vasodilatação induzida pelo G-1 em artérias mesentéricas de resistência de SHR;
- Verificar diferenças sexuais na imunolocalização e expressão do GPER em artérias mesentéricas de resistência;
- Verificar diferenças sexuais na produção de EROs após estimulação com G-1 em artérias mesentéricas de resistência;
- Avaliar diferenças sexuais no relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh) e na resposta contrátil induzida pela fenilefrina (PE) em artérias mesentéricas de resistência de SHR de ambos os sexos após incubações com diferentes concentrações de G-1;
- Avaliar os efeitos do tratamento subagudo com antagonista seletivo do GPER, G36, sobre o relaxamento induzido pela bradicinina (BK) e a contração induzida pela PE em artérias mesentéricas de resistência de fêmeas SHR;
- Avaliar os efeitos do tratamento subagudo com antagonista seletivo do GPER, G36, sobre parâmetros hemodinâmicos e ponderais;

- Avaliar os efeitos do tratamento subagudo com antagonista seletivo do GPER, G36, sobre produção de EROs em artérias mesentéricas de resistência de fêmeas SHR.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Para este estudo, foram utilizados ratos hipertensos de ambos os sexos adultos da linhagem SHR (*Spontaneously Hypertensive Rat*), apresentando 10 a 12 semanas de idade fornecidos pelo Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as recomendações das diretrizes brasileiras para o cuidado e uso de animais para fins científicos e didáticos e as diretrizes para a prática de eutanásia (BRASIL, 2016) com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFES (CEUA/UFES) sob nº protocolo 48/2016. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, e quatro animais por gaiola, sob condições controladas de temperatura (22–24 °C) e umidade (40–60 %). Ciclo claro-escuro foi estabelecido de 12/12 horas e os animais tinham livre acesso a água e comida (dieta padrão para animais alojados, Purina Labina, SP, Brasil).

3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.2.1 Esfregaço vaginal

O ciclo estral das fêmeas foi monitorado por meio da técnica de esfregaço vaginal. Sendo assim, o fluido vaginal foi coletado diariamente de cada animal pela manhã e pipetados em uma lâmina de vidro. As células epiteliais vaginais foram examinadas ao microscópio óptico, conforme descrito por Marcondes et al. (2002), para a identificação das diferentes fases do ciclo estral. Optamos por utilizar ratas na fase diestro para evitar possível interferência na resposta, uma vez que esta fase se caracteriza por apresentar níveis mais baixos de estrogênio, evitando assim possível competição entre o hormônio e o agonista G-1 pelo GPER. Além disso, todos os animais foram eutanasiados no período da manhã.

3.2.2 Avaliação da pressão arterial

A avaliação não invasiva da pressão arterial sistólica (PAS) foi realizada como descrito previamente (BALDO *et al.*, 2011). Após período de adaptação, os animais foram mantidos em câmara aquecida, contidos em contentor de acrílico, com um *cuff* de pulso pneumático acoplado à região proximal da cauda. Um esfigmomanômetro foi insuflado e desinsuflado automaticamente e o valor de PAS foi obtido por meio de um sistema de aquisição de dados (IITC INC/Life Science, 23924 Victory Blvd, Woodland Hills, CA 91367–1253 USA), com transdutor de pressão acoplado a um computador. A temperatura foi mantida entre 29 °C e 32 °C, por 40 minutos, tempo em que os animais permaneceram sob avaliação. A média de três registros com diferença máxima de 10 mmHg foi obtida, sendo descartados os registros associados às influências causadas pela movimentação do animal.

3.2.3 Reatividade Vascular

A reatividade vascular das artérias mesentéricas de terceira ordem foi avaliada por meio de miógrafo de resistência (620 M; Danish Myo Technology, Aarhus, Denmark). Os protocolos foram realizados de acordo com método previamente descrito por Mulvany e Halpern (MULVANY; HALPERN, 1977). Com objetivo de evitar interferência na fase sustentada da resposta contrátil, os animais foram eutanasiados por decapitação, sem administração de anestesia (HATANO *et al.*, 1989) e exsanguinados. Em seguida, o leito mesentérico foi localizado, removido e posto em placa de Petri contendo solução nutritora (solução de Krebs) resfriada a 4 °C, contendo: NaCl, 119 mM; KCl, 4,7 mM; KH₂PO₄, 0,5 mM; NaHCO₃, 13,4 mM; MgSO₄.7H₂O, 1,17 mM; CaCl₂.2H₂O, 2,5 mM e 5,5 mM de glicose. Os ramos de terceira ordem do leito mesentérico foram identificados, isolados e dissecados do tecido adjacente com auxílio de um estereomicroscópio (lupa) para dissecação (BEL Photonics STM Pro) (**Figura 5**).

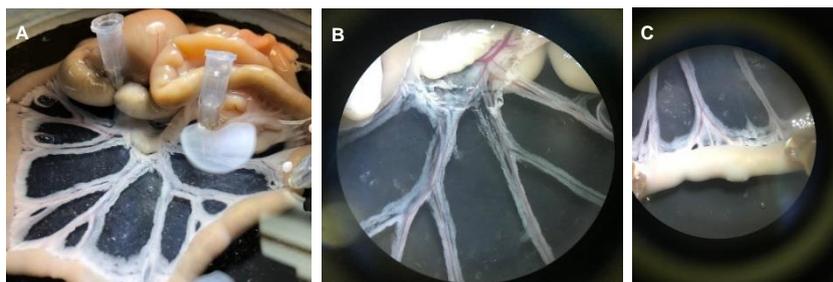


Figura 5 - Esquema representativo do processo de dissecação dos segmentos mesentéricos de terceira ordem. (A) disposição do leito mesentérico, (B) identificação e dissecação dos segmentos de terceira ordem e (C) ramos arteriais mesentéricos finais.

Os segmentos vasculares dissecados foram cortados em 2 mm de comprimento e montados com auxílio de 2 fios de tungstênio (40 μm de diâmetro) nas câmaras de banho de órgão (**Figura 6**) contendo solução de Krebs mantida a 37 °C e constantemente aerada com uma mistura carbogênica (95 % O_2 e 5 % CO_2). Um fio, transpassado pela luz do segmento vascular, foi montado numa haste fixa acoplado a um micrômetro e o segundo fio, também transpassado pela luz vascular, foi montado numa haste móvel conectada a um transdutor de força isométrica. Em seguida, os segmentos arteriais foram gradualmente estirados até que seus diâmetros internos correspondessem a uma pressão transmural de 100 mmHg (IC100), então a circunferência interna (IC1) foi normalizada para uma fração definida de IC100 (**Figura 7**). Para tanto, o IC1 foi calculado a partir da multiplicação do IC100 por um fator (0,9) que permitisse ao segmento vascular máxima produção de força ativa, bem como a sensibilidade aos agonistas. Para artérias mesentéricas de ratos, tem sido utilizado 0,9 como fator de normalização (SLEZÁK *et al.*, 2010).

Após procedimento de normalização os segmentos vasculares foram lavados três vezes a cada 15 minutos e após 45 minutos de estabilização foram estimulados duas vezes com agonista contrátil PE (3 μM) para obter respostas contráteis reproduzíveis. A viabilidade e integridade endotelial foram avaliadas pela administração de ACh (10 μM) em anéis previamente contraídos por PE (3 μM). O endotélio foi considerado viável e intacto quando a resposta de relaxamento à ACh observada atingia $\geq 80\%$ e segmentos arteriais sem endotélio quando a resposta observada, também à ACh, atingia $\leq 10\%$ em vasos pré-contraídos com PE.

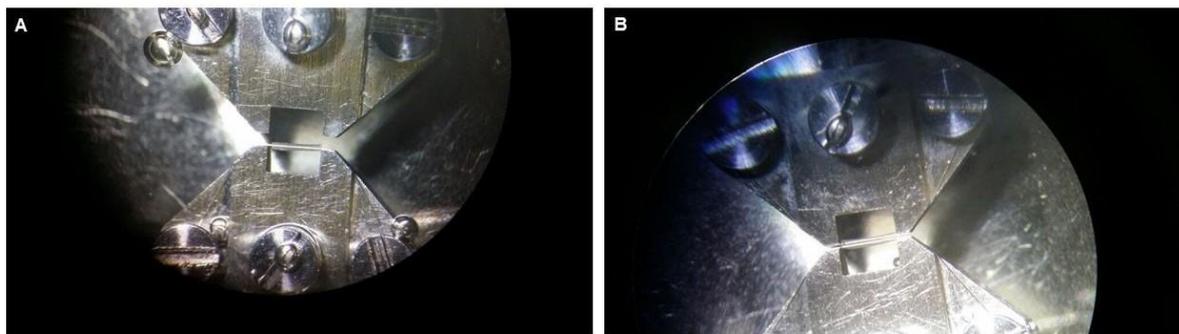


Figura 6 -Esquema representativo da fixação do segmento arterial com 2 mm de comprimento no miógrafo de resistência. (A) fixação do primeiro fio de tungstênio, acoplado a uma haste fixa e (B) fixação do segundo fio, acoplado a uma haste móvel conectada a um transdutor de força isométrica.

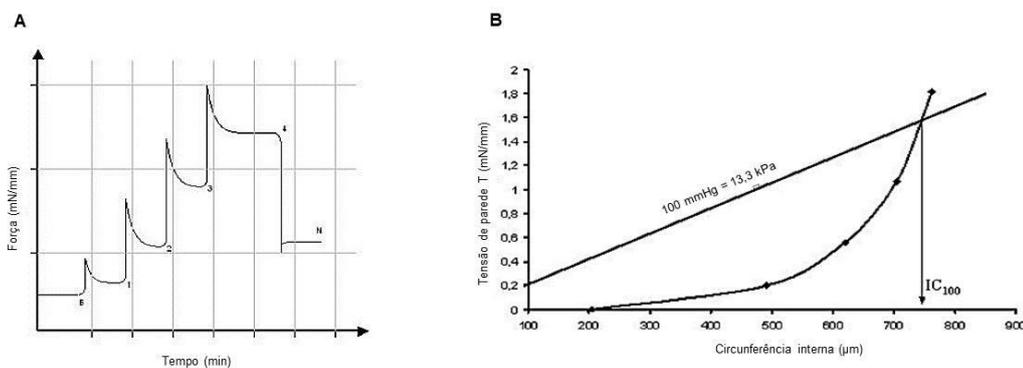


Figura 7 - Esquema representativo do processo de normalização. (A) Ilustração do procedimento de normalização gradual e (B) ilustração do ajuste da curva para determinação do IC100. Adaptado do manual de utilização: Wire Myograph System - 620m - user guide.

Após teste do endotélio os vasos passavam por um período de 15 minutos de estabilização e curvas concentração-resposta foram obtidas por meio de concentração cumulativa do G-1 (1 nM - 10 μ M; Cayman Chemical, MI - USA), após a indução prévia de contração com PE (3 μ M). O efeito vasodilatador do G-1 foi investigado antes e após utilização de inibidor inespecífico para NOS, *N^ω-nitro-L-arginine methyl ester* (L-NAME, 300 μ M; Sigma, St. Louis, MO – USA), inibidor inespecífico para ciclooxigenase (COX), indometacina (INDO, 10 μ M; Sigma, St. Louis, MO – USA), inibições associadas com L-NAME, INDO e clotrimazol, inibidor da citocromo P450 (CYP) (CLOT, 0,75 μ M Sigma, St. Louis, MO – USA), L-NAME, INDO e catalase, uma enzima que degrada especificamente o H₂O₂ (CAT, 1000

unids/mL; Sigma, St. Louis, MO – USA). Além dessas inibições, realizamos incubações com tetraetilamônio, bloqueador de canais para K⁺ de forma inespecífica (TEA, 5 mM; Sigma, St. Louis, MO – USA) e G36, antagonista seletivo do GPER (1 μM; Cayman Chemical, MI - USA). Após 30 minutos de incubação com os inibidores a curva de relaxamento induzida pelo G-1 foi repetida. Avaliamos também a capacidade de modulação do G-1 às curvas de relaxamento induzidas pela ACh (0,1 nM – 10 μM) e curvas de contração induzidas pela PE (1 nM – 100 μM) antes e após 30 minutos de incubação com diferentes concentrações de G-1 (0,1 e 10 μM). Para o terceiro protocolo, avaliamos a resposta de relaxamento induzida pela BK (0,1 nM – 10 μM) e a resposta de contração induzida pela PE (1 nM – 100 μM) após 15 dias de tratamento com G36.

Os protocolos de reatividade vascular estão esquematicamente representados nas **Figuras 8, 9 e 10**. Para avaliação da participação dos mediadores endoteliais foi realizado cálculo do *delta* da área abaixo da curva (*area under curve* – AUC), com auxílio de um programa estatístico (GraphPad Prism 6 - GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) antes e após utilização dos inibidores. Os registros foram adquiridos por meio de um sistema de aquisição de dados (LabChart 8, AD Instruments Pty Ltd., New South Wales, Australia) acoplado a um computador.

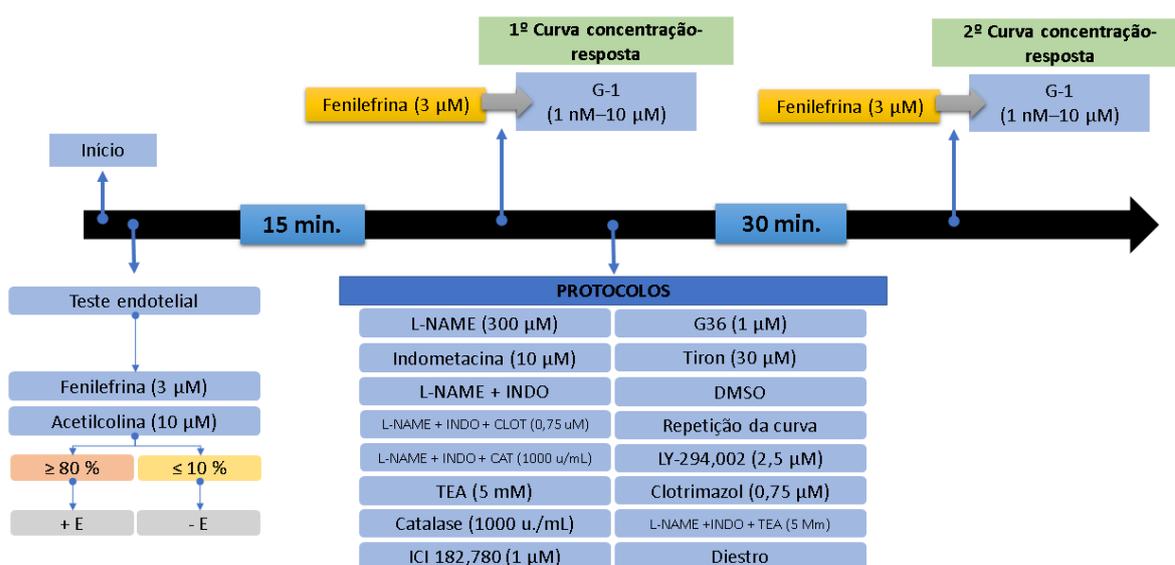


Figura 8 - Fluxograma do protocolo experimental. Representação esquemática do 1º protocolo de reatividade vascular.

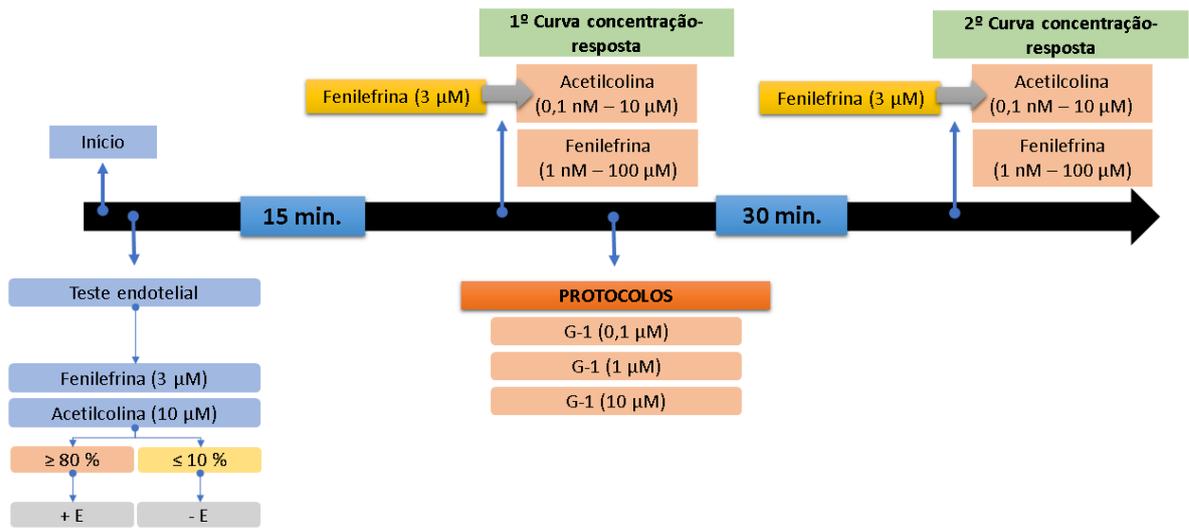


Figura 9 - Fluxograma do protocolo experimental. Representação esquemática do 2^o protocolo de reatividade vascular.

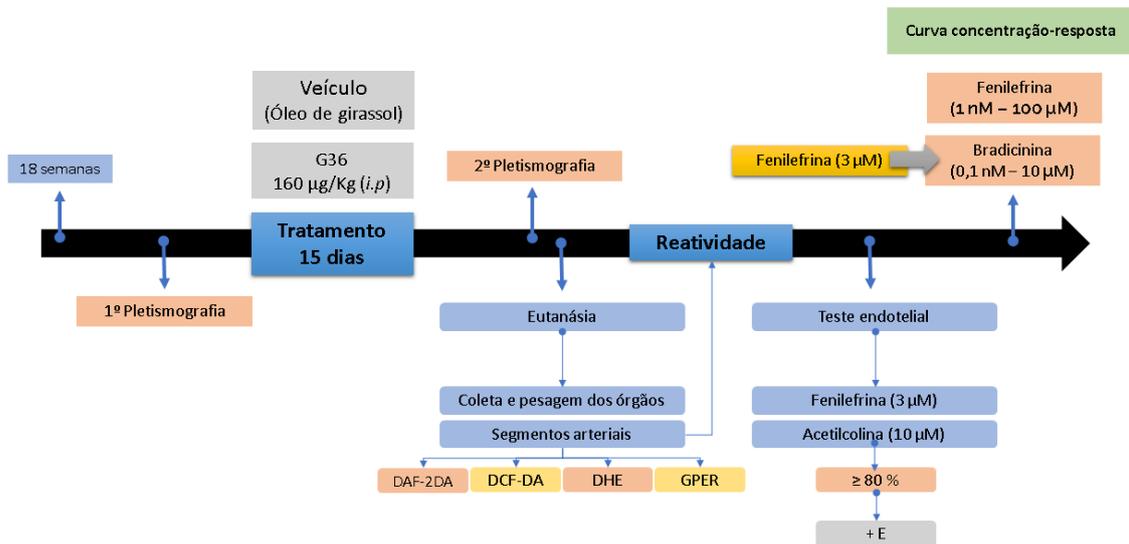


Figura 10 – Fluxograma do protocolo experimental referente ao tratamento com G36 ou veículo. Representação esquemática do 3^o protocolo de reatividade vascular.

3.2.4 Imunofluorescência para GPER

A imunofluorescência para o GPER foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Aires et al. (2013), com algumas modificações. Resumidamente, lâminas com seções transversais (10 μm) de artérias mesentéricas foram fixadas em PFA a 4 % por 15 min e lavadas com BSA a 1 % (BSA a 1 % + Triton X -100 a 0,3 % em PBS). O bloqueio foi realizado com solução de BSA a 3 % diluída em PBS 1x-0,3 % Triton-x por 30 minutos. As lâminas foram então lavadas com BSA 1 % e incubadas em câmara úmida a 4 °C durante a noite com os anticorpos primários: anti-GPER de coelho (1: 400, Abcam, # ab39742) e anti-VWF de ovelha (1: 300, Abcam, # ab11713). Em seguida, a incubação foi realizada por 1 h em temperatura ambiente com anticorpos secundários: cabra anti-coelho Alexa Fluor 555 (1: 300, Invitrogen, # 35552) e burro anti-ovelha Alexa Fluor 488 (1: 300, Abcam, # ab150178). A coloração nuclear foi obtida por incubação com 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 1: 300). Os controles negativos foram obtidos usando solução de bloqueio (BSA 3%) sem adição do anticorpo primário. A aquisição das imagens foi realizada em um microscópio Apotome (Zeiss, Alemanha) com filtros de 488 e 555 nm. A análise quantitativa de fluorescência foi realizada com o software Fiji® versão 1.53 (National Institute of Health, EUA). A intensidade da fluorescência vascular total do anti-GPER e sua localização com o anti-VWF (fusão entre 488 e 555 filtros) foi medida em dois anéis de cada animal, normalizados pela área analisada. Os resultados foram expressos como unidades arbitrárias (CARACUEL et al., 2012).

3.2.5 Avaliação *in situ* da produção de óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e espécies reativas de oxigênio (EROs)

Análises *in situ* foram realizadas por microscopia de fluorescência em cortes das artérias mesentéricas de resistência para NO, H₂O₂ e EROs seguindo métodos publicados anteriormente, com alguns modificações (CARRILLO-SEPULVEDA et al., 2015; COUTO et al., 2015; LOH et al., 2015; SILVA et al., 2016). A produção *in situ* de NO, H₂O₂ e EROs foi avaliada com as sondas 4,5-Diaminofluorescein diacetate (DAF-2 diacetato; Cayman, # 05575028), 2 'diacetato, 7'

diclorodihidrofluoresceína (H2DCF-DA; Cayman, # 05655259) e dihidroetídio (DHE, Cayman, # 056381010), respectivamente. Para tanto, segmentos de artéria mesentérica de terceira ordem foram isolados, incluídos em meio de congelamento (Tissue-Tek® OCT™, Sakura®, EUA) e cortados em segmentos transversais de 8 μ M (Criostato, Leica 1850, Leica). Para elucidar a participação do G-1 na produção de H₂O₂ e EROs, as avaliações ocorreram em três momentos distintos: (I) investigação da produção basal; (II) análise da produção de H₂O₂ e EROs após estimulação com agonista GPER, G-1 (10 μ M), e (III) análise qualitativa da produção dessas substâncias após estimulação com G-1 (10 μ M) combinada com o uso de L-NAME (300 μ M), catalase (1000 unidades/mL) ou o degradador de EROs, tiron (10 μ M). Para isso, no dia do experimento, as lâminas contendo as seções foram descongeladas à temperatura ambiente a partir de -80 °C de armazenamento, equilibradas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) por 15 minutos e incubadas com DAF-2 (10 μ M) H2DCF-DA (10 μ M) ou DHE (5 μ M) por 30 minutos em câmara úmida e protegido da luz por mais 30 minutos. Após esse período, os cortes foram incubados com G-1, L-NAME, catalase e / ou tiron por 30 minutos, nas mesmas condições descritas para a incubação com as sondas. As lâminas utilizadas para avaliar a produção basal de EROs receberam a mesma quantidade de PBS e as lâminas de controle negativo não receberam as sondas fluorescentes. As imagens digitais foram adquiridas com um microscópio de fluorescência Zeiss (Zeiss, 174 Oberkochen, Alemanha) usando 488 e 546 nm de excitação e uma objetiva de 20x. A intensidade da fluorescência foi medida usando o software ImageProPlus (versão 4.0) e expressa em unidades arbitrárias (U.A.)

3.2.6 Western blot para GPER

As artérias mesentéricas foram removidas e congelada a -80°C e, posteriormente, homogeneizadas com um homogeneizador de tecidos tipo turrax (Marconi®, Brasil) em presença de tampão de RIPA (0,05M Tris-HCl, pH 7.4; 0,15 M NaCl, 0,25% ácido desoxicolato; 1% NP-40; 10mM EDTA) acrescido de 0,3 % de Triton X-100, 0,5% de SDS, 1mM PMSF, 1mM ortovanadato de sódio, 1mM fluoreto de sódio e de coquetel de inibidores de proteases (SigmaFast®, Sigma). Após o processamento, as amostras foram centrifugadas a 3600 G por 10 minutos. A

quantidade de proteínas das amostras foi mensurada de acordo com o método de Bradford [1]. As amostras foram diluídas em tampão da amostra (4X tris HCl/SDS pH=6,8, 3% Glicerol, 1% SDS, 0,6% β -mercaptoetanol, 0,1% Azul de Bromofenol) e aquecidas a 98 °C por 5 minutos. Para separação, foram aplicadas 50 μ g de proteína em gel de 10% SDS-PAGE. Após serem separadas no gel de poliacrilamida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Millipore®, USA) com poro de 0,45 μ m. Após o bloqueio (2h em TBS-Tween 0,1% mais 3% de albumina), a membrana foi incubada overnight em câmara fria (6-8 °C), com o anticorpo primário anti-GPER (1:1000 / Abcam -ab39742) ou anti- β -actina (1:3000 / Sigma-Aldrich - A3854). Em seguida, a membrana foi lavada com TBS contendo 0,3% de Tween 20 (TBS-T) por 5 minutos (por três vezes) e incubada por duas horas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP), anti-IgG de coelho (1:10000 / Sigma-Aldrich A0545). Após o período de incubação, a membrana foi novamente lavada em TBS-T (5 minutos por três vezes). As bandas proteicas serão detectadas por uma reação de quimiluminescência (kit ECL plus – Amersham Biosciences do Brasil Ltda) e a intensidade das mesmas será avaliada por análise densitométrica através do software ImageQuant.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Uma vez confirmada a normalidade dos dados, foi utilizado um teste de Grubbs (*two side Grubbs' test*) para identificar possíveis *outliers*. Quando, pelo menos, havia um *outlier* identificado, o método ROUT adaptado para detectar quaisquer *outliers* foi usado com configuração para Q de 1 % (alfa = 0,01). As comparações de reatividade vascular foram realizadas por meio da análise de variância de duas vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo teste *post hoc* de Sidak. AUC, respostas máximas (E_{max}) e intensidade de fluorescência para H₂O₂ e EROS foram avaliados por meio da análise de variância de uma via (*one-way ANOVA*), seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. A análise de intensidade de fluorescência

para o GPER foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Análise para expressão proteica foi utilizado o *Student t test*. O nível de significância foi estabelecido como $P < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 REATIVIDADE VASCULAR

Para confirmar a hipertensão em SHR, a pressão arterial foi avaliada de forma não invasiva por pletismografia da cauda. Observamos que os animais apresentaram valores de pressão arterial aumentados, sendo detectadas diferenças significativas entre os sexos quanto à pressão arterial sistólica (Macho SHR: 215 ± 5 e Fêmea SHR 182 ± 4 mmHg), pressão arterial diastólica (Macho SHR: 178 ± 7 e Fêmea SHR 143 ± 3 mmHg) e frequência cardíaca (Macho SHR: 362 ± 15 e Fêmea SHR 343 ± 2 bpm). Observamos que o G-1, agonista GPER, induziu relaxamento dependente da concentração em anéis de artérias mesentéricas de resistência de machos ($E_{\max} = 83 \pm 3\%$) e fêmeas ($E_{\max} = 79 \pm 3\%$) SHR sem diferenças significativas entre os sexos (**Figura 11**).

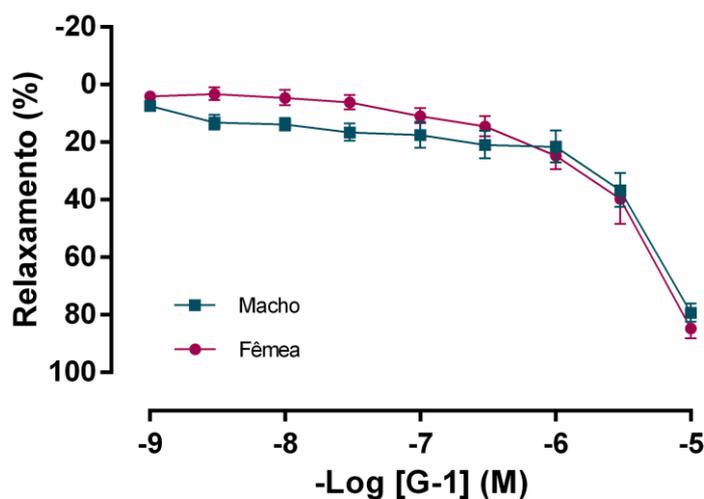


Figura 11 - Curvas concentração-resposta ao agonista seletivo de GPER, G-1 (1 nM – 10 μ M) em artérias mesentéricas de resistência são semelhantes em ambos os sexos. SHR fêmeas (n = 10) estão representados pelo círculo e os SHR machos (n = 13) pelos quadrados. Os valores foram expressos como média \pm EPM.

Em seguida, verificamos a participação do endotélio no relaxamento mediado por GPER em artérias mesentéricas de resistência de SHR. Após a remoção mecânica do endotélio (**Figura 12B**), observamos uma redução na E_{max} induzida por G-1 apenas nas fêmeas (83 ± 3 para 62 ± 8 %, $P < 0,05$), bem como no parâmetro de AUC (86 ± 6 a 41 ± 8 U.A., $P < 0,05$) conforme indicado na **Figura 12C**. Nos machos, a remoção endotelial não foi capaz de alterar o padrão de relaxamento, indicando que as ações do G-1 possivelmente são dependentes do MLV (**Figura 12A e C**).

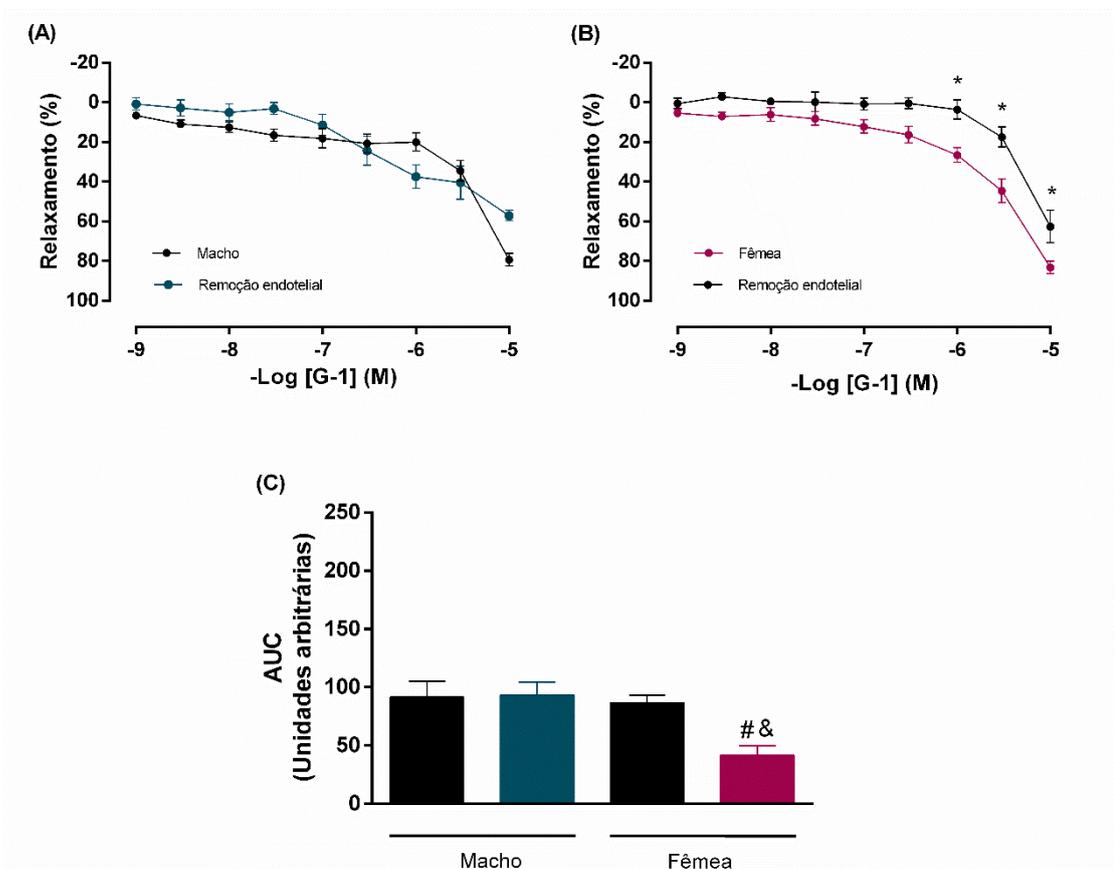


Figura 12 - A resposta vasodilatadora induzida pelo G-1 é parcialmente dependente do endotélio em SHR fêmeas. Efeito da remoção endotelial sobre a resposta de relaxamento em (A) Machos ($n = 5$) e (B) Fêmeas ($n = 6$) SHR. (C) Área abaixo da curva (AUC) antes e após a remoção endotelial. Os valores foram expressos como média \pm EPM. * $P < 0,05$ comparado com a mesma concentração da curva controle (antes da remoção endotelial), # $P < 0,05$ comparado com a AUC da curva controle de SHR Fêmeas e & $P < 0,05$ comparado com a AUC após a remoção endotelial do grupo SHR Macho. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo Sidak *post hoc test*. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo Tukey *post hoc test*.

Posteriormente, tentamos identificar quais mediadores endoteliais poderiam estar envolvidos nessa resposta e testamos primeiramente a via do NO. No entanto, foi observado um comprometimento maior em machos em comparação com as fêmeas SHR, uma vez que os machos SHR apresentaram a E_{max} menor (Macho SHR: 79 ± 3 para 54 ± 7 , $P < 0,05$ e Fêmea SHR: 83 ± 3 para 79 ± 5 %) (**Figura 13A e B**). Estes resultados foram confirmados quando os valores de AUC foram comparados (Macho SHR: 91 ± 13 para 32 ± 4 e Fêmea SHR: 86 ± 6 para 69 ± 6 A.U., $P < 0,05$) (**Figura 13C**).

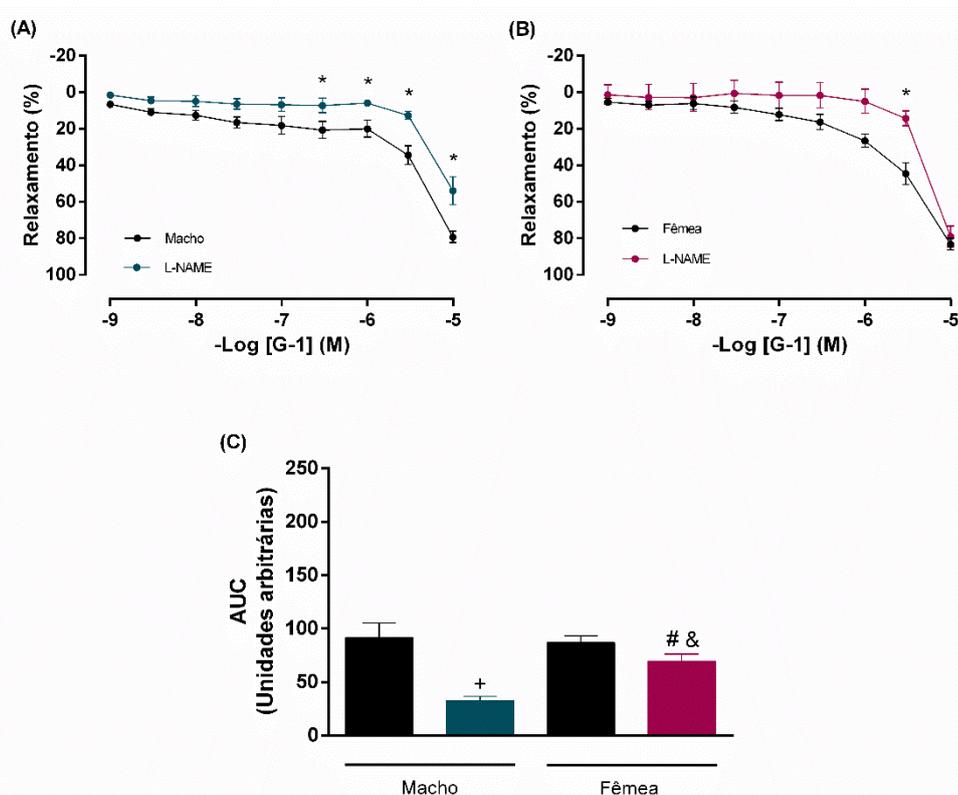


Figura 13 - A resposta vasodilatadora induzida pelo G-1 é parcialmente dependente da via do NO em ambos os sexos, porém com uma maior participação em Machos SHR. Efeito do inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase com *N^ω-nitro-L-arginine methyl ester* (L-NAME, 300 μM) em (A) Machos (n = 8) e (B) Fêmeas (n = 6) SHR. (C) Área abaixo da curva (AUC) antes e após 30 minutos com L-NAME. Os valores foram expressos como média ± EPM. * $P < 0,05$ comparado com a mesma concentração da curva controle (antes da incubação com L-NAME), + $P < 0,05$ comparado com a AUC da curva controle de Machos SHR, # $P < 0,05$ comparado com a AUC da curva controle de Fêmeas SHR e & $P < 0,05$ comparado com as AUC da curva controle após a incubação com L-NAME do grupo Macho SHR. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo Sidak *post hoc test*. Para AUC a estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo Tukey *post hoc test*.

A segunda via de mediadores estudada foi a dos PNs. Observamos que após a incubação com indometacina, inibidor inespecífico da COX, os machos SHR não apresentaram comprometimento na E_{max} , embora tenha havido um aumento no parâmetro AUC (91 ± 13 para 178 ± 20 A.U., $P < 0,05$) (Figura 14A e C). Em fêmeas SHR, não houve diferença na resposta vasodilatadora induzida por G-1 e nem na AUC (87 ± 6 para 112 ± 8 A.U.) (Figura 14B e C).

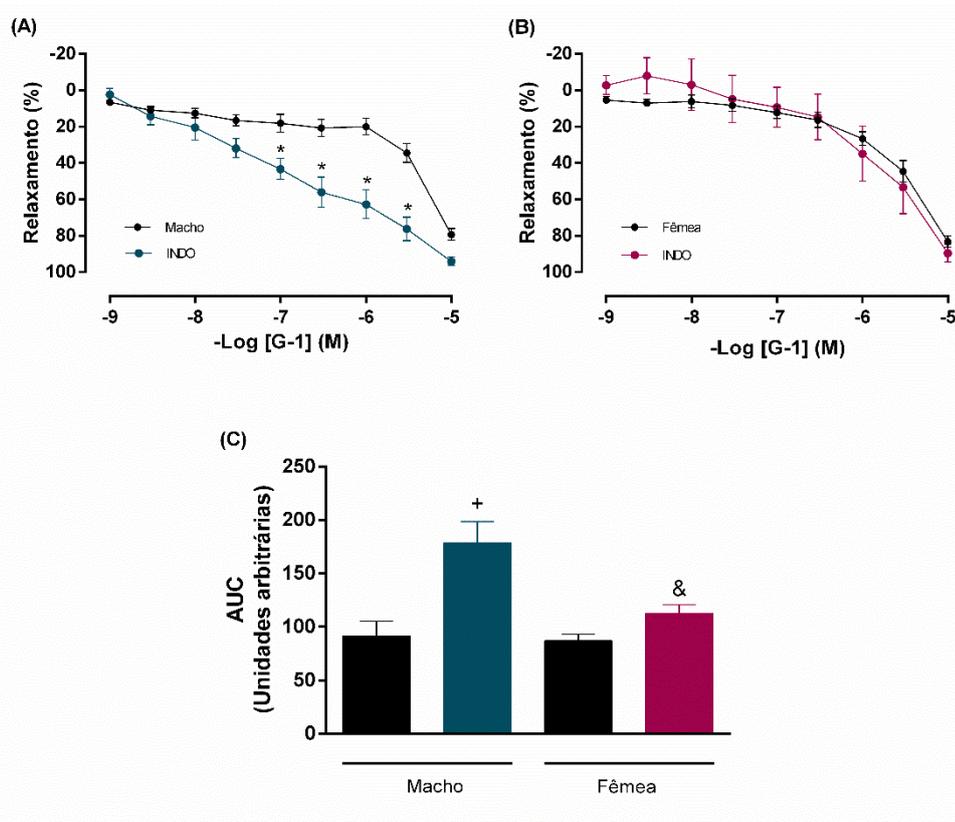


Figura 14 - A inibição da via dos prostanoídes potencializa o relaxamento induzido pelo G-1 em machos SHR e não altera a resposta em fêmeas SHR. Efeito do inibidor não seletivo da ciclooxygenase com indometacina (INDO, 10 μM) em (A) Machos ($n = 8$) e (B) Fêmeas ($n = 7$) SHR. (C) Área abaixo da curva (AUC) antes e após incubação com INDO. Valores foram expressos como média \pm EPM. * $P < 0.05$ comparado com a mesma concentração da curva controle (antes da incubação), + $P < 0.05$ comparado com a AUC da curva controle do grupo Macho SHR e & $P < 0.05$ comparado com a AUC da curva após incubação com INDO no grupo Macho SHR. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo Sidak *post hoc* test. Para AUC a estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo Tukey *post hoc* test.

De acordo com Matoba et al. (2000) o mediador mais importante envolvido nas respostas de relaxamento em artérias de resistência é a EDH. Sendo assim, fizemos incubações concomitantes com inibidores para formação de NO e PNs e não observamos alterações nas respostas mediadas pelo GPER em ambos os sexos (**Figura 15A, B e C**). Estes resultados sugerem que a EDH é participativa desta resposta em machos e fêmeas SHR.

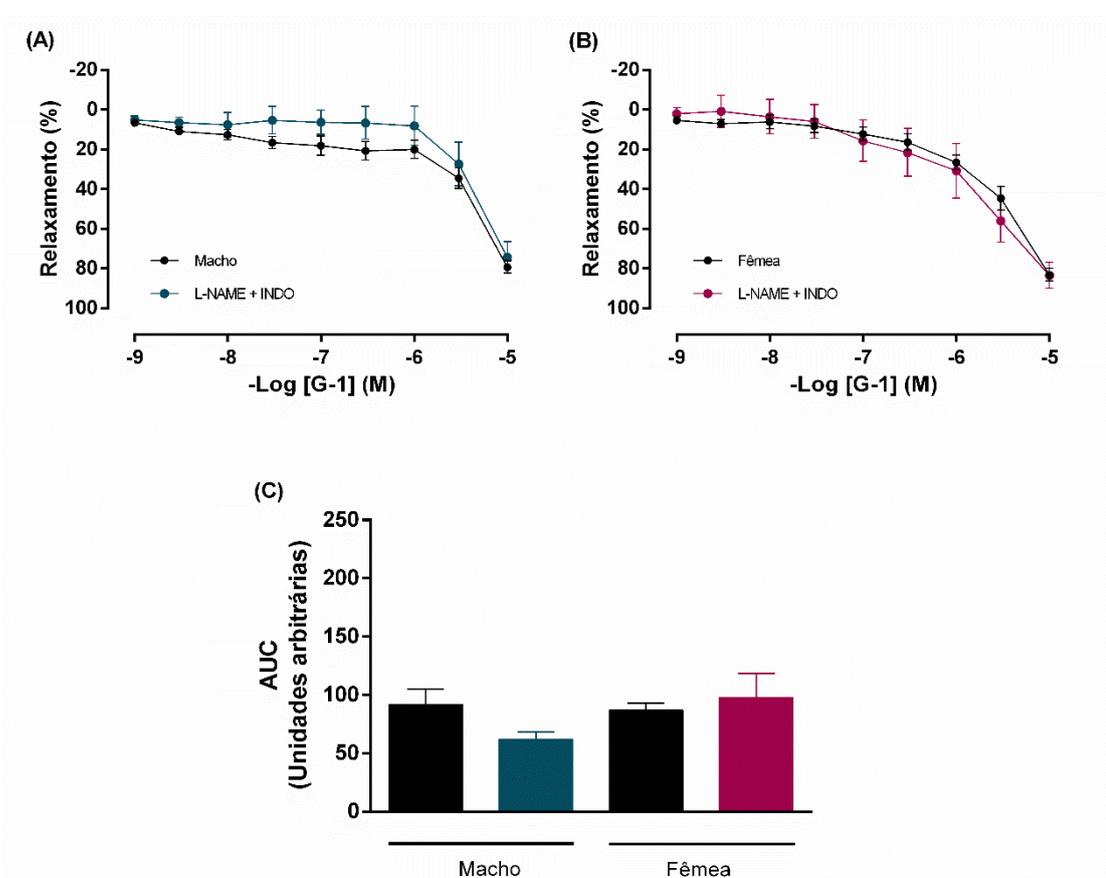


Figura 15 - A inibição combinada de 2 vias, NO e prostanoídeos, não altera a resposta vasodilatadora induzida pelo G-1, indicando a participação da hiperpolarização dependente do endotélio em ambos os sexos. Efeito dos inibidores não seletivos das enzimas óxido nítrico sintase com *N^ω-nitro-L-arginine methyl ester* (L-NAME, 300 μ M) e da ciclooxigenase com indometacina (INDO, 10 μ M) em (A) Machos (n = 8) e (B) Fêmeas (n = 7) SHR. (C) Área abaixo da curva (AUC) antes e após incubações conjugadas com L-NAME mais INDO. Valores foram expressos como média \pm EPM. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo Sidak *post hoc test*. Para AUC a estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo Tukey *post hoc test*.

Entre os candidatos a EDH, estudamos a participação dos produtos da citocromo P450. Também não houve diferenças na resposta vasodilatadora induzida pelo G-1 após a inibição de NO, PNs e ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs), metabólitos do ácido araquidônico produzidos pela atividade da enzima citocromo P450 (**Figura 16A, B e C**).

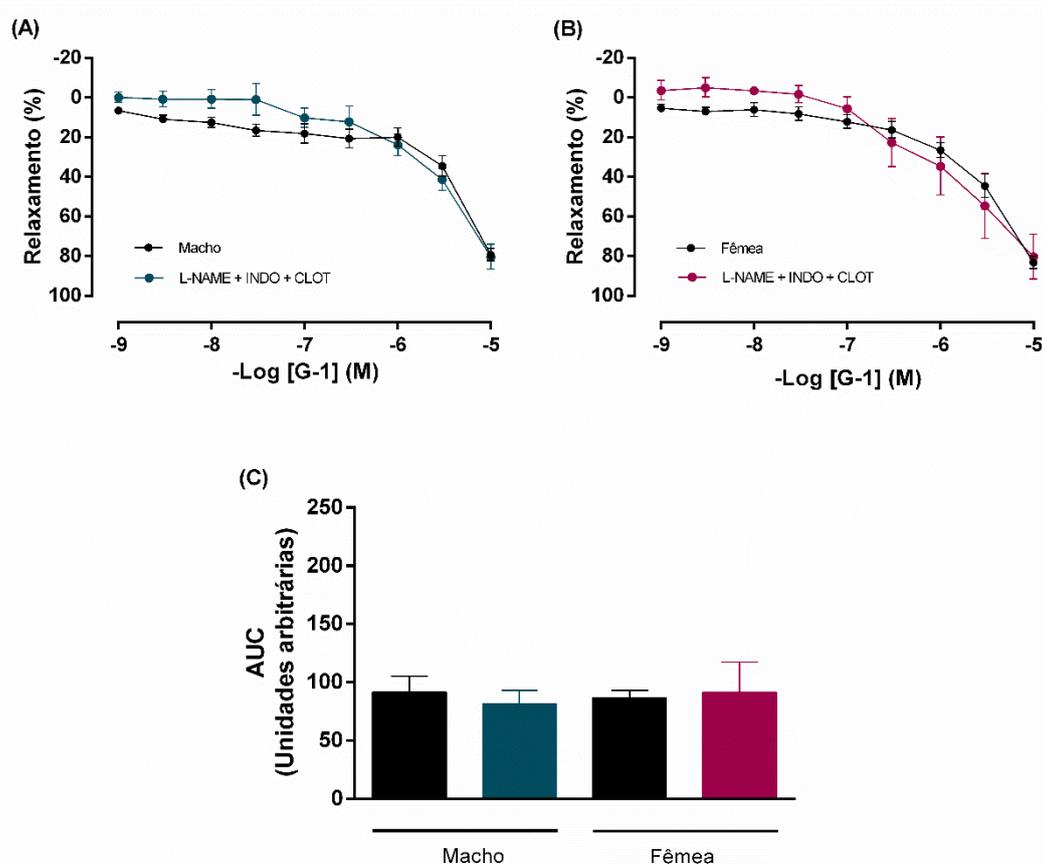


Figura 16 - A via da citocromo P450 (CYP), uma das vias da hiperpolarização dependente do endotélio, não participa da resposta vasodilatadora induzida pelo G-1 em ambos os sexos. Efeito dos inibidores não seletivos das enzimas óxido nítrico sintase com N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 300 μM), ciclooxigenase com indometacina (INDO, 10 μM) e citocromo P450 (CYP) (Clotrimazol, 0.75 μM) em (A) Machos (n = 5) e (B) Fêmeas (n = 5) SHR. (C) Área abaixo da curva (AUC) antes e após incubações conjugadas com L-NAME, INDO e Clotrimazol. Valores foram expressos como média ± EPM.

Para verificar a participação do H_2O_2 na resposta vasodilatadora induzida pelo G-1, utilizamos uma enzima que degrada o H_2O_2 (catalase) em associação com inibidores da formação de NO e PNs. Como resultado, observamos uma resposta vasodilatadora prejudicada em ambos os sexos (Macho SHR: 79 ± 3 para 53 ± 7 e Fêmea SHR: 83 ± 3 para 47 ± 12 %, $P < 0,05$) (**Figura 17A e B**) e nos valores de AUC (86 ± 6 para 39 ± 8 U.A., $P < 0,05$) (**Figura 17C**).

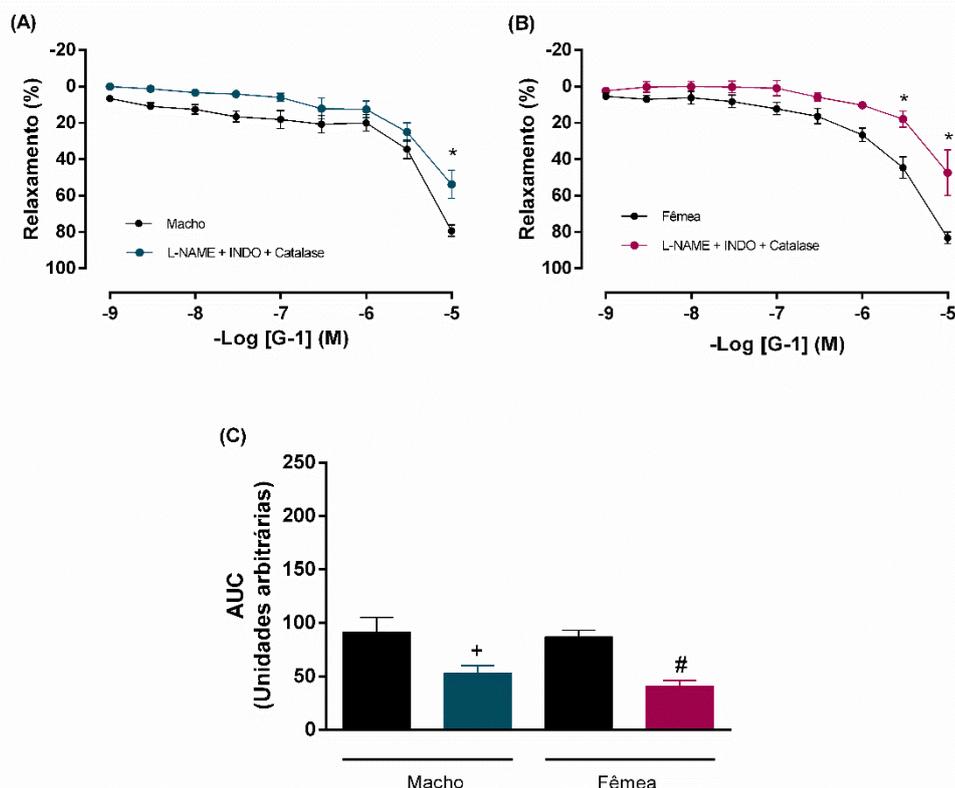


Figura 17 - O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), outra via de hiperpolarização dependente do endotélio, participa da resposta vasodilatadora induzida pelo G-1 em ambos os sexos. Efeito dos inibidores não seletivos das enzimas óxido nítrico sintase com N^{ω} -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 300 μ M), ciclooxygenase com indometacina (INDO, 10 μ M) e uma enzima que degrada especificamente o H_2O_2 (Catalase, 1000 unid./mL) em (A) Machos ($n = 6$) e (B) Fêmeas ($n = 6$) SHR. (C) Área abaixo da curva (AUC) antes e após as incubações conjugadas com L-NAME, INDO e Catalase. Valores foram expressos como média \pm EPM. * $P < 0.05$ comparado a mesma concentração da curva controle (antes das incubações), + $P < 0.05$ comparado com a AUC da curva controle do grupo Macho SHR e # $P < 0.05$ comparado a AUC da curva controle do grupo Fêmea SHR. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo Sidak *post hoc test*. Para AUC a estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo Tukey *post hoc test*.

Silva et al. (2017) observaram que o H_2O_2 tem um papel importante no *cross-talk* entre NOS e COX, dependendo de sua concentração. Portanto, analisamos a participação do H_2O_2 nesta resposta em presença das vias do NO e PNs. Após incubação isolada com catalase, observamos um aumento na resposta vasodilatadora induzida por G-1 (**Figura 18A**) e na AUC (91 ± 13 a 210 ± 21 , $p < 0,05$) (**Figura 18C**) em machos SHR apenas. Estes parâmetros permaneceram inalterados no grupo Fêmea SHR (**Figura 18B e C**; AUC: 86 ± 6 para 106 ± 23 U.A.).

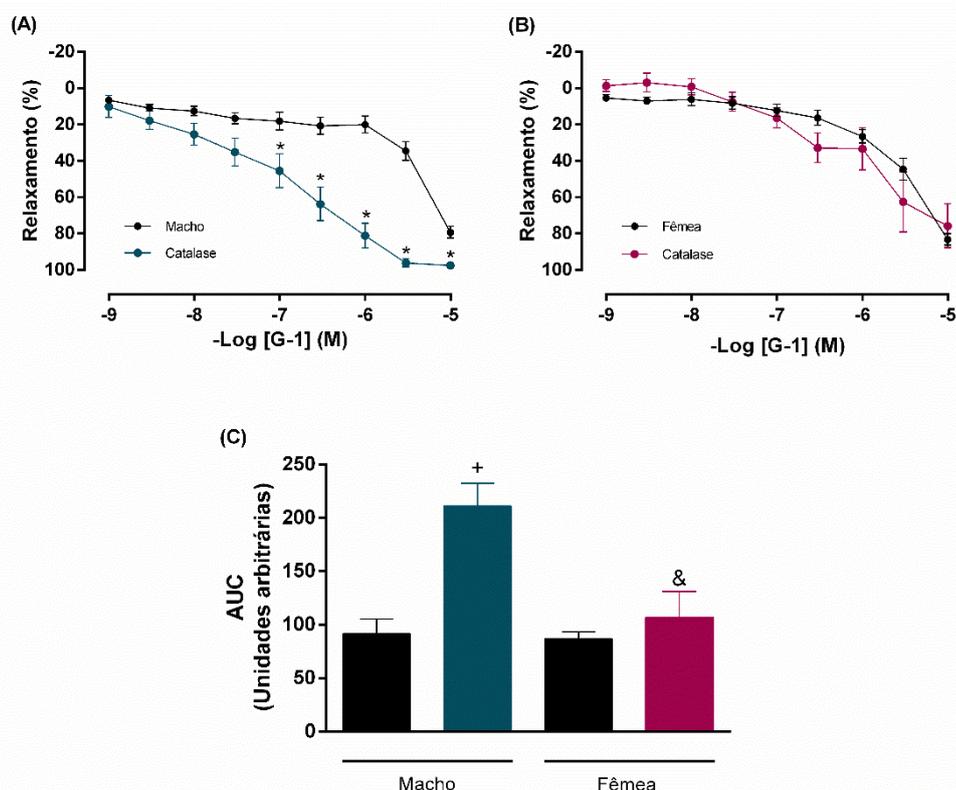


Figura 18 - Curva concentração resposta ao agonista seletivo do GPER, G-1 (1 nM–10 μ M), em artérias mesentéricas de resistência de SHR de ambos os sexos. Efeitos isolados da enzima que degrada de forma específica o H_2O_2 (Catalase, 1000 und./mL) em (A) Macho ($n = 7$) e (B) Fêmea ($n = 5$) SHR. (C) Área abaixo da curva (AUC) antes e após a incubação com catalase. Valores foram expressos como média \pm EPM. * $P < 0.05$ comparado com a mesma concentração da curva controle (antes da incubação), + $P < 0.05$ comparado com a AUC da curva controle do grupo Macho SHR e & $P < 0.05$ comparado com a AUC da curva após incubação com catalase no grupo Macho SHR. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo Sidak *post hoc test*. Para AUC a estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo Tukey *post hoc test*.

Para sabermos se a fonte do H_2O_2 é proveniente da dismutação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ pela superóxido dismutase (SOD), realizamos incubação com Tiron, um varredor de $\text{O}_2^{\bullet-}$. Observamos que apenas as fêmeas apresentaram o E_{max} (Macho SHR: 79 ± 3 para 81 ± 11 e Fêmea SHR: 83 ± 3 para 59 ± 2 %) e a AUC (Macho SHR: 91 ± 13 para 72 ± 20 e Fêmea SHR: 86 ± 6 para 59 ± 3 U.A.), prejudicados (**Figura 19**). Esse resultado é muito parecido com o protocolo de incubação com catalase associada com L-NAME e INDO. Esses resultados indicam que possivelmente o H_2O_2 participativo no relaxamento em fêmeas, pode ser proveniente do da dismutação do $\text{O}_2^{\bullet-}$.

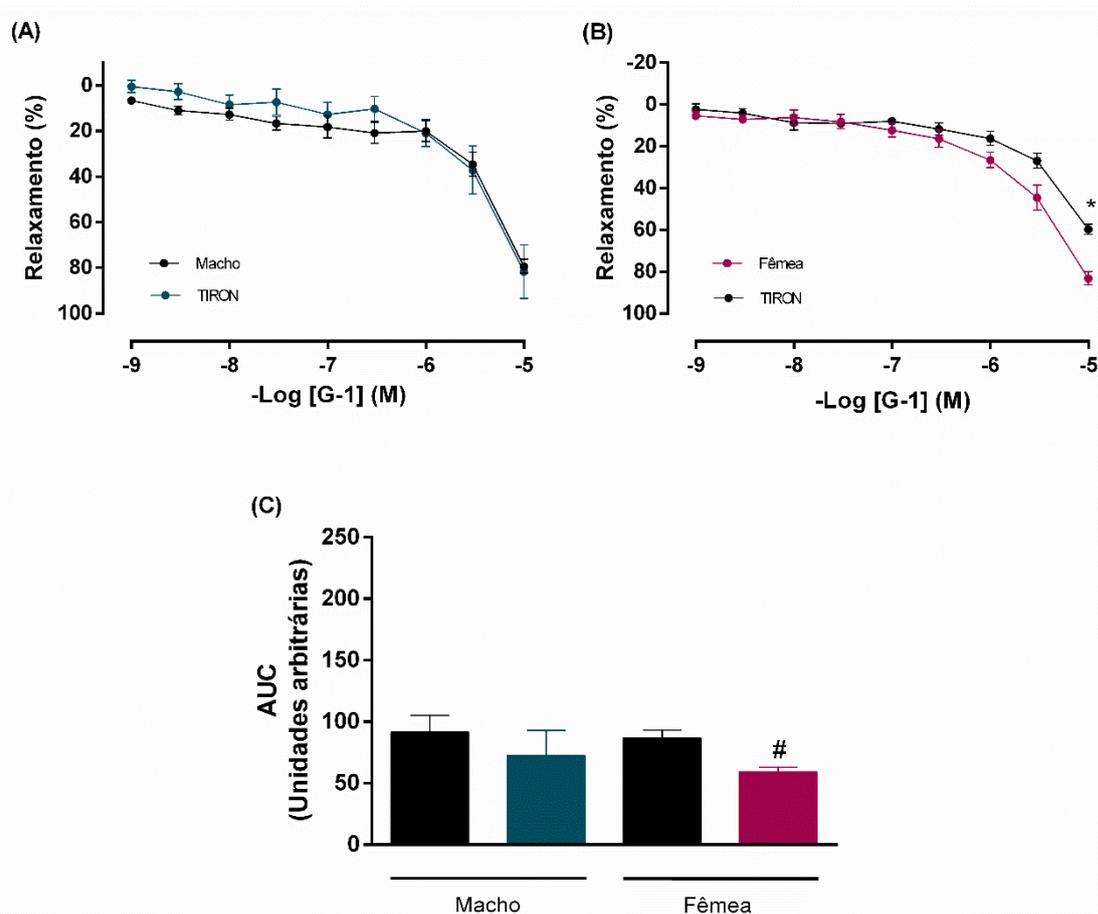


Figura 19 – A presença de um varredor de $\text{O}_2^{\bullet-}$ prejudicou o relaxamento induzido pelo G-1 somente nas fêmeas. A presença do Tiron (1 mM) nos (A) Machos (n = 4) e (B) Fêmeas (n = 4) SHR. (C) Área abaixo da curva (AUC) antes e após incubações com Tiron. * $P < 0.05$ comparado com a mesma concentração da curva controle (antes da incubação) e # $P < 0.05$ comparado a AUC da curva controle do grupo Fêmea SHR. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo Sidak *post hoc test*. Para AUC a estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo Tukey *post hoc test*.

Analizamos também o papel dos canais para K^+ na resposta de relaxamento induzida pelo G-1 (**Figura 20**). Observamos que após a incubação com TEA, o E_{max} (Macho SHR: 79 ± 3 para 86 ± 4 e Fêmea SHR: 83 ± 3 para 81 ± 16 %), nem os valores de AUC (Macho SHR: 91 ± 13 para 107 ± 15 e Fêmea SHR: 86 ± 6 para 77 ± 19 U.A.), foram alterados.

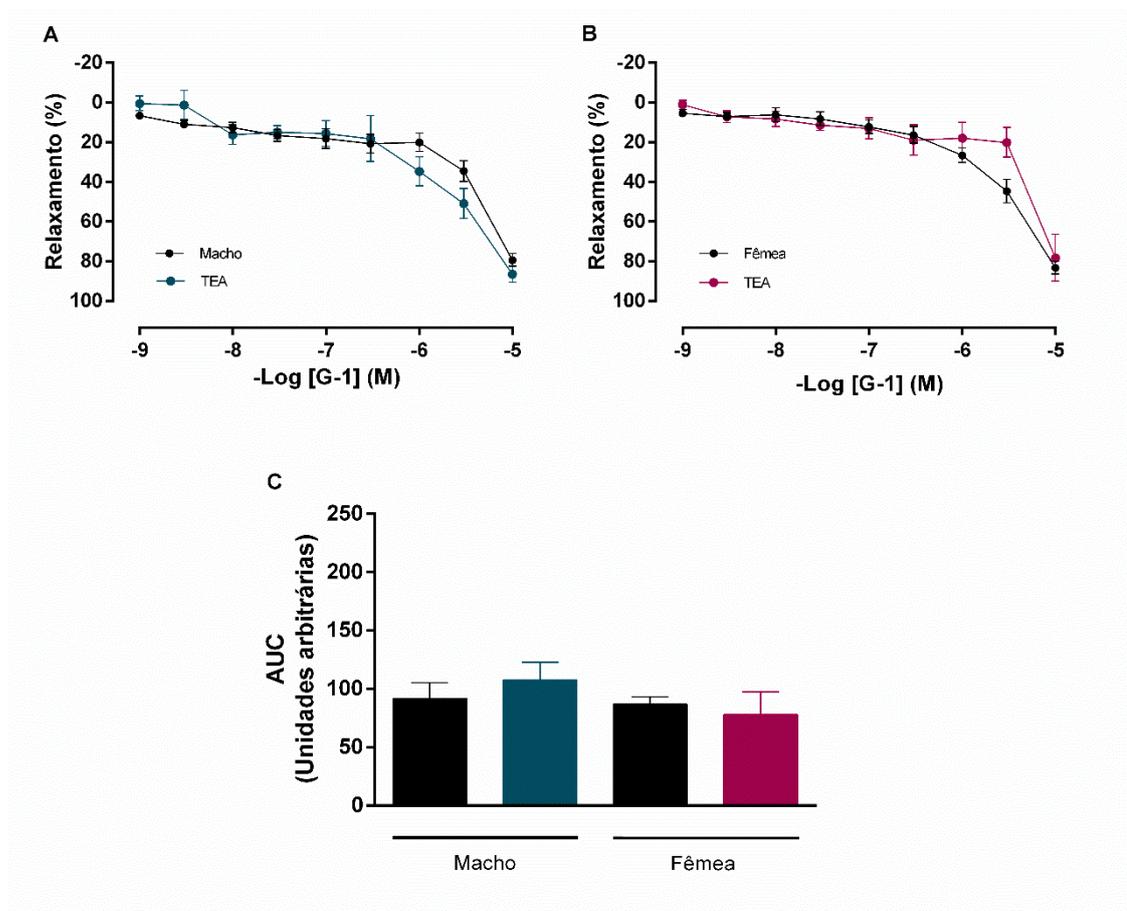


Figura 20 - Os canais para potássio não participam da resposta de relaxamento induzida pelo G-1 em ambos os sexos. Bloqueio inespecífico dos canais para potássio com tetraetilamônio (TEA, 5 mM) em (A) Machos (n = 5) e (B) Fêmeas (n = 5) SHR. (C) Área abaixo da curva (AUC) antes e após incubação com TEA. Valores foram expressos como média \pm EPM.

Tabela 1- Sumarização dos mediadores envolvidos na resposta de relaxamento induzida pelo G-1 em artérias mesentéricas de resistência de machos e fêmeas SHR.

| Mediadores | Machos | Fêmeas |
|-------------------------------|--------|--------|
| Endotélio | — | + |
| NO | + | — |
| Prostanoides | ++ | — |
| EDH | + | + |
| EETs | — | — |
| H ₂ O ₂ | + | ++ |
| O ₂ ^{•-} | — | + |
| K ⁺ | — | — |

NO: Óxido nítrico. **EDH:** Hiperpolarização dependente do endotélio. **EETs:** Ácidos epoxieicosatrienoicos. **H₂O₂:** Peróxido de hidrogênio. **O₂^{•-}:** Ânion superóxido. **K⁺:** Íon potássio. + presente e – não presente.

4.2 IMUNOLocalização PARA GPER

A análise de imunofluorescência foi realizada em artérias mesentéricas de resistência para identificar a presença do GPER em SHR de ambos os sexos. Os resultados demonstraram uma maior intensidade de fluorescência na área vascular total (Macho SHR: 26 ± 2 e Fêmea SHR: 41 ± 4 U.A., $P < 0,05$), área endotelial (Macho SHR: 35 ± 5 e Fêmea SHR: 49 ± 1 U.A., $P < 0,05$) e camada média (Macho SHR: $17,5 \pm 0,3$ e Fêmea SHR: $38 \pm 4,5$ U.A., $P < 0,05$) em fêmeas SHR em comparação com os machos SHR (**Figura 21A, B, C e D**).

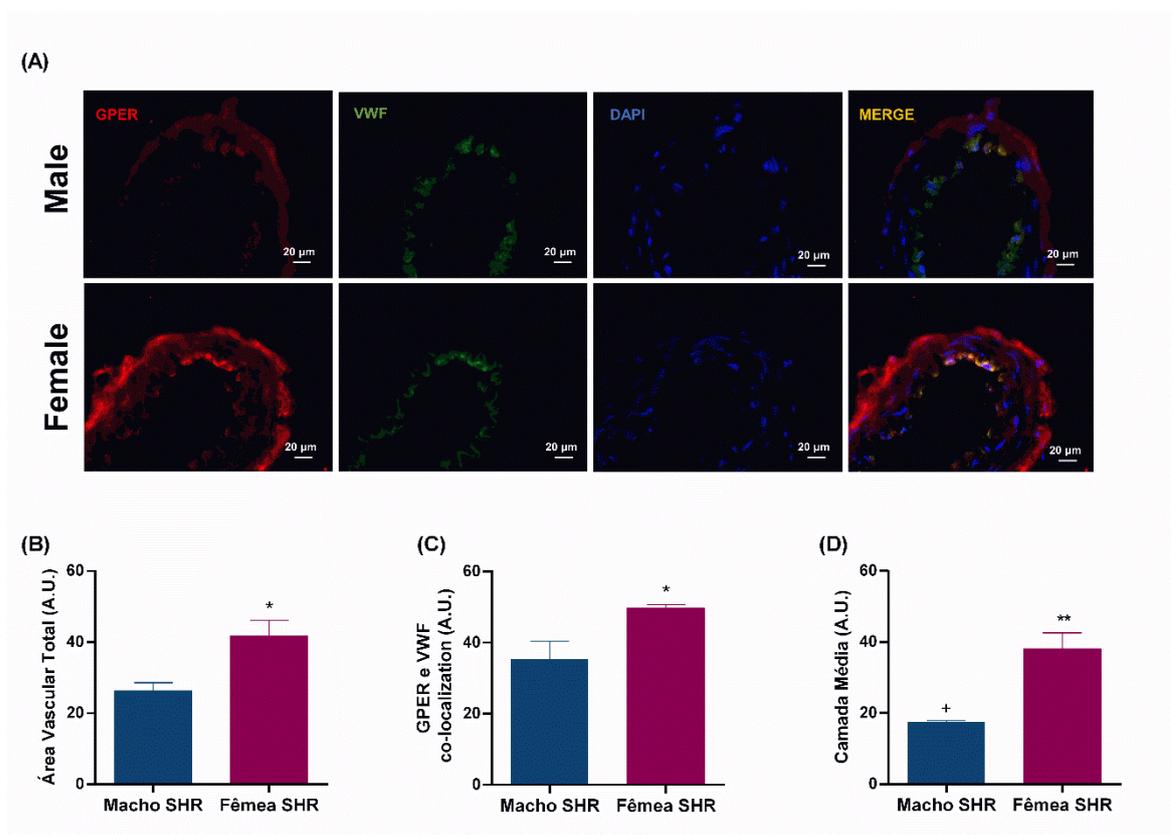


Figura 21 - Maior intensidade de fluorescência para o GPER em artérias mesentéricas de resistência de SHR Fêmeas em comparação com os machos. Imunolocalização para GPER (A) e quantificação da fluorescência na área total vascular (B) endotélio (C) e no músculo liso vascular (D) em Macho (n = 5) e Fêmea (n = 4) SHR. Barra de escala = 20 μm . Valores foram expressos como média \pm EPM. * $P < 0,05$ comparado com o grupo Macho SHR e + $P < 0,05$ comparado com a marcação de intensidade de fluorescência na camada endotelial (VWF) do grupo Macho SHR. Análise estatística foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

4.3 AVALIAÇÃO *IN SITU* DA PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂) E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)

A análise de fluorescência para H₂O₂ em artérias mesentéricas de resistência de SHR não indicou diferenças entre os sexos (Macho SHR: 148 ± 23 e Fêmea: 137 ± 40 U.A.) em condições basais, embora o G-1 tenha sido capaz de estimular a sua produção em ambos os sexos (Macho SHR: 295 ± 20 e Fêmea SHR: 283 ± 50 U.A., P < 0,05). Além disso, como controle para mostrar que era o H₂O₂ que estava sendo produzido, utilizamos a catalase (Macho SHR: 74 ± 9 e Fêmea SHR: 70 ± 24 U.A., P < 0,05) (**Figura 22**).

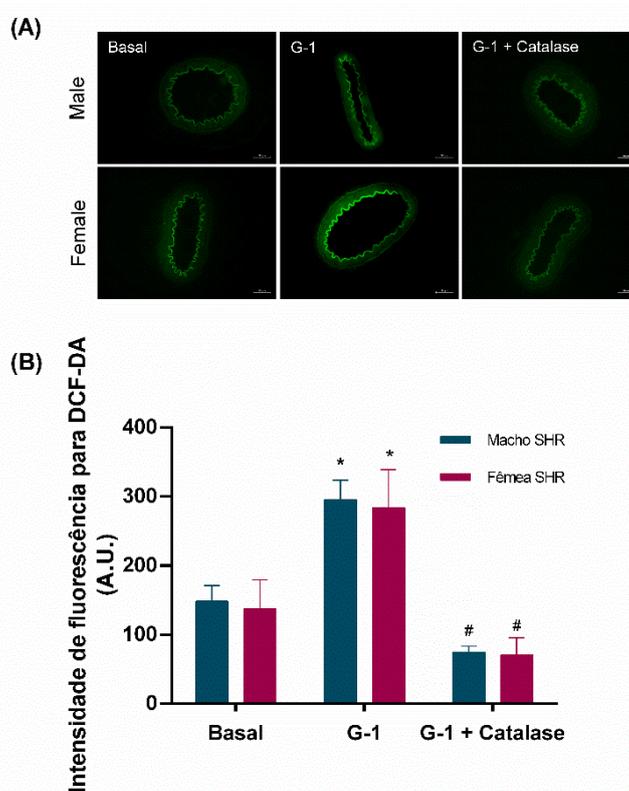


Figura 22 - (A) Análise da microscopia de fluorescência emitida pelo H₂DCF-DA em artérias mesentéricas de resistência de SHR. Os protocolos foram realizados na ausência e presença de G-1 (10 µM) e catalase (1000 unid./mL). **(B) Quantificação da fluorescência produzida nos grupos Macho (n = 5) e Fêmea (n = 6) SHR.** Barra de escala = 50 µm. Valores foram expressos como média ± EPM. * P < 0.05 comparado com a condição basal do mesmo grupo e # P < 0.05 comparado com estimulação com G-1 do mesmo grupo. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo *Sidak post hoc test*.

Em relação à análise de fluorescência para EROs, também não encontramos diferenças entre machos e fêmeas SHR (Macho SHR: 137 ± 30 e Fêmea SHR: 142 ± 15 U.A.) em condições basais, bem como na presença do G-1 (Macho SHR: 145 ± 11 e Fêmea SHR: 172 ± 28 U.A.). Como controle, utilizamos um sequestrador de EROs, o tiron, que como esperado, reduziu a intensidade de fluorescência de EROs em ambos os sexos (Macho SHR: 57 ± 8 e Fêmea SHR: 77 ± 14 U.A., $P < 0,05$) (Figura 23).

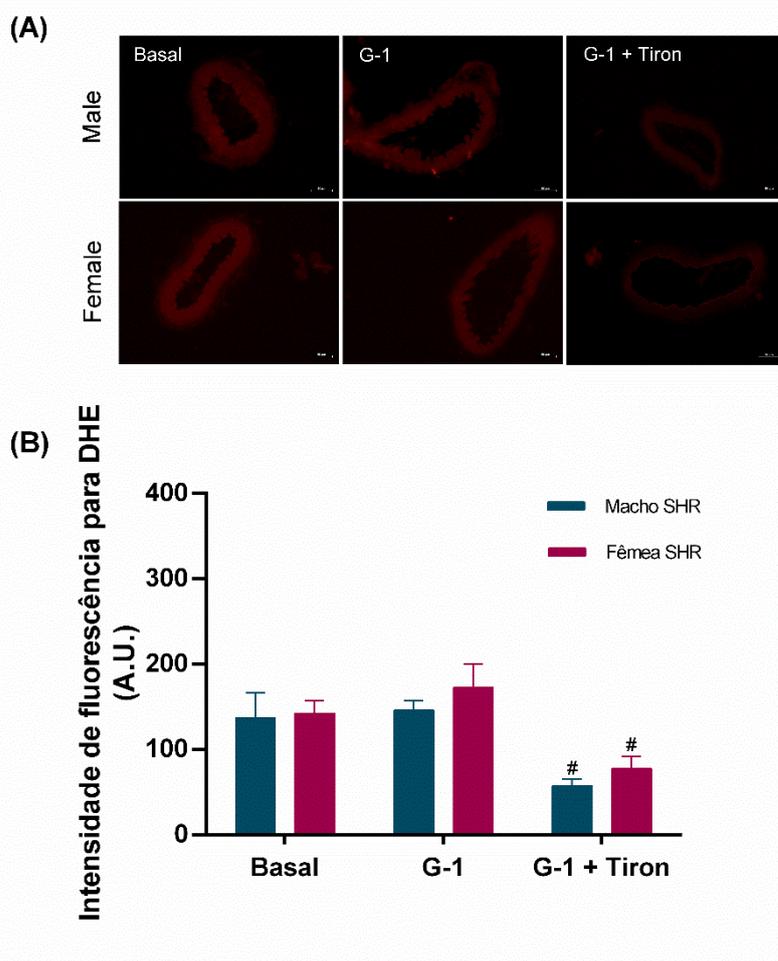


Figura 23 - (A) Análise da microscopia de fluorescência emitida pelo DHE em artérias mesentéricas de resistência de SHR. Os protocolos foram realizados na ausência e presença de G-1 (10 μ M) e Tiron (10 μ M). (B) Quantificação da fluorescência produzida nos grupos Macho (n = 5) e Fêmea (n = 6) SHR. Barra de escala = 50 μ m. Valores foram expressos como média \pm EPM. # $P < 0.05$ comparado com estimulação com G-1 do mesmo grupo. Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo Sidak *post hoc test*.

4.4 WESTERN BLOT PARA O GPER

As análises de *Western blot* mostraram que não há diferença sexual na expressão do GPER em SHR (**Figura 24**). Podemos observar que tanto machos quanto fêmeas expressaram a mesma quantidade de proteínas para o GPER (Macho SHR: $0,031 \pm 0,005$ e Fêmea SHR: $0,025 \pm 0,007$ U.A.).

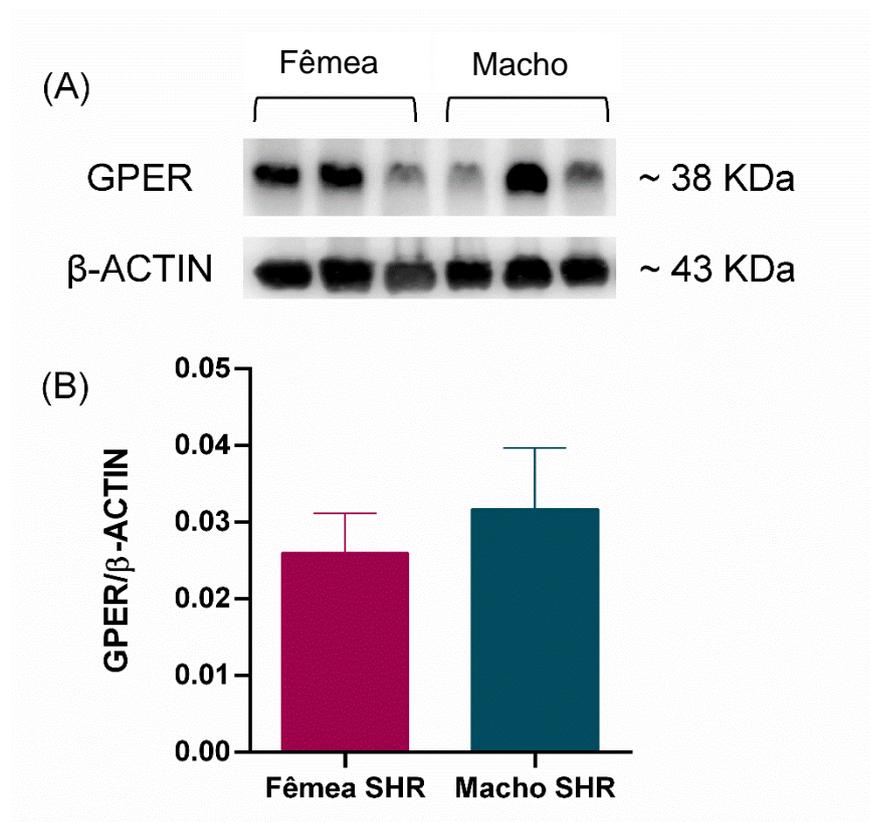


Figura 24 - Quantificação dos níveis de expressão relativa do (A) GPER (38 kDa) normalizado pela (B) β -actina (43 kDa) em artérias mesentéricas de SHR de ambos os sexos. Análise representativa de *Western blot* de artérias de resistência mesentérica em Fêmea (n = 6) e Macho (n = 6) SHR. Os valores foram expressos como média \pm EPM. Para a análise estatística foi utilizado o teste t de *Student* não pareado.

4.5 REATIVIDADE VASCULAR- INCUBAÇÃO COM G-1

4.5.1 Reatividade vascular em fêmeas

Para os protocolos de incubação, observamos primeiramente em fêmeas (**Figura 25**) que somente a presença de 0,1 μM de G-1 foi capaz de aumentar a AUC (Curva controle: $279,5 \pm 9$; 0,1 μM G-1: 332 ± 12 e 10 μM G-1: 312 ± 18 U.A., $P < 0,05$) porém, nenhuma das concentrações de G-1 utilizadas foram capazes de alterar a resposta de relaxamento máximo (Curva controle: $97 \pm 0,5$; 0,1 μM G-1: $97 \pm 0,8$ e 10 μM G-1: $93 \pm 1,8$ %) (**Figura 25A, B e C**). Em relação às curvas de contração induzidas pela PE, as concentrações de 0,1 e 10 μM de G-1 foram capazes de desviar a curva para direita (Curva controle: $7,1 \pm 0,01$; 0,1 μM G-1: $5,6 \pm 0,07$ e 10 μM G-1: $6,6 \pm 0,1$ M, $P < 0,05$). Os valores de AUC reduziram em presença das diferentes concentrações de G-1 (Curva controle: 29 ± 2 ; 0,1 μM G-1: $21 \pm 1,6$ e 10 μM G-1: $15 \pm 1,3$ U.A., $P < 0,05$) e somente a concentração de 10 μM de G-1 reduziu a resposta de contração máxima (Curva controle: 13 ± 1 ; 0,1 μM G-1: $12 \pm 0,6$ e 10 μM G-1: 6 ± 2 mN, $P < 0,05$) em fêmeas SHR (**Figura 25D, E e F**).

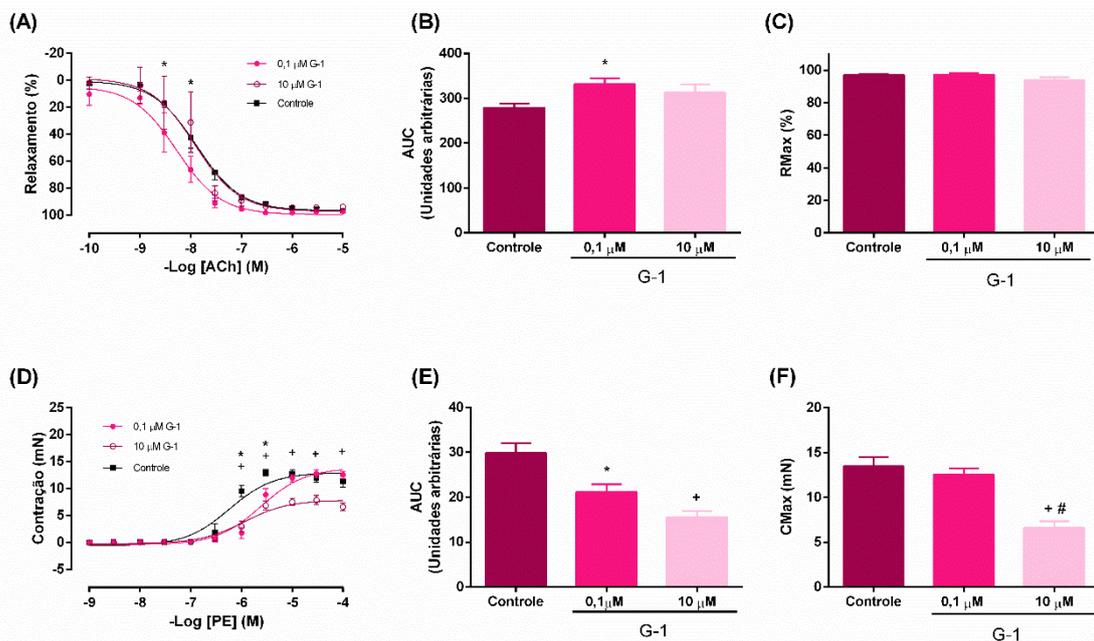


Figura 25 - Reatividade vascular à acetilcolina (ACh, 0,1 nM - 10 μM) e a fenilefrina (PE, 1 nM - 100 μM) em artérias mesentéricas de resistência em Fêmeas SHR. (A) Curva concentração-resposta à ACh após incubações com 0,1 e 10 μM de G-1, **(B)** área abaixo da curva (AUC) e **(C)** resposta de relaxamento máximo à ACh (RM_{Max}.) (n = 6). **(D)** Curva concentração-resposta à PE após incubações com 0,1 e 10 μM de G-1, **(E)** área abaixo da curva (AUC) e **(F)** resposta de

contração máxima à PE (E_{max}) ($n = 8$). Os valores foram expressos como média \pm EPM. * 0,1 μM comparado com controle, + 10 μM comparado com controle e 10 μM comparado com 0,1 μM . A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo Sidak *post hoc test*. Para AUC a estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo Tukey *post hoc test*.

4.5.2 Reatividade vascular em machos

Em machos (**Figura 26**) a presença de G-1 não foi capaz de alterar a resposta de relaxamento induzida pela ACh (Curva controle: 97 ± 1 ; 0,1 μM G-1: 95 ± 2 e 10 μM G-1: $94 \pm 1,7$ %) e nem nos valores de AUC (Curva controle: 318 ± 15 ; 0,1 μM G-1: 294 ± 10 e 10 μM G-1: 309 ± 10 U.A.) (**Figura 26A, B e C**). Na resposta de contração induzida pela PE, observamos que somente a presença de 0,1 μM de G-1 foi capaz de aumentar a E_{max} contrátil (Curva controle: $11 \pm 0,4$; 0,1 μM G-1: $14 \pm 0,9$ e 10 μM G-1: 10 ± 1 mN, $P < 0,05$) e não observamos diferenças na AUC (Curva controle: $23 \pm 1,6$; 0,1 μM G-1: $23 \pm 1,7$ e 10 μM G-1: $20 \pm 1,6$ U.A.) (**Figura 26D, E e F**).

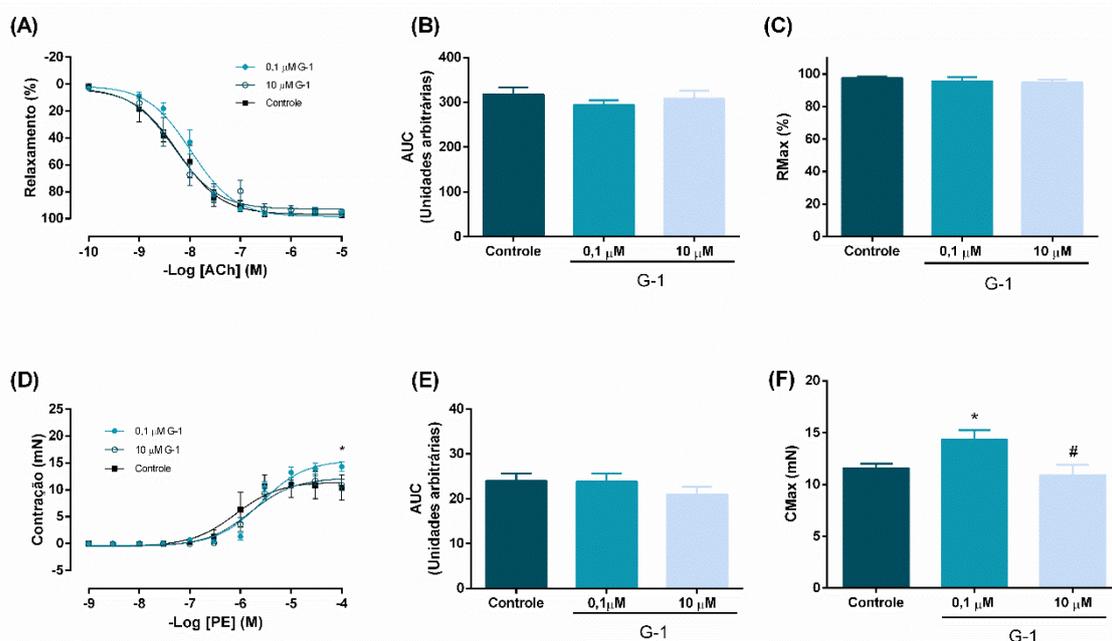


Figura 26 - Reatividade vascular à acetilcolina (ACh, 0,1 nM - 10 μM) e a fenilefrina (PE, 1 nM - 100 μM) em artérias mesentéricas de resistência em Machos SHR. (A) Curva concentração-resposta à ACh após incubações com 0,1 e 10 μM de G-1, (B) área abaixo da curva (AUC) e (C) resposta de relaxamento máximo à ACh (RM_{ax}) ($n = 6$). (D) Curva concentração-resposta à PE

após incubações com 0,1 e 10 μM de G-1, **(E)** área abaixo da curva (AUC) e **(F)** resposta de contração máxima à PE (E_{max}) ($n = 8$). Os valores foram expressos como média \pm EPM. * 0,1 μM comparado com controle e # 10 μM comparado com 0,1 μM . A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo Sidak *post hoc test*. Para AUC a estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo Tukey *post hoc test*.

4.5.3 Diferença sexual na resposta de relaxamento induzida pela ACh

Observamos que a presença de G-1 foi capaz de alterar a resposta de relaxamento induzida pela ACh, porém observamos também que estas alterações são diferentes entre os sexos. Podemos observar na **Figura 27 A e B** que a presença de 0,1 μM de G-1 reduziu a AUC em machos SHR quando comparados com as fêmeas SHR (Fêmea SHR: 332 \pm 12 e Macho SHR: 294 \pm 10 U.A., $P < 0,05$). Por outro lado, a concentração de 10 μM de G-1 não provocou diferença sexual no relaxamento (Fêmea SHR: 312 \pm 18 e Macho SHR: 309 \pm 17 U.A.) como indicado na **Figura 27C e D**.

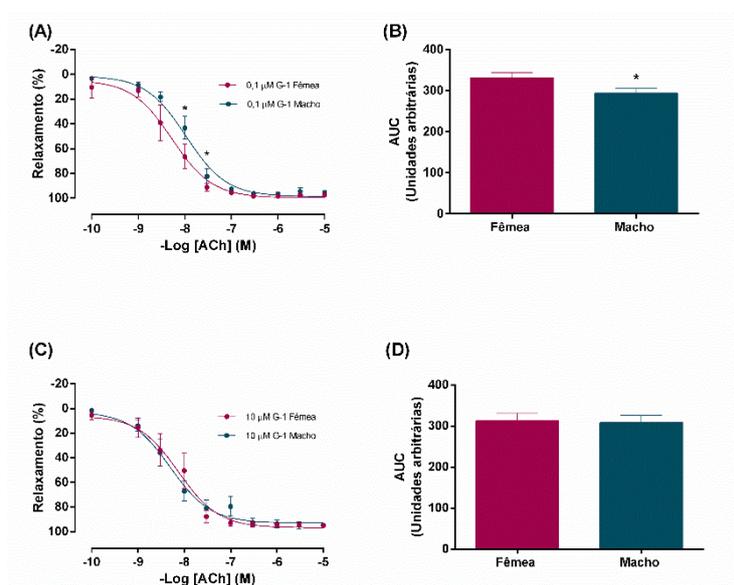


Figura 27 - Reatividade vascular à acetilcolina (ACh, 0,1 nM - 10 μM) em artérias mesentéricas de resistência em Fêmeas e Machos SHR. Curva concentração-resposta à ACh após incubações com **(A)** 0,1 μM e **(C)** 10 μM de G-1, **(B)** e **(D)** área abaixo da curva (AUC) ($n = 6$). Os valores foram expressos como média \pm EPM. * comparado com o grupo Fêmea SHR. A análise estatística foi

realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo Sidak *post hoc* test. Para a análise estatística da AUC foi utilizado o teste t de *Student* não pareado.

4.5.4 Diferença sexual na resposta de contração induzida pela PE

Observamos também que a presença de G-1 modificou a resposta a resposta de contração induzida pela PE, diferentemente entre os sexos. De acordo com a **Figura 28A e B**, mesmo que a presença de 0,1 μM de G-1 não tenha gerado essa diferença na resposta de contração e na AUC (Fêmea SHR: $21 \pm 1,6$ e Macho SHR: $23 \pm 1,7$ U.A.), a presença de 10 μM de G-1 fez com as fêmeas SHR apresentassem uma resposta de contração menor em comparação aos machos (Fêmea SHR: $6 \pm 0,7$ e Macho SHR: $11,5 \pm 0,4$ mN, $P < 0,05$). Além disso, os machos apresentaram uma redução na AUC em comparação com as fêmeas SHR (Fêmea SHR: $30 \pm 2,2$ e Macho SHR: $20 \pm 1,6$ U.A., $P < 0,05$).

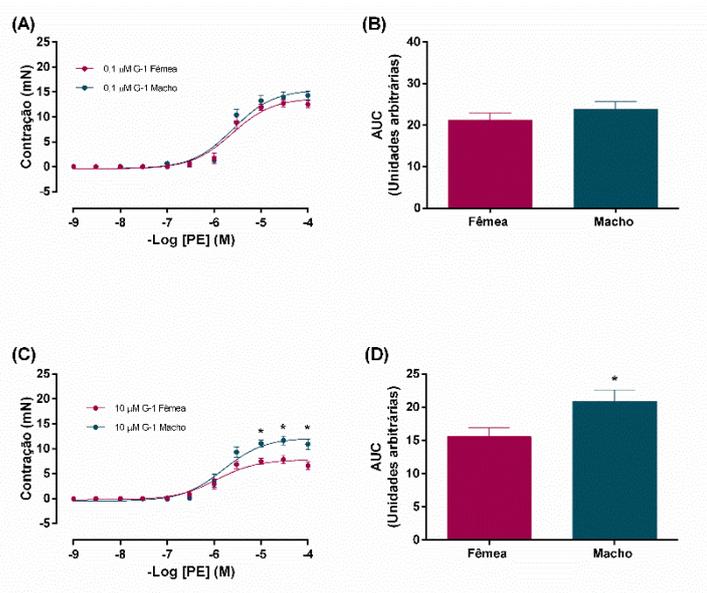


Figura 28 - Reatividade vascular à fenilefrina (PE, 1 nM - 100 μM) em artérias mesentéricas de resistência em Fêmeas e Machos SHR. Curva concentração-resposta à PE após incubações com **(A)** 0,1 μM e **(C)** 10 μM de G-1, **(B)** e **(D)** área abaixo da curva (AUC) ($n = 6$). Os valores foram expressos como média \pm EPM. * comparado com o grupo Fêmea SHR. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo Sidak *post hoc* test. Para a análise estatística da AUC foi utilizado o teste t de *Student* não pareado.

4.6. TRATAMENTO SUBAGUDO COM G36

4.6.1. Dados ponderais

O tratamento com G36 durante 15 dias não alterou o peso corporal e dos órgãos das ratas. Somente o ovário esquerdo e a suprarrenal esquerda apresentaram uma redução em seus pesos (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Dados ponderais de SHR fêmeas dos grupos veículo e tratadas com G36 durante 15 dias.

| GRUPOS | Veículo (n = 5) | | G36 (n = 5) | |
|--------------------------------|-----------------|-------|-------------|-------|
| | Média | EPM | Média | EPM |
| Peso corpóreo (g) | 185 | 2 | 190 | 3 |
| Peso útero úmido/tíbia (mg/mm) | 10,38 | 0,001 | 9,05 | 0,001 |
| Peso útero seco /tíbia | 1,838 | 0,001 | 1,718 | 0,001 |
| Ovário direito (mg/mm) | 59,38 | 0,004 | 54,1 | 0,004 |
| Ovário esquerdo (mg/mm) | 57,0 | 0,003 | 25,65* | 0,007 |
| Hipófise (mg/mm) | 9,5 | 0,001 | 7,75 | 0,001 |
| Rim direito (mg/mm) | 671,0 | 0,01 | 659,0 | 0,01 |
| Rim esquerdo (mg/mm) | 680,5 | 0,001 | 669,5 | 0,001 |
| Suprarrenal direita (mg/mm) | 17,58 | 0,001 | 16,1 | 0,001 |
| Suprarrenal esquerda (mg/mm) | 22,74 | 0,001 | 18,06* | 0,001 |
| Fígado (g/mm) | 8,057 | 0,1 | 8,287 | 0,1 |
| Pulmão úmido (g) | 1,825 | 0,1 | 1,730 | 0,1 |
| Pulmão seco (mg/mm) | 335,6 | 0,02 | 300,2 | 0,02 |
| Coxim perirenal (mg/mm) | 0,591,7 | 0,05 | 712,0 | 0,1 |
| Coxim retroperitoneal (mg/mm) | 0,488,0 | 0,03 | 591,8 | 0,03 |
| Coxim parametrial (g/mm) | 1,323 | 0,06 | 1,405 | 0,1 |

Os valores foram expressos como média \pm EPM. Na tabela são apresentados dados relativos, de modo que o peso em miligramas (mg) dos órgãos, foi corrigido pelo comprimento da tíbia, em milímetro (mm). A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way ANOVA*) seguida pelo *Tukey's Post Hoc test*. *P < 0,05 comparado com animais Sham do mesmo grupo.

4.6.2. Parâmetros hemodinâmicos

O tratamento subagudo com G36 não alterou os valores de pressão arterial sistólica, diastólica, média e frequência cardíaca de fêmeas SHR (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Parâmetros hemodinâmicos de SHR fêmeas dos grupos Veículo e tratadas com G36 durante 15 dias.

| GRUPOS | Início do tratamento | | | | Final do tratamento | | | |
|------------|----------------------|-----|-----|-----|---------------------|-----|-----|-----|
| | Veículo | EPM | G36 | EPM | Veículo | EPM | G36 | EPM |
| PAS (mmHg) | 182 | 3,7 | 189 | 3,3 | 175 | 3,6 | 186 | 4,1 |
| PAD (mmHg) | 145 | 3,5 | 136 | 3,5 | 132 | 7,5 | 141 | 5,4 |
| PAM (mmHg) | 157 | 3,6 | 154 | 3,3 | 144 | 4,9 | 155 | 4,9 |
| FC (bpm) | 337 | 5,8 | 334 | 4,4 | 357 | 11 | 347 | 10 |

Os valores foram expressos como média \pm EPM. Na tabela são apresentados dados relativos, de modo que o peso em miligramas (mg) dos órgãos, foi corrigido pelo comprimento da tíbia, em milímetro (mm). Análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 1 via (*one-way* ANOVA) seguida pelo *Tukey's Post Hoc test*. * $p < 0,05$ comparado com animais Sham do mesmo grupo.

4.6.3. Reatividade vascular

Os dados de reatividade vascular de artérias mesentéricas de resistência indicaram que o tratamento com G36 não foi capaz de alterar o relaxamento induzido pela BK como observado na **Figura 29A**. Na curva de contração induzida pela PE não foram observadas alterações com o tratamento como indicado na **Figura 29B**.

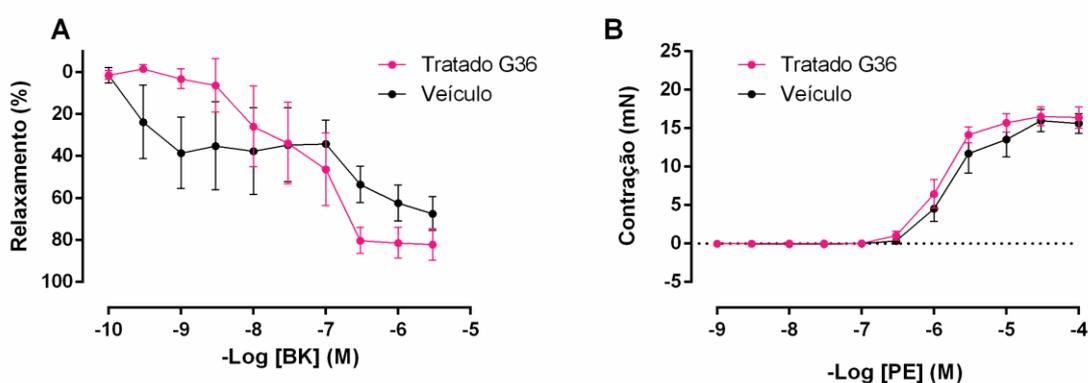


Figura 29 - Reatividade vascular à bradicinina (BK, 0,1 nM - 10 μ M) e a fenilefrina (PE, 1 nM - 100 μ M) em artérias mesentéricas de resistência de Fêmeas SHR após tratamento G36. (A) Curva concentração-resposta à BK e (B) Curva concentração-resposta à PE em ratas hipertensas tratadas com 160 mg/Kg (*i.p.*) de G36 ou veículo (óleo de girassol) durante 15 dias (n = 6). Os valores foram expressos como média \pm EPM. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (*two-way ANOVA*) seguida pelo Sidak *post hoc test* e o teste t de *Student* não pareado.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que a ativação do GPER promoveu relaxamento em artérias de resistência mesentérica de machos e fêmeas SHR de forma similar, porém com a participação de diferentes mediadores endoteliais. Os machos parecem ser mais dependentes da via do NO não endotelial, prostanoídes e via do H_2O_2 , e as fêmeas parecem ser mais dependentes do endotélio e do H_2O_2 .

Nossa primeira observação foi que o relaxamento induzido pelo G-1 foi semelhante em ambos os sexos. A resposta de relaxamento induzida por G-1 também foi detectada em outros segmentos arteriais, bem como em outras espécies, como coronárias de suínos (YU et al., 2014), artérias mesentéricas de resistência de ratos Lewis intactos (LINDSEY; LIU; CHAPPELL, 2014), segmentos aórticos de ratos (JANG et al., 2013), segmentos de artérias cerebrais de ratos (MURATA et al., 2013) e recentemente, em artérias coronárias de suínos (YU et al., 2017, 2018). Esta mesma resposta também foi observada em estudos clínicos (AREFIN et al., 2014) e moleculares realizados com células endoteliais humanas (FREDETTE; MEYER; PROSSNITZ, 2018). Porém, o nosso estudo é o primeiro a demonstrar o relaxamento induzido pelo G-1 na hipertensão. Ademais, a não observação de diferenças sexuais também foi observada em artérias mesentéricas de animais normotensos (PEIXOTO et al., 2017) e em carótidas de ratos normotensos (BROUGHTON; MILLER; SOBEY, 2010). Por outro lado, outro estudo do nosso grupo demonstrou que o relaxamento induzido pelo G-1 no leito vascular coronariano de ratos foi maior nas fêmeas em comparação com os machos, efeito explicado pela maior presença de EROs nos machos (DEBORTOLI et al., 2017). Portanto, as diferenças sexuais relacionadas ao efeito vasodilatador do G-1, podem ser dependentes do leito vascular estudado.

Outro achado deste estudo foi que a resposta de relaxamento induzida pelo G-1 é parcialmente dependente do endotélio em fêmeas, pois após a remoção endotelial o relaxamento foi prejudicado somente nesse grupo. Estudos prévios encontraram também uma maior dependência do endotélio na resposta vasodilatadora induzida pelo G-1 nas fêmeas em artérias coronárias (YU et al.,

2011a) e mesentéricas de animais normotensos (PEIXOTO et al., 2017). Vários estudos demonstraram que as respostas de relaxamento mediadas pelo GPER são dependentes do endotélio e da via do NO (FREDETTE; MEYER; PROSSNITZ, 2018), bem como do aumento da expressão proteica de eNOS (AREFIN et al., 2014). Estudos prévios demonstraram que o endotélio desempenha um papel importante na manutenção do tônus vascular, sintetizando e liberando vários EDRF, ou seja, NO, PNs e EDH (FÉLÉTOU; HUANG; VANHOUTTE 2011; LEUNG e VANHOUTTE 2017; VANHOUTTE et al., 2017).

Não obstante, a ativação do GPER também pode modular as concentrações de Ca^{2+} no MLV (MURATA et al., 2013). De fato, Lindsey et al. (2014) observaram um vasorelaxamento por meio de mecanismo dependente do endotélio e também por ação direta sobre MLV em artérias de resistência mesentérica de ratas Lewis após a ativação de GPER. No MLV, esta ativação estimula a proteína G que via subunidade α ativa a adenilil ciclase (AC) aumentando os níveis de 3', 5'-adenosina monofosfato cíclico (cAMP). A elevação dos níveis de cAMP desencadeia subsequentes fosforilações de proteínas quinases (PKA) que diminuem o estado contrátil do MLV. Além disso, a ativação do GPER também pode antagonizar a mobilização do cálcio intracelular estimuladas por agonistas vasoconstritores (HAAS et al., 2009). No entanto, o objetivo deste estudo foi elucidar as vias endoteliais envolvidas no relaxamento mediado pelo GPER, ou seja, quais mediadores endoteliais estariam envolvidos nesta resposta.

Primeiro, testamos a via do NO após a incubação com L-NAME, um inibidor não seletivo de NOS. Observamos uma redução da resposta vasodilatadora, refletida pela AUC, porém apenas nos machos SHR. Embora, uma forte participação do NO no relaxamento induzido pelo G-1 tenha sido relatada anteriormente em ambos os sexos (BROUGHTON; MILLER; SOBEY, 2010; LINDSEY; LIU; CHAPPELL, 2014; PEIXOTO et al., 2017), na hipertensão, o envolvimento da via do NO parece ser dependente do sexo. Fredette; Meyer e Prossnitz (2018) demonstraram que a produção do NO induzido pelo G-1 requer a ativação de c-Src e EGFR, bem como PI3K e ERK1/2. Além disso, esse mesmo estudo demonstrou que o G-1 não induziu o relaxamento em camundongos *knockout* para GPER. Peixoto et al. (2017) também encontraram que a via de relaxamento dependente do endotélio requer a ativação da via PI3K/Akt em artérias

mesentéricas de animais normotensos de ambos os sexos. Em nosso estudo não foi possível avaliar essa via, devido à perda de tônus após a pré-contração em segmentos mesentéricos incubados com o inibidor dessa via, o LY-294,002.

A dupla inibição com L-NAME mais indometacina não prejudicou o relaxamento induzido pelo G-1 em ambos os sexos, sugerindo que a EDH possa estar envolvida nessa resposta. Enfatizamos que, nas artérias de resistência, as vias de EDH desempenham um papel importante na regulação da resistência vascular periférica (OHASHI et al., 2012; SHIMOKAWA et al., 1996) e, conseqüentemente, nos valores da pressão arterial. Portanto, esclarecimentos sobre a EDH e seu papel nos mecanismos de controle da pressão arterial são importantes. Dentro desse contexto, foi demonstrado que as respostas mediadas pelo NO são dominantes nas artérias de condutância, enquanto a EDH se tornaria mais importante à medida que o calibre das artérias reduzisse (COR DE WIT; WOLFLE, 2007; SHIMOKAWA et al., 1996). Na hipertensão, o relaxamento dependente do endotélio está prejudicado devido a disfunção endotelial, que mesmo com controversas é caracterizada pela redução da biodisponibilidade do NO. Estudo tem demonstrado que a presença do NO reduz as respostas provocadas pela EDH, portanto quando a via do NO está prejudicada as respostas mediadas por EDH são geralmente preservadas ou mesmo aumentadas para manter a homeostase vascular (KOBUCHI et al., 2015). Assim, a EDH é considerada um sistema de *backup* para as respostas mediadas pelo NO na manutenção da perfusão tecidual. Portanto, elucidar o papel da EDH nestas artérias é extremamente importante para entender os mecanismos envolvidos na hipertensão (KOBUCHI et al., 2015; MORI et al., 2006; NISHIKAWA; STEPP; CHILIAN, 2000).

A EDH foi descrita pela primeira vez em 1988 por Taylor e Weston, que demonstraram que o endotélio era capaz de sintetizar uma substância difusível que promovia hiperpolarização do MLV (TAYLOR; WESTON, 1988). As vias de EDH incluem o peptídeo natriurético do tipo C (CHAUHAN et al., 2003), ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) (FISSITHALER et al., 1999; FLEMING, 2000), sulfato de hidrogênio (H₂S) (ZHAO et al., 2001), íons potássio (K⁺) (EDWARDS et al., 1998), e comunicação elétrica através das junções mioendoteliais (KÜHBERGER et al., 1994). Esses mecanismos ativam diferentes famílias de canais de K⁺, levando à

hiperpolarização das células do MLV, contribuindo para mecanismos que promovem o relaxamento (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2009; SHIMOKAWA; MORIKAWA, 2005). Portanto, para identificarmos quais vias da EDH poderiam estar envolvidas na resposta de relaxamento induzida pelo G-1, testamos primeiramente a contribuição da enzima citocromo P450 utilizando um inibidor não seletivo, clotrimazol, e observamos que não houve a participação dessa via em ambos os sexos. Estudos apontaram o envolvimento da via da citocromo P450 como EDH (TRIGGLE et al., 2012) em artérias coronárias de porcos (FLEMING et al., 2001). Em microvasos mesentéricos de ratos Zucker obesos resistentes à insulina, uma regulação negativa das epoxigenases CYP foi associada à função vasodilatadora prejudicada, sugerindo um envolvimento de metabólitos derivados de CYP nas respostas vasodilatadoras mediadas por EDH (ZHAO et al., 2005). No entanto, no relaxamento induzido por G-1 nas artérias mesentéricas de SHR, a resposta mediada pela via da citocromo P450 parece não estar envolvida.

Outra EDH estudada foi a do H_2O_2 , e observamos que a resposta vasodilatadora foi prejudicada após incubações conjugadas com L-NAME, INDO e catalase em ambos os sexos. De acordo com Matoba e Shimokawa (2003), em segmentos arteriais de artérias mesentéricas de resistência, o H_2O_2 é considerado uma via de EDH. Embora, não tenhamos observado diferenças sexuais nestas respostas, Wong et al. (2015) encontraram maior dependência da via do NO e menor participação da via de EDH em machos, ao contrário das fêmeas, em que a via de EDH foi predominante. Essa maior dependência da via de EDH em fêmeas foi explicada pela maior expressão da SOD, melhor operação das junções comunicantes, uma vez que a presença de um desacoplador de junções reduziu a resposta de relaxamento dependente do endotélio e uma maior probabilidade de abertura dos canais para potássio ativados por cálcio de condutância intermediária (IK_{Ca}). Além disso, as fêmeas apresentam um aumento da atividade e expressão de NOX4, complexo enzimático produtor direto do H_2O_2 (RAY et al., 2011).

Analisamos também as ações do H_2O_2 preservando a via do NO e a dos PNs. Sendo assim, os segmentos arteriais foram incubados apenas com catalase e observamos que os machos mostraram um aumento na resposta de relaxamento máximo, bem como na AUC e nas fêmeas a resposta permaneceu inalterada. H_2O_2 tem um papel importante no *cross-talk* entre NOS e COX: em baixas concentrações,

H₂O₂ aumenta a atividade de NOS, enquanto que em altas concentrações aumenta principalmente a atividade de COX endotelial (SILVA et al., 2017). Os vasos de SHR têm disfunção endotelial característica, não apenas devido à diminuição da liberação de EDRFs, mas também como resultado da liberação simultânea de EDCFs. Realmente, o estudo de Luscher e Vanhoutte, (1986) demonstrou que a indometacina restaurou o relaxamento dependente do endotélio em aorta de SHR, sugerindo que estes EDCFs são produtos da COX em machos SHR. Em SHR há um aumento da produção de PNs vasoconstritores induzidos pela COX (FÉLÉTOU; VERBEUREN; VANHOUTTE, 2009). A liberação de EDCFs é exacerbada na hipertensão, e os inibidores seletivos de COX abolem a contração dependente do endotélio em SHR (SILVA; PERNOMIAN; BENDHACK, 2012; TANG; VANHOUTTE, 2009). Além disso, a PGI₂ induz vasodilatação em um contexto fisiológico, enquanto em animais idosos ou hipertensos (SHR) induz vasoconstrição (VANHOUTTE, 2011). No presente estudo, o aumento da resposta de relaxamento induzida pelo G-1 após a incubação com a catalase pode estar relacionada à redução da atividade da COX devido à redução das concentrações de H₂O₂ e, conseqüentemente, à redução da formação de PNs vasoconstritores. Estes resultados são semelhantes aos obtidos na incubação com indometacina. Não encontramos o mesmo resultado em fêmeas, provavelmente devido a capacidade do estrogênio em modular negativamente a produção de PNs vasoconstritores (DANTAS et al., 1999).

Verificamos também a participação dos canais para K⁺ e observamos que a presença de um bloqueador não seletivo desses canais, TEA a 5 mM, não alterou a resposta de relaxamento induzido pelo G-1 em ambos os sexos. Peixoto et al. (2017) observaram que na presença da mesma concentração de TEA, a resposta de relaxamento induzida pelo G-1 foi atenuada em ambos os sexos. Em miócitos arteriais coronarianos, a ativação do GPER aumentou a probabilidade de abertura dos canais para potássio ativados por cálcio de larga condutância (BK_{Ca}) levando à vasodilatação (YU et al., 2011b). Por outro lado, Evanson et al. (2018), mostraram que o G-1 suprimiu diretamente a ativação e a corrente desses mesmos canais em miócitos arteriais cerebrais. No entanto, em nosso estudo não foram observados prejuízos na resposta de relaxamento induzido pelo G-1, indicando que os canais para K⁺ parecem não participar dessa resposta. Porém, ressaltamos que protocolos

com bloqueios específicos para esses canais são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos na resposta de relaxamento induzida pelo G-1, uma vez que os mesmos compreendem a principal via de ação do H₂O₂ (BARLOW; WHITE, 1998).

Por meio da técnica de imunolocalização, observamos a presença do GPER tanto em células endoteliais como no MLV de segmentos arteriais mesentéricos de SHR em ambos os sexos. Por outro lado, não observamos diferença sexual na expressão proteica para o GPER. A presença do GPER no MLV indica que o G-1 pode induzir respostas de relaxamento mediante mecanismos dependentes do endotélio ou ações diretas sobre o MLV. Essas ações podem ocorrer por modulação da atividade dos canais para K⁺, como descrito por Yu et al. (2011b, 2018) ou por ações sobre a mobilização do Ca²⁺ nessas células uma vez que os efeitos da nifedipina sobre os canais para Ca²⁺ do tipo L foram similares ao do G-1 (HOLM et al., 2013). Além disso, a ativação do GPER pode reduzir a sensibilidade do miofilamento ao Ca²⁺ (HAN et al., 2013). Meyer et al. (2012) observou que animais *knockout* para GPER apresentaram um aumento da contratilidade induzida pela endotelina-1 (ET-1), sugerindo um aumento na sensibilidade da força do miofilamento ao Ca²⁺, porém não observou uma redução da mobilização do Ca²⁺ em presença de 3 µM de G-1 em artérias carótidas tanto nos animais *wildtype* quanto nos animais deficientes de GPER. Sendo assim, as avaliações tanto da mobilização quanto na sensibilidade do Ca²⁺ são essenciais para melhor elucidar os mecanismos envolvidos na resposta de relaxamento induzida pelo G-1 em SHR.

Nossos resultados de fluorescência demonstraram que a ativação do GPER é capaz de aumentar a intensidade de fluorescência para H₂O₂ em machos e fêmeas, embora não tenha aumentado as EROs. Peixoto et al. (2018) também não encontraram aumento nas EROs após estimulação com G-1 nas artérias de mesentéricas de resistência de ratos normotensos de ambos os sexos, diferente em carótidas e artérias intracranianas cerebrais, onde o G-1 foi capaz de reduzir a formação de EROs. (BROUGHTON; MILLER; SOBEY, 2010) Por outro lado, Debortoli et al. (2017) observaram um aumento nas EROs em artérias coronárias de ratos normotensos de machos, e Yao e Abdel-Rahman (2016) mostraram que o bloqueio do GPER atenuou o aumento de EROs induzidos pelo etanol. Em suma, o efeito do GPER no estresse oxidativo não está totalmente elucidado. Meyer et al.

(2016) demonstraram que a ablação genética total do GPER é capaz de reduzir o estresse oxidativo, prevenindo a hipertensão induzida pela angiotensina II. De forma interessante, Meyer e Barton (2018) até sugeriram o uso do antagonista específico do GPER, o G36, como uma nova terapia para doenças cardiovasculares, devido à sua capacidade de reduzir a formação de EROs. Inclusive, este estudo foi um dos responsáveis pelo desenvolvimento do terceiro protocolo que foi o tratamento com G36.

Sabemos que o estrogênio exerce efeitos protetores sobre os vasos e uma parte dessa proteção pode estar relacionada com a sua capacidade de modular respostas de agonistas vasodilatadores e vasoconstritores. Portanto, para verificar se a ativação do GPER poderia modular as respostas desses agonistas, foi proposto para o presente estudo o protocolo de incubação com o G-1. De acordo com os resultados, observamos que a presença de 0,1 μM de G-1 foi capaz de alterar o padrão de relaxamento induzido pela ACh somente na fêmea. No entanto, verificamos que as diferentes concentrações de G-1 foram capazes de atenuar a vasoconstrição induzida pela PE em ambos os sexos com maior evidência nas fêmeas. Meyer et al. (2010) também observaram que a presença de 3 μM de G-1 reduziu contrações induzidas pela endotelina-1 em artérias coronárias de porco. A atenuação da resposta vasoconstritora induzida pela PE pode estar relacionada a uma redução na formação de PNs vasoconstritores. Uma vez que a presença do estrogênio é capaz de inibir a produção de PNs vasoconstritores como o tromboxano A2 em células endoteliais, efeito este que foi bloqueado pelo G36, indicando que o efeito dependente do estrogênio foi mediado pelo GPER (MEYER et al., 2015). Outro mecanismo proposto para esse resultado é a capacidade que o estrogênio possui em reduzir o influxo de cálcio nas células do MLV (ZHANG et al., 1994). Como foi discutido anteriormente, a ativação do GPER pode influenciar tanto a mobilização quanto a sensibilidade do Ca^{2+} aos miofilamentos (HAN et al., 2013; HOLM et al., 2013; MEYER et al., 2012), o que poderia contribuir para os efeitos protetores do estrogênio endógeno no sistema cardiovascular. O estrogênio pode induzir o relaxamento independente do endotélio por meio de ações indiretas sobre MLV reduzindo o influxo de Ca^{2+} e aumento no efluxo de K^+ (DOS SANTOS et al., 2014) e estas ações podem ser mediadas pelo GPER (MATA et al., 2015).

Em relação ao tratamento subagudo com G36, não observamos diferenças nos valores de peso corporal ou dos órgãos, exceto ovário esquerdo e glândula suprarrenal esquerda. Além disso, não observamos alterações nos parâmetros hemodinâmicos e na reatividade vascular. Este protocolo foi baseado nos estudos do grupo de Meyer (MEYER et al., 2016; MEYER; BARTON, 2018), que propuseram a utilização de bloqueadores do GPER como uma nova classe de droga para o tratamento de doenças crônicas como a hipertensão, indicando um possível efeito paradoxal do estrogênio em ambientes com estresse oxidativo. Essa proposta foi indicada, devido alguns protocolos terem demonstrado o aumento da expressão de Nox1 e conseqüentemente a formação de EROs induzidos pela ativação do GPER e que são fatores chave na patogênese da vasoconstrição aumentada observada na hipertensão. Nesse estudo, camundongos foram tratados com 0,7 mg/dia de angiotensina II associado com 33 µg/dia de G36 durante 14 dias. Foi observado que o tratamento promoveu *downregulation* na NOX1 (proteína), conseqüentemente reduziu a formação de EROs e restaurou o relaxamento dependente do endotélio. Por outro lado, no presente estudo não observamos alterações em parâmetros analisados. Como são testes preliminares, fatores limitadores podem ter interferido nos resultados, tais como: número amostral reduzido, via de administração da substância, tempo de tratamento e a falta de análises de estresse oxidativo *in situ* (artérias mesentéricas e aorta) e sistêmico, como o TBARS.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos resultados demonstram que a ativação do GPER promove uma resposta de relaxamento nas artérias mesentéricas de resistência de ratos hipertensos sem diferença entre os sexos, porém com participação de diferentes mediadores endoteliais. Os machos parecem ser mais dependentes da via do NO não endotelial, prostanoídes seguida da via do H₂O₂, enquanto as fêmeas parecem ser mais dependentes do endotélio e do H₂O₂. A ativação do GPER modula respostas de agonistas vasodilatadores e vasoconstritores. O tratamento subagudo com G36 não altera parâmetros hemodinâmicos e a reatividade vascular de fêmeas SHR. Assim, o papel do GPER na função vascular associada ao estresse oxidativo, presente na hipertensão, ainda não é totalmente compreendido, justificando a necessidade de mais estudos esclarecedores. Esses resultados são importantes para o melhor entendimento da ativação do GPER, bem como das ações estrogênicas no sistema vascular associadas à hipertensão, doença mais prevalente no mundo. Portanto, os presentes achados sugerem mais estudos relacionados com as ações crônicas do G-1 no sistema vascular e possivelmente o potencial terapêutico do agonista do GPER para o tratamento da HAS com foco em grupos populacionais específicos.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

- AIRES, R. D. et al. Paraquat Poisoning Induces TNF- α -Dependent iNOS/NO Mediated Hyporesponsiveness of the Aorta to Vasoconstrictors in Rats. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e73562, 9 set. 2013.
- 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.
- ARORA, S. et al. Estrogen improves endothelial function. **Journal of Vascular Surgery**, v. 27, n. 6, p. 1141–1147, 1 jun. 1998.
- BALDO, M. P. et al. Long-term use of low-dose spironolactone in spontaneously hypertensive rats: effects on left ventricular hypertrophy and stiffness. **Pharmacological reports : PR**, v. 63, n. 4, p. 975–82, jul. 2011.
- BARLOW, R. S.; WHITE, R. E. Hydrogen peroxide relaxes porcine coronary arteries by stimulating BK(Ca) channel activity. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 275, n. 4 44-4, 1998.
- BAYNES, J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes**, v. 40, n. 4, p. 405–412, 1991.
- BENJAMIN, E. J. et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2018 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation**, v. 137, n. 12, p. e67–e492, 20 mar. 2018.
- BING, O. H. L. et al. Studies of prevention, treatment and mechanisms of heart failure in the aging spontaneously hypertensive rat. **Heart Failure Reviews**, v. 7, n. 1, p. 71–88, 2002.
- 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.
- BRANDIN, L. M. et al. Effects of estrogen plus progesterone on hemodynamic and vascular reactivity in hypertensive postmenopausal women. **Blood Pressure**, v. 19, n. 3, p. 156–163, 2010.

- BRASIL. **Normativas do CONCEA para produção, manutenção de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica: lei, decreto, portarias, resoluções, normativas e orientações técnicas**. 3. ed. Brasília: [s.n.].
- 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, mar. 2010.
- CARACUEL, L. et al. Transient mesenteric ischemia leads to remodeling of rat mesenteric resistance arteries. **Frontiers in Physiology**, v. 2 JAN, 2012.
- CARDIOLOGIA, S. B. DE. Sociedade Brasileira de Hipertensão. Sociedade Brasileira de Nefrologia. VII Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 107, n. 3, p. 1–83, 2016.
- 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, 1 nov. 1997.
- CARRILLO-SEPULVEDA, M. A. et al. Inhibition of TLR4 attenuates vascular dysfunction and oxidative stress in diabetic rats. **Journal of Molecular Medicine**, v. 93, n. 12, p. 1341–1354, 1 dez. 2015.
- CHAMBLISS, K. L.; SHAUL, P. W. Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. **Endocrine reviews**, v. 23, n. 5, p. 665–86, out. 2002.
- CHAUHAN, S. D. et al. Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 3, p. 1426–1431, 4 fev. 2003.
- COOKE, P. S. et al. Estrogens in Male Physiology. **Physiological Reviews**, v. 97, n. 3, p. 995–1043, 2017.
- COR DE WIT; WOLFLE, S. E. EDHF and Gap Junctions: Important Regulators of Vascular Tone Within the Microcirculation. **Current Pharmaceutical**

Biotechnology, v. 8, n. 1, p. 11–25, 2007.

COUTO, G. K. et al. Enhanced nitric oxide bioavailability in coronary arteries prevents the onset of heart failure in rats with myocardial infarction. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 86, p. 110–120, 1 set. 2015.

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 II, p. 914–919, 1999.

DEAN, S. A. et al. 17 β -Estradiol downregulates tissue angiotensin-converting enzyme and ANG II type 1 receptor in female rats. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, n. 3 57-3, p. 759–766, 2005.

DEBORTOLI, A. R. et al. GPER modulates tone and coronary vascular reactivity in male and female rats. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 59, n. 2, p. 171–180, 1 ago. 2017.

DENNIS, M. K. et al. Identification of a GPER/GPR30 antagonist with improved estrogen receptor counterselectivity. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 127, n. 3–5, p. 358–366, 2011.

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. 1806–1813, 2009.

DÍEZ-FREIRE, C. et al. ACE2 gene transfer attenuates hypertension-linked pathophysiological changes in the SHR. **Physiological Genomics**, v. 27, n. 1, p. 12–19, 2006.

DOGGRELL, S. A.; BROWN, L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. **Cardiovascular Research**, v. 39, n. 1, p. 89–105, 1 jul. 1998.

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.

DREGAN, A.; STEWART, R.; GULLIFORD, M. C. Cardiovascular risk factors and

- cognitive decline in adults aged 50 and over: a population-based cohort study. **Age and Ageing**, v. 42, n. 3, p. 338–345, 1 maio 2013.
- DUBEY, R. K. et al. Estradiol metabolites inhibit endothelin synthesis by an estrogen receptor-independent mechanism. **Hypertension**, v. 37, n. 2 Pt 2, p. 640–4, fev. 2001.
- EDWARDS, G. et al. K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. **Nature**, v. 396, n. 6708, p. 269–272, 19 nov. 1998.
- EVANSON, K. W. et al. The G protein-coupled estrogen receptor agonist, G-1, attenuates BK channel activation in cerebral arterial smooth muscle cells. **Pharmacology Research and Perspectives**, v. 6, n. 4, p. 1–8, 2018.
- FARHAT, M. Y.; LAVIGNE, M. C.; RAMWELL, P. W. The vascular protective effects of estrogen. **The FASEB Journal**, v. 10, n. 5, p. 615–624, 1 abr. 1996.
- FELDMAN, R. D. et al. A common hypofunctional genetic variant of GPER is associated with increased blood pressure in women. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 78, n. 6, p. 1441–1452, 2014.
- FÉLÉTOU, M.; HUANG, Y.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 3, p. 894–912, 2011.
- FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M. EDHF: an update. **Clinical Science**, v. 117, n. 4, p. 139–155, 2009.
- FÉLÉTOU, M.; VERBEUREN, T. J.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent contractions in SHR: A tale of prostanoid TP and IP receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 156, n. 4, p. 563–574, 2009.
- FISSITHALER, B. et al. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. **Nature**, v. 401, n. 6752, p. 493–497, 30 set. 1999.
- FLEMING, I. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 10, n. 4, p. 166–170, 1 maio 2000.

- FLEMING, I. et al. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor Synthase (Cytochrome P450 2C9) Is a Functionally Significant Source of Reactive Oxygen Species in Coronary Arteries. **Circulation Research**, v. 88, n. 1, p. 44–51, 19 jan. 2001.
- FÖRSTERMANN, U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. **Pflügers Archiv : European journal of physiology**, v. 459, n. 6, p. 923–39, maio 2010.
- FÖRSTERMANN, U.; MÜNDEL, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: From marvel to menace. **Circulation**, v. 113, n. 13, p. 1708–1714, abr. 2006.
- FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: Regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, n. 7, abr. 2012.
- FREDETTE, N. C.; MEYER, M. R.; PROSSNITZ, E. R. Role of GPER in estrogen-dependent nitric oxide formation and vasodilation. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 176, n. February, p. 65–72, 2018.
- FREIRE, A. K. DA S. et al. Panorama No Brasil Das Doenças Cardiovasculares Dos Últimos Quatorze Anos Na Perspectiva Da Promoção À Saúde Overview of Cardiovascular Diseases in Brazil in the Last Fourteen Years From the Perspective of Health Promotion. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 11, n. 9, p. 21–44, 2017.
- GALLAGHER, P. E. et al. Estrogen regulation of angiotensin-converting enzyme mRNA. **Hypertension**, v. 33, n. 1 Pt 2, p. 323–8, jan. 1999.
- GAUDET, H. M. et al. The G-protein coupled estrogen receptor, GPER: The inside and inside-out story. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 418, p. 207–219, 15 dez. 2015.
- GRYGLEWSKI, R. J. et al. BRADYKININ AS A MAJOR ENDOGENOUS REGULATOR OF ENDOTHELIAL FUNCTION. **Pediatric Pathology & Molecular Medicine**, v. 21, n. 3, p. 279–290, jan. 2002.
- 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.
- HALE, G. E.; HUGHES, C. L.; CLINE, J. M. Endometrial Cancer: Hormonal Factors, the Perimenopausal “Window of Risk,” and Isoflavones. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 1, p. 3–15, 1 jan. 2002.
- HAN, G. et al. GPER: A novel target for non-genomic estrogen action in the cardiovascular system. **Pharmacological Research**, v. 71, p. 53–60, 1 maio 2013.
- HATANO, Y. et al. The contractile responses of isolated dog cerebral and extracerebral arteries to oxybarbiturates and thiobarbiturates. **Anesthesiology**, v. 71, p. 80–6, 1989.
- HERON, M. Deaths: Leading Causes for 2016. **National Vital Statistics Reports**, v. 67, n. 6, 2016.
- HOLM, A. et al. The G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER1/GPR30) agonist G-1 regulates vascular smooth muscle cell Ca handling. **Journal of Vascular Research**, v. 50, n. 5, p. 421–429, 2013.
- HORNIG, B.; DREXLER, H. Endothelial function and bradykinin in humans. **Drugs**, v. 54, n. SUPPL.5, p. 42–47, 12 out. 1997.
- HULLEY, S. et al. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. **Journal of the American Medical Association**, v. 280, n. 7, p. 605–613, 1998.
- HULLEY, S. et al. Noncardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). **Journal of the American Medical Association**, v. 288, n. 1, p. 58–66, 3 jul. 2002.
- IGNARRO, L. J. et al. Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. **Journal of**

Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 237, n. 3, 1986.

JANG, E. J. et al. GPER-1 agonist G1 induces vasorelaxation through activation of epidermal growth factor receptor-dependent signalling pathway. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 10, p. 1488–1499, 2013.

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, 2010.

KOBUCHI, S. et al. Nitric oxide modulation of endothelium-derived hyperpolarizing factor in agonist-induced depressor responses in anesthetized rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 762, p. 26–34, 5 set. 2015.

KÜHBERGER, E. et al. The role of myoendothelial cell contact in non-nitric oxide-, non-prostanoid-mediated endothelium-dependent relaxation of porcine coronary artery. **British Journal of Pharmacology**, v. 113, n. 4, p. 1289–1294, 1 dez. 1994.

KUIPER, G. G. J. M. et al. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 12, p. 5925–5930, 1996.

LERMAN, L. O. et al. Animal Models of Hypertension: A Scientific Statement From the American Heart Association. **Hypertension**, v. 73, n. 6, p. e87–e120, 1 jun. 2019.

LEUNG, S. W. S.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization: age, gender and blood pressure, do they matter? **Acta Physiologica**, v. 219, n. 1, p. 108–123, 2017.

LIEBERMAN, E. H. et al. Estrogen improves endothelium-dependent, flow-mediated vasodilation in postmenopausal women. **Annals of Internal Medicine**, v. 121, n. 12, p. 936–941, 15 dez. 1994.

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.

LOH, W. M. et al. Des-aspartate angiotensin I (DAA-I) reduces endothelial dysfunction in the aorta of the spontaneously hypertensive rat through inhibition of angiotensin II-induced oxidative stress. **Vascular Pharmacology**, v. 71, p. 151–158, 1 ago. 2015.

LUSCHER, T. F.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, v. 8, n. 4, p. 344–348, 1986a.

LUSCHER, T. F.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, v. 8, n. 4, p. 344–348, 1986b.

MACMAHON, S. et al. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 1, prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. **The Lancet**, v. 335, n. 8692, p. 765–774, 31 mar. 1990.

MANSON, J. E. et al. Estrogen plus Progestin and the Risk of Coronary Heart Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 6, p. 523–534, 7 ago. 2003.

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. 4 A, p. 609–614, 2002.

MÅRTENSSON, 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, 1 fev. 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.; SHIMOKAWA, H. Hydrogen Peroxide Is an Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in Animals and Humans. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 92, n. 1, p. 1–6, 2003.
- MENDELSON, M. E.; KARAS, R. H. The Protective Effects of Estrogen on the Cardiovascular System. **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 23, p. 1801–1811, 21 out. 1999.
- 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. et al. GPER regulates endothelin-dependent vascular tone and intracellular calcium. **Life Sciences**, v. 91, n. 13–14, p. 623–627, 15 out. 2012.
- MEYER, M. R. et al. G protein-coupled estrogen receptor protects from atherosclerosis. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 1–9, 23 dez. 2014.
- MEYER, M. R. et al. G protein-coupled estrogen receptor inhibits vascular prostanoid production and activity. **Journal of Endocrinology**, v. 227, n. 1, p. 61–69, 2015.
- MEYER, M. R. et al. Obligatory role for GPER in cardiovascular aging and disease. **Science Signaling**, v. 9, n. 452, 2016.
- MEYER, M. R. et al. GPER mediates functional endothelial aging in renal arteries. **Pharmacology**, v. 100, n. 3–4, p. 188–193, 2017.
- MEYER, M. R.; BARTON, M. GPER blockers as Nox downregulators: A new drug class to target chronic non-communicable diseases. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 176, p. 82–87, 2018.
- MEYRELLES, S. S. et al. Endothelial Dysfunction in the Apolipoprotein E-deficient Mouse : insights into the influence of diet , gender and aging. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, n. 1, p. 211, 2011.
- MORI, Y. et al. Effects of endothelium-derived hyperpolarizing factor and nitric oxide on endothelial function in femoral resistance arteries of spontaneously

hypertensive rats. **Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension**, v. 29, n. 3, p. 187–95, mar. 2006.

MORSELLI, E. et al. The effects of oestrogens and their receptors on cardiometabolic health. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 6, p. 352–364, 1 jun. 2017.

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, 20 mar. 2007.

MOZAFFARIAN, D. et al. Heart disease and stroke statistics-2016 update a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 133, n. 4, p. e38–e48, 2016.

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.

MULVANY, M. J.; HANSEN, O. K.; AALKJAER, C. Direct evidence that the greater contractility of resistance vessels in spontaneously hypertensive rats is associated with a narrowed lumen, a thickened media, and an increased number of smooth muscle cell layers. **Circulation research**, v. 43, n. 6, p. 854–864, 1978.

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.

MUST, A. et al. The disease burden associated with overweight and obesity. **Journal of the American Medical Association**, v. 282, n. 16, p. 1523–1529, 27 out. 1999.

NISHIKAWA, Y.; STEPP, D. W.; CHILIAN, W. M. Nitric oxide exerts feedback inhibition on EDHF-induced coronary arteriolar dilation in vivo. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 279, n. 2 48-2, 2000.

- OGAWA, S. et al. Roles of estrogen receptor- α gene expression in reproduction-related behaviors in female mice. **Endocrinology**, v. 139, n. 12, p. 5070–5081, 1 dez. 1998.
- OHASHI, J. et al. Mechanisms for enhanced endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses in microvessels in mice. **Circulation Journal**, v. 76, n. 7, p. 1768–1779, 2012.
- OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Japanese Circulation Journal**, v. 27, p. 282–293, 1963.
- OWMAN, C. et al. Cloning of human cDNA encoding a novel heptahelix receptor expressed in Burkitt's lymphoma and widely distributed in brain and peripheral tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 228, n. 2, p. 285–292, 1996.
- PALMER, R. M. J.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v. 333, n. 6174, p. 664–666, 1988.
- PEIXOTO, P. **Efeito do Agonista Seletivo do Receptor GPER em Artérias Mesentéricas de Resistência de Ratos Normotensos de Ambos os Sexos.** [s.l: s.n.].
- PEIXOTO, P. et al. GPER agonist dilates mesenteric arteries via PI3K-Akt-eNOS and potassium channels in both sexes. **Life Sciences**, v. 183, p. 21–27, 2017.
- PEIXOTO, P. et al. Sex difference in GPER expression does not change vascular relaxation or reactive oxygen species generation in rat mesenteric resistance arteries. **Life Sciences**, v. 211, p. 198–205, 15 out. 2018.
- PINTÉROVÁ, M.; KUNEŠ, J.; ZICHA, J. Altered neural and vascular mechanisms in hypertension. **Physiological Research**, v. 60, n. 3, p. 381–402, 2011.
- PLATET, N. et al. Estrogens and their receptors in breast cancer progression: A dual role in cancer proliferation and invasion. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 51, n. 1, p. 55–67, 1 jul. 2004.

- POTJE, S. R. et al. Reduced caveolae density in arteries of SHR contributes to endothelial dysfunction and ROS production. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–16, 2019.
- PROSSNITZ, E. R. et al. Estrogen Signaling through the Transmembrane G Protein–Coupled Receptor GPR30. **Annual Review of Physiology**, v. 70, n. 1, p. 165–190, 2008.
- PROSSNITZ, E. R.; BARTON, M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 7, n. 12, p. 715–26, dez. 2011.
- PROSSNITZ, E. R.; HATHAWAY, H. J. What have we learned about GPER function in physiology and disease from knockout mice? **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 153, p. 114–126, 10 set. 2015.
- PUISSANT, C. et al. Assessment of endothelial function by acetylcholine iontophoresis: Impact of inter-electrode distance and electrical cutaneous resistance. **Microvascular Research**, v. 93, p. 114–118, 1 maio 2014.
- RAY, R. et al. Endothelial Nox4 NADPH oxidase enhances vasodilatation and reduces blood pressure in vivo. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 6, p. 1368–1376, 2011.
- RECKELHOFF, J. F.; FORTEPIANI, L. A. Novel mechanisms responsible for postmenopausal hypertension. **Hypertension**, v. 43, n. 5, p. 918–23, maio 2004.
- REVANKAR, C. M. et al. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. **Science**, v. 307, n. 5715, p. 1625–1630, 11 mar. 2005.
- ROSSOUW, J. E. et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: Principal results from the women’s health initiative randomized controlled trial. **Journal of the American Medical Association**, v. 288, n. 3, p. 321–333, 17 jul. 2002.
- SANTOS, R. L. et al. Sex differences in the coronary vasodilation induced by 17 β -

oestradiol in the isolated perfused heart from spontaneously hypertensive rats. **Acta physiologica (Oxford, England)**, v. 200, n. 3, p. 203–10, nov. 2010.

SHARMA, G. et al. GPER deficiency in male mice results in insulin resistance, dyslipidemia, and a proinflammatory state. **Endocrinology**, v. 154, n. 11, p. 4136–4145, 2013.

SHARMA, G. et al. Preclinical efficacy of the GPER-selective agonist G-1 in mouse models of obesity and diabetes. **Science translational medicine**, v. 12, n. 528, 29 jan. 2020.

SHIMOKAWA, H. et al. The Importance of the Hyperpolarizing Mechanism Increases as the Vessel Size Decreases in Endothelium-Dependent Relaxations in Rat Mesenteric Circulation. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 28, n. 1, p. 703–711, 1996.

SHIMOKAWA, H.; MORIKAWA, K. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 39, n. 5, p. 725–732, 2005.

SILVA, B. R. et al. Endothelial nitric oxide synthase and cyclooxygenase are activated by hydrogen peroxide in renal hypertensive rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 814, n. March, p. 87–94, 2017.

SILVA, B. R.; PERNOMIAN, L.; BENDHACK, L. M. Contribution of oxidative stress to endothelial dysfunction in hypertension. **Frontiers in Physiology**, v. 3, n. 1, p. 441, 5 dez. 2012.

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, 1 jul. 2016.

SIMPSON, E. R. Sources of estrogen and their importance. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 86, n. 3–5, p. 225–230, 2003.

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

SLATER, A. F. G. et al. Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. **Toxicology Letters**, v. 82–83, n. C, p. 149–153, 1995.

SLEZÁK, P. et al. Accurate normalization factor for wire myography of rat femoral artery. **Physiological Research**, v. 59, n. 6, p. 1033–1036, dez. 2010.

SOLOFF, M. S.; SZEGO, C. M. Purification of estradiol receptor from rat uterus and blockade of its estrogen-binding function by specific antibody. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 34, n. 1, p. 141–147, 1969.

STIRONE, C. et al. 17 β -Estradiol increases endothelial nitric oxide synthase mRNA copy number in cerebral blood vessels: quantification by real-time polymerase chain reaction. **European Journal of Pharmacology**, v. 478, n. 1, p. 35–38, set. 2003.

SUDHIR, K. et al. Physiological concentrations of estradiol attenuate endothelin 1-induced coronary vasoconstriction in vivo. **Circulation**, v. 96, n. 10, p. 3626–3632, 18 nov. 1997.

TAHVANAINEN, A. et al. Increased Wall Tension in Response to Vasoconstrictors in Isolated Mesenteric Arterial Rings from Patients with High Blood Pressure. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 99, n. 6, p. 440–449, 1 dez. 2006.

TAKAHASHI, K. et al. Both estrogen and raloxifene cause G1 arrest of vascular smooth muscle cells. **Journal of Endocrinology**, v. 178, n. 2, p. 319–329, 2003.

TANG, E. H. C.; VANHOUTTE, P. M. Prostanoids and reactive oxygen species: Team players in endothelium-dependent contractions. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 122, n. 2, p. 140–149, 2009.

TAYLOR, S.; WESTON, A. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 9, n. 8, p. 272–274, 1988.

THOMAS, D. D. et al. The chemical biology of nitric oxide: Implications in cellular

- signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, n. 1, p. 18–31, 1 jul. 2008.
- THOMAS, P. et al. Identity of an Estrogen Membrane Receptor Coupled to a G Protein in Human Breast Cancer Cells. **Endocrinology**, v. 146, n. 2, p. 624–632, 1 fev. 2005.
- TRIGGLE, C. R. et al. The endothelium: Influencing vascular smooth muscle in many ways. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 90, n. 6, p. 713–718, 2012.
- TRIPPODO, N. C.; FROHLICH, E. D. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. **Circulation Research**, v. 48, n. 3, p. 309–319, 1 mar. 1981.
- VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent contractions in hypertension: When prostacyclin becomes ugly. **Hypertension**, v. 57, n. 3 PART 2, p. 526–531, 2011.
- VANHOUTTE, P. M. et al. Endothelial dysfunction and vascular disease – a 30th anniversary update. **Acta Physiologica**, v. 219, n. 1, p. 22–96, 2017.
- VASAN, R. S. et al. Impact of High-Normal Blood Pressure on the Risk of Cardiovascular Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 18, p. 1291–1297, 20 nov. 2001.
- WAGNER, A H.; SCHROETER, M. R.; HECKER, M. 17beta-estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 15, n. 12, p. 2121–30, out. 2001.
- WANG, H. et al. G protein-coupled estrogen receptor (GPER) deficiency induces cardiac remodeling through oxidative stress. **Translational Research**, v. 199, p. 39–51, 2018.
- WONG, P. S.; RANDALL, M. D.; ROBERTS, R. E. Sex differences in the role of NADPH oxidases in endothelium-dependent vasorelaxation in porcine isolated

coronary arteries. **Vascular Pharmacology**, v. 72, p. 83–92, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **World Health**, v. 27, n. 5, p. 1047–1053, 2004.

YAO, F.; ABDEL-RAHMAN, A. A. Estrogen receptor ER α plays a major role in ethanol-evoked myocardial oxidative stress and dysfunction in conscious female rats. **Alcohol**, v. 50, p. 27–35, 1 fev. 2016.

YEN, C. H. et al. 17Beta-estradiol inhibits oxidized low density lipoprotein-induced generation of reactive oxygen species in endothelial cells. **Life sciences**, v. 70, n. 4, p. 403–13, 14 dez. 2001.

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. E882-8, nov. 2011a.

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, nov. 2011b.

YU, X. et al. G protein-coupled estrogen receptor 1 mediates relaxation of coronary arteries via cAMP/PKA-dependent activation of MLCP. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 307, n. 4, p. E398–E407, 15 ago. 2014.

YU, X. et al. Activation of G protein-coupled estrogen receptor 1 induces coronary artery relaxation via Epac/Rap1-mediated inhibition of RhoA/Rho kinase pathway in parallel with PKA. **PLOS ONE**, v. 12, n. 3, p. e0173085, 9 mar. 2017.

YU, X. et al. The activation of G protein-coupled estrogen receptor induces relaxation via cAMP as well as potentiates contraction via EGFR transactivation in porcine coronary arteries. **PLoS ONE**, v. 13, n. 1, p. 1–15, 2018.

ZAHAR. Artigo Original. v. 51, n. 3, p. 133–138, 2005.

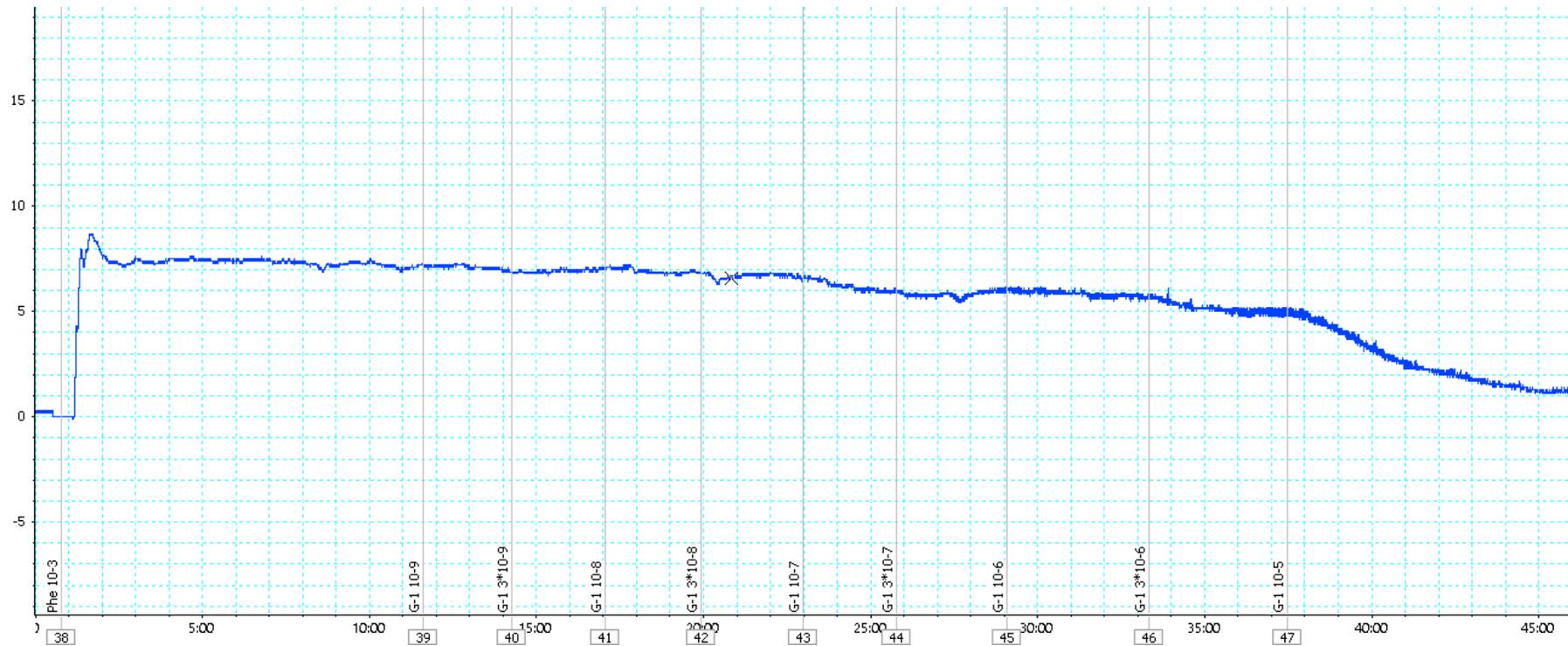
ZHANG, F. et al. 17β -Estradiol attenuates voltage-dependent Ca^{2+} currents in A7r5 vascular smooth muscle cell line. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 266, n. 4 35-4, 1994.

ZHAO, W. et al. The vasorelaxant effect of H_2S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. **EMBO Journal**, v. 20, n. 21, p. 6008–6016, 1 nov. 2001.

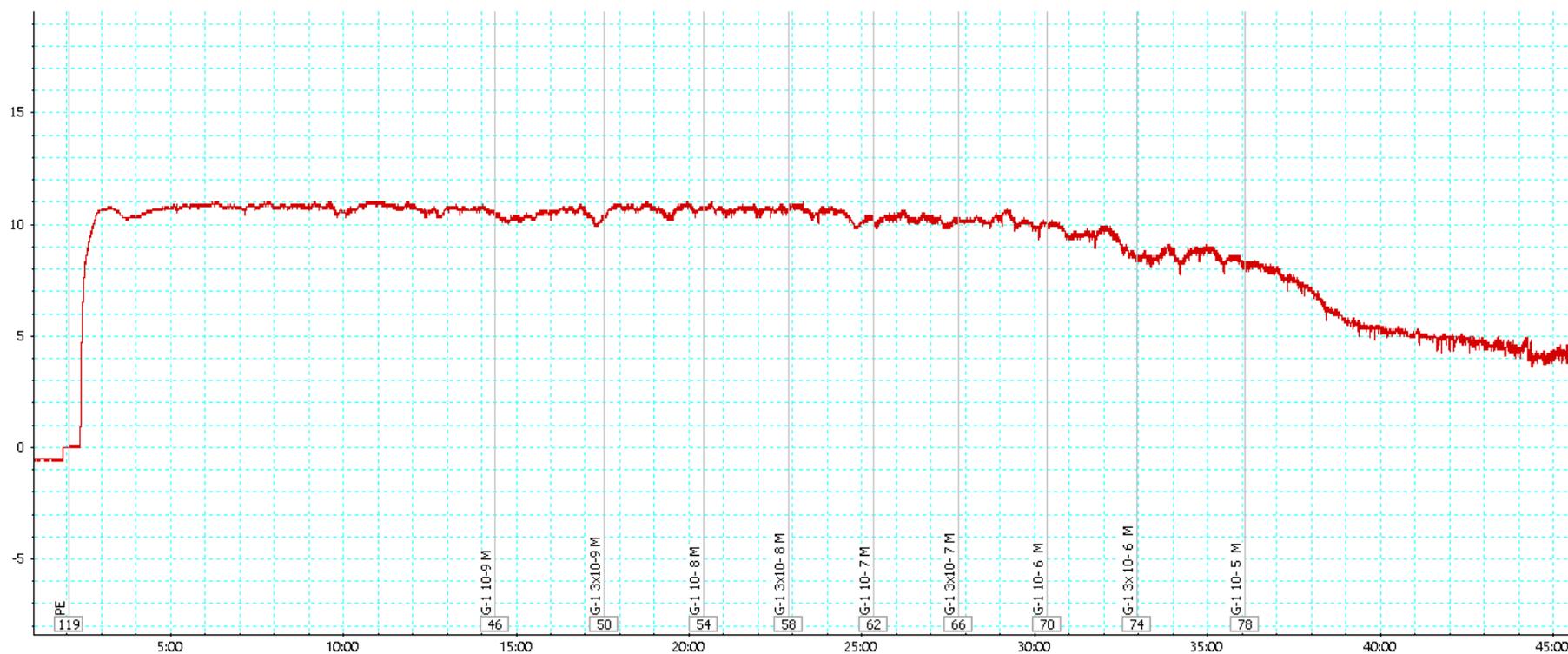
ZHAO, X. et al. Decreased epoxygenase and increased epoxide hydrolase expression in the mesenteric artery of obese Zucker rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, n. 1, p. R188–R196, jan. 2005.

APÊNDICES

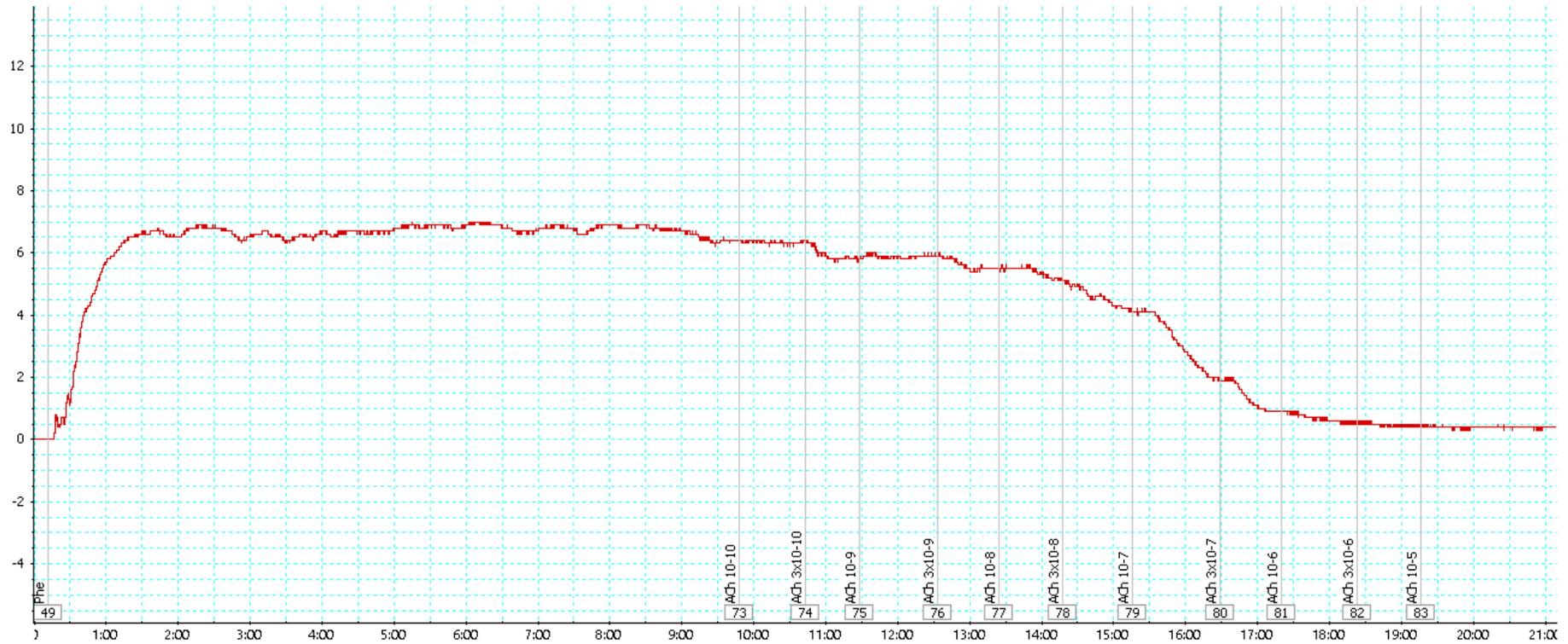
APÊNDICE A - REGISTRO TÍPICO DA REATIVIDADE VASCULAR AO G-1 EM ARTÉRIA MESENTÉRICAS DE RESISTÊNCIA DE FÊMEA SHR



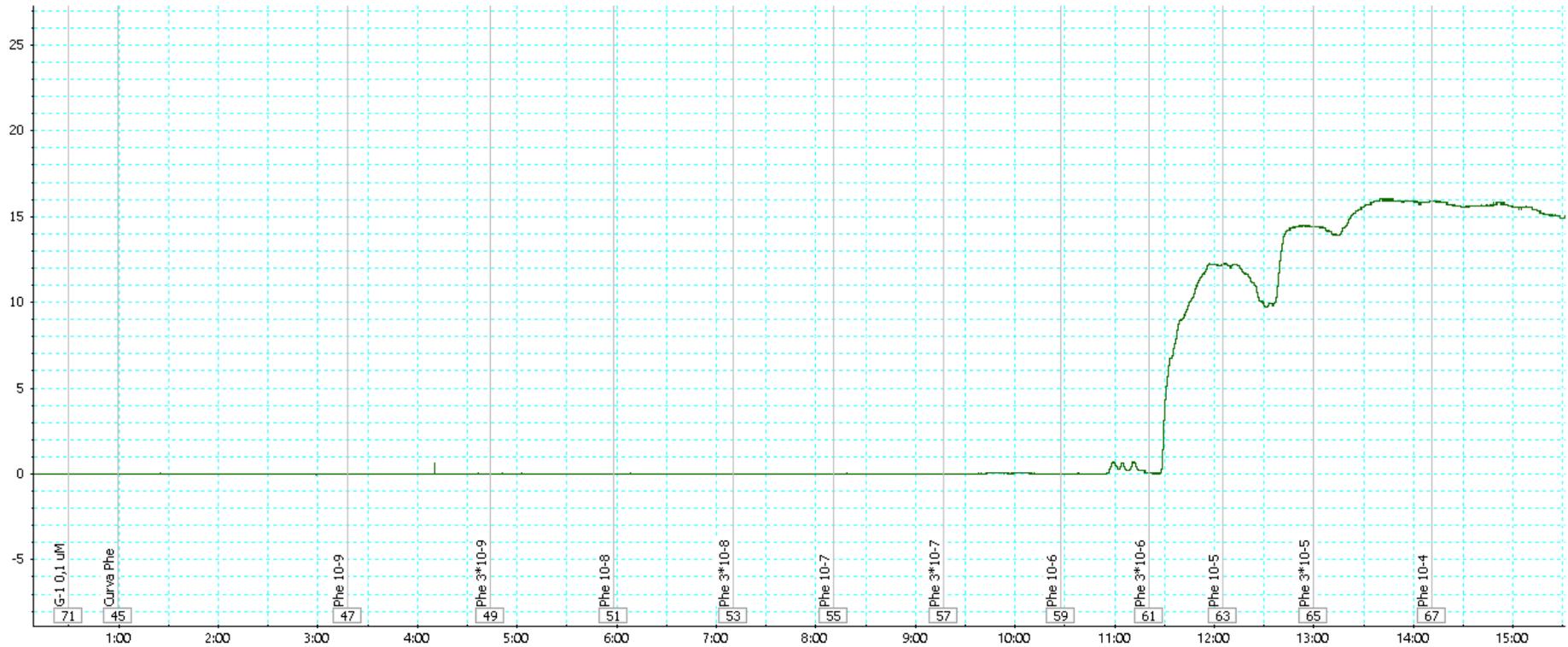
APÊNDICE B - REGISTRO TÍPICO DA REATIVIDADE VASCULAR AO G-1 EM ARTÉRIA MESENTÉRICA DE RESISTÊNCIA DE MACHO SHR



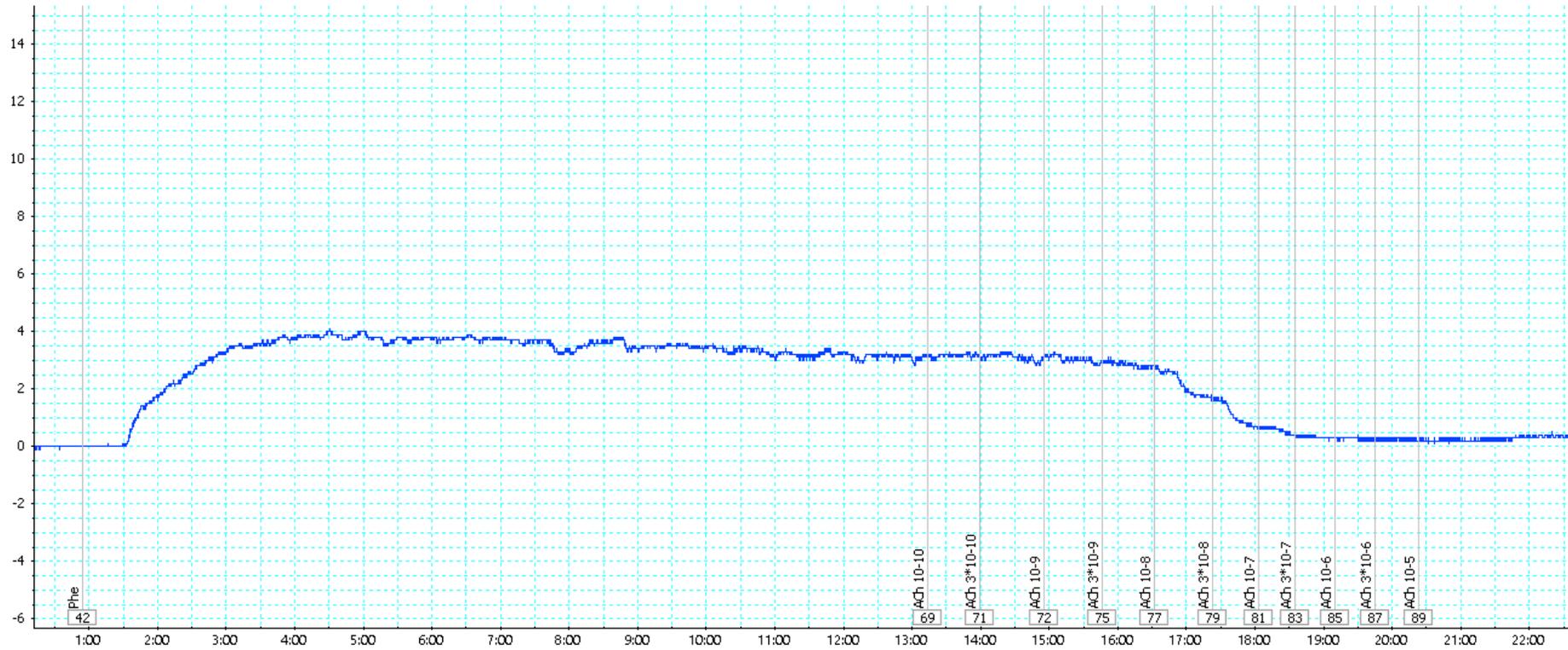
APÊNDICE C - REGISTRO TÍPICO DA REATIVIDADE VASCULAR Á ACETILCOLINA COM INCUBAÇÃO DE 0,1 μ M EM ARTÉRIA MESENTÉRICA DE RESISTÊNCIA DE FÊMEA SHR



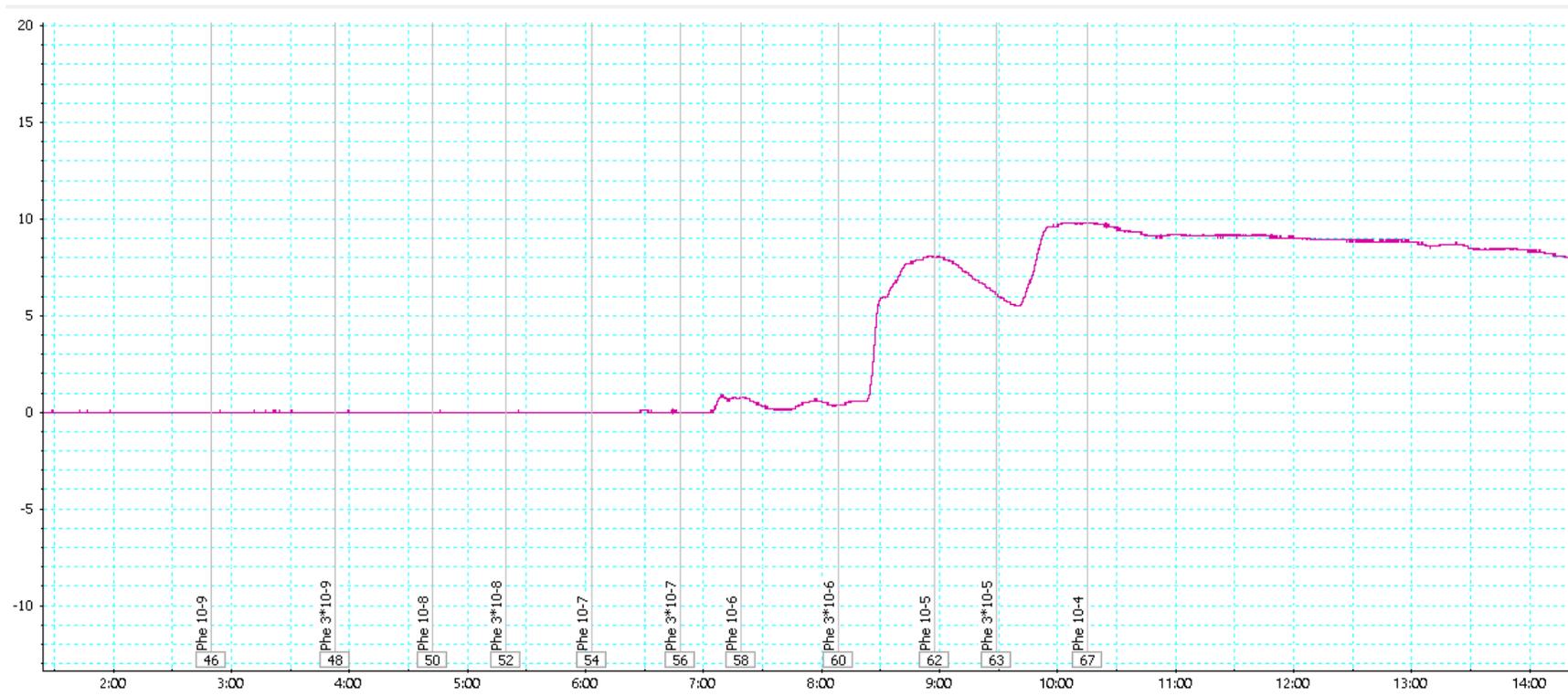
APÊNDICE D - REGISTRO TÍPICO DA REATIVIDADE VASCULAR Á FENILEFRINA COM INCUBAÇÃO DE 0,1 μM EM ARTÉRIA MESENTÉRIC DE RESISTÊNCIA DE FÊMEA SHR



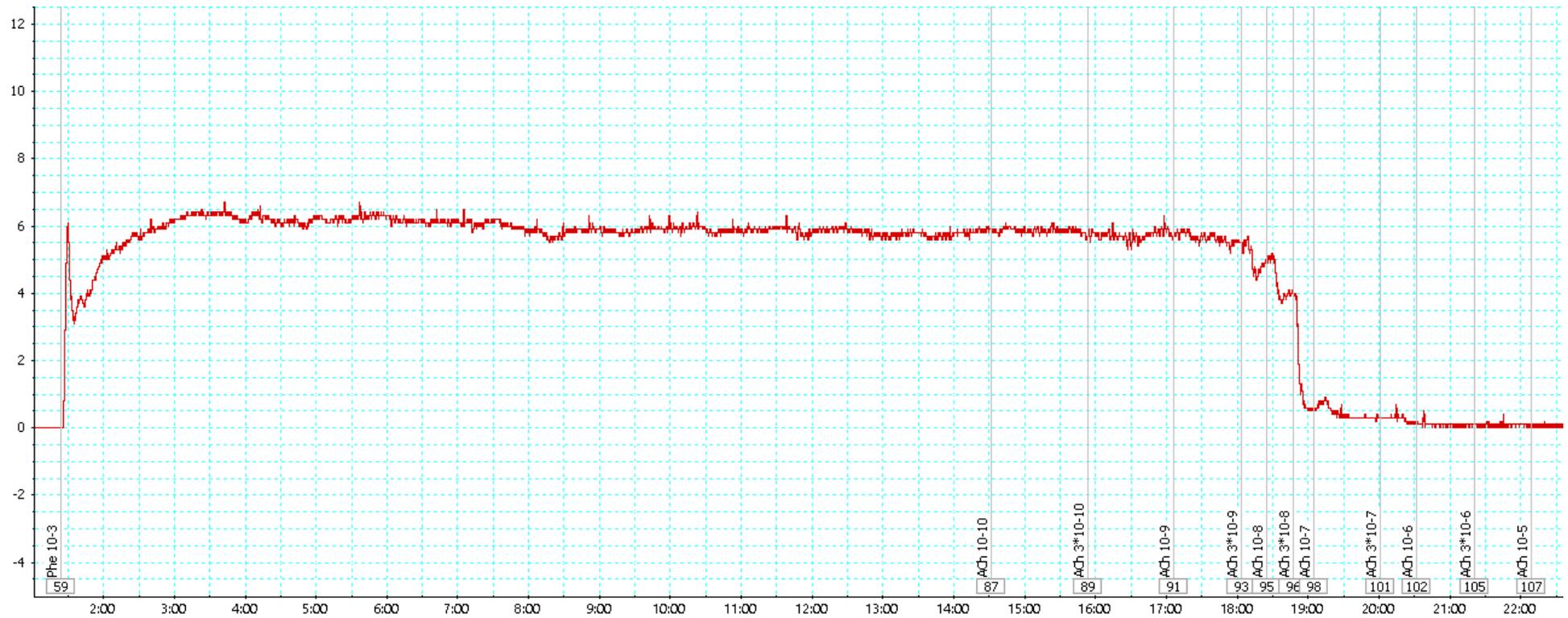
APÊNDICE E - REGISTRO TÍPICO DA REATIVIDADE VASCULAR Á ACETILCOLINA COM INCUBAÇÃO DE 10 µM EM ARTÉRIA MESENTÉRIC A DE RESISTÊNCIA DE FÊMEA SHR



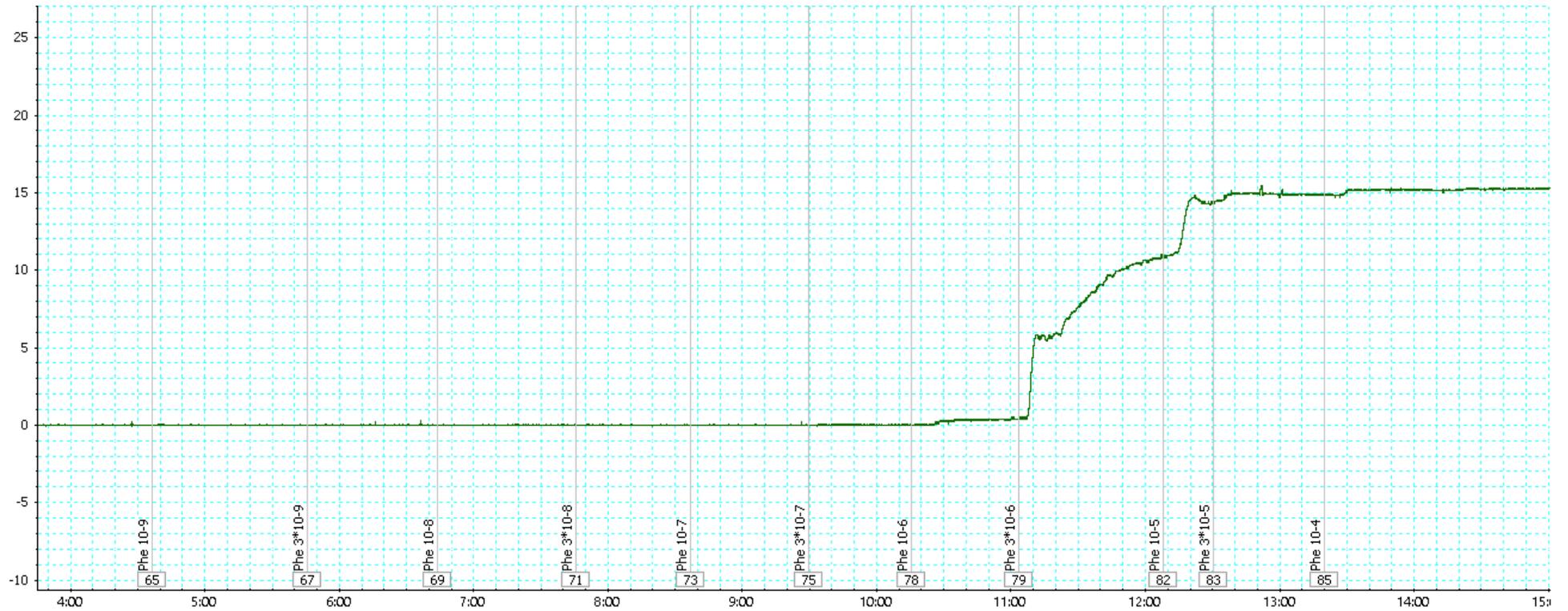
APÊNDICE F - REGISTRO TÍPICO DA REATIVIDADE VASCULAR À FENILEFRINA COM INCUBAÇÃO DE 10 µM EM ARTÉRIA MESENTÉRIC DE RESISTÊNCIA DE FÊMEA SHR



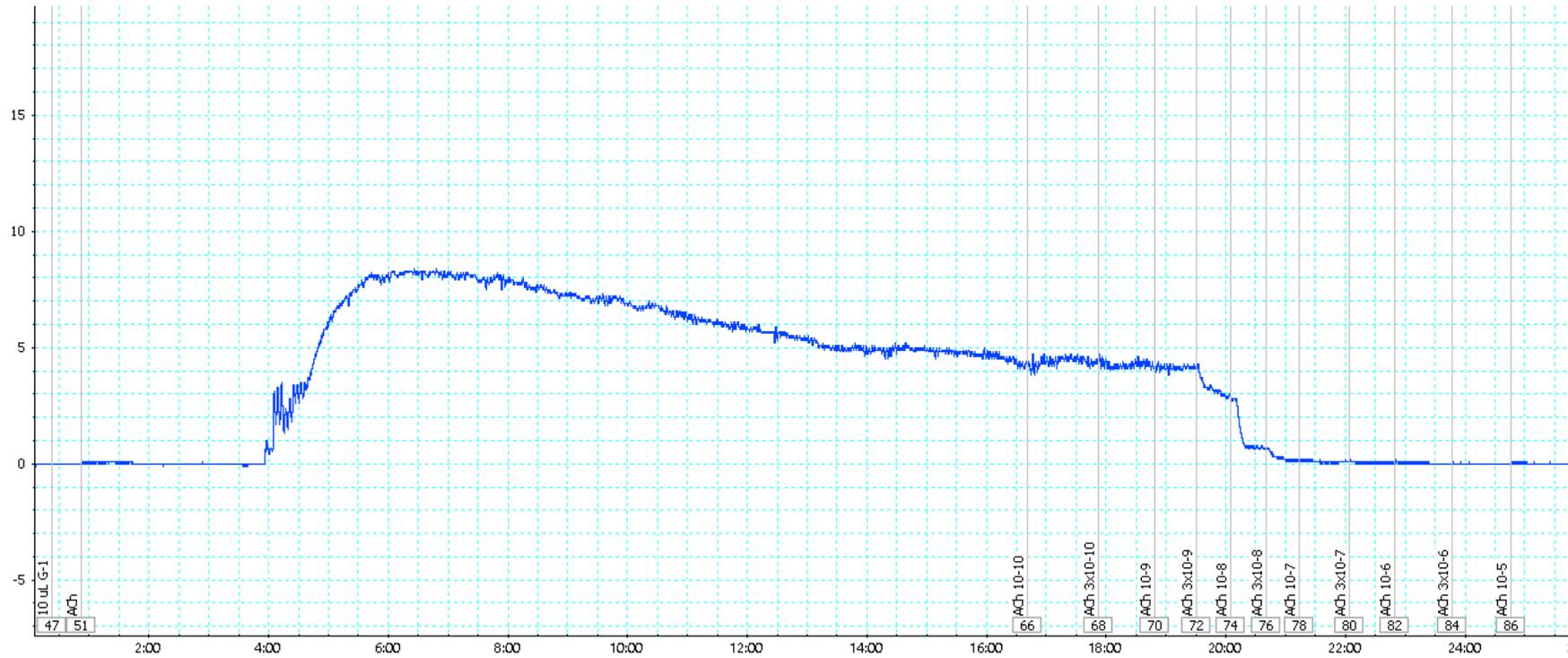
APÊNDICE G - REGISTRO TÍPICO DA REATIVIDADE VASCULAR À ACETILCOLINA COM INCUBAÇÃO DE 0,1 μ M EM ARTÉRIA MESENTÉRICA DE RESISTÊNCIA DE MACHO SHR



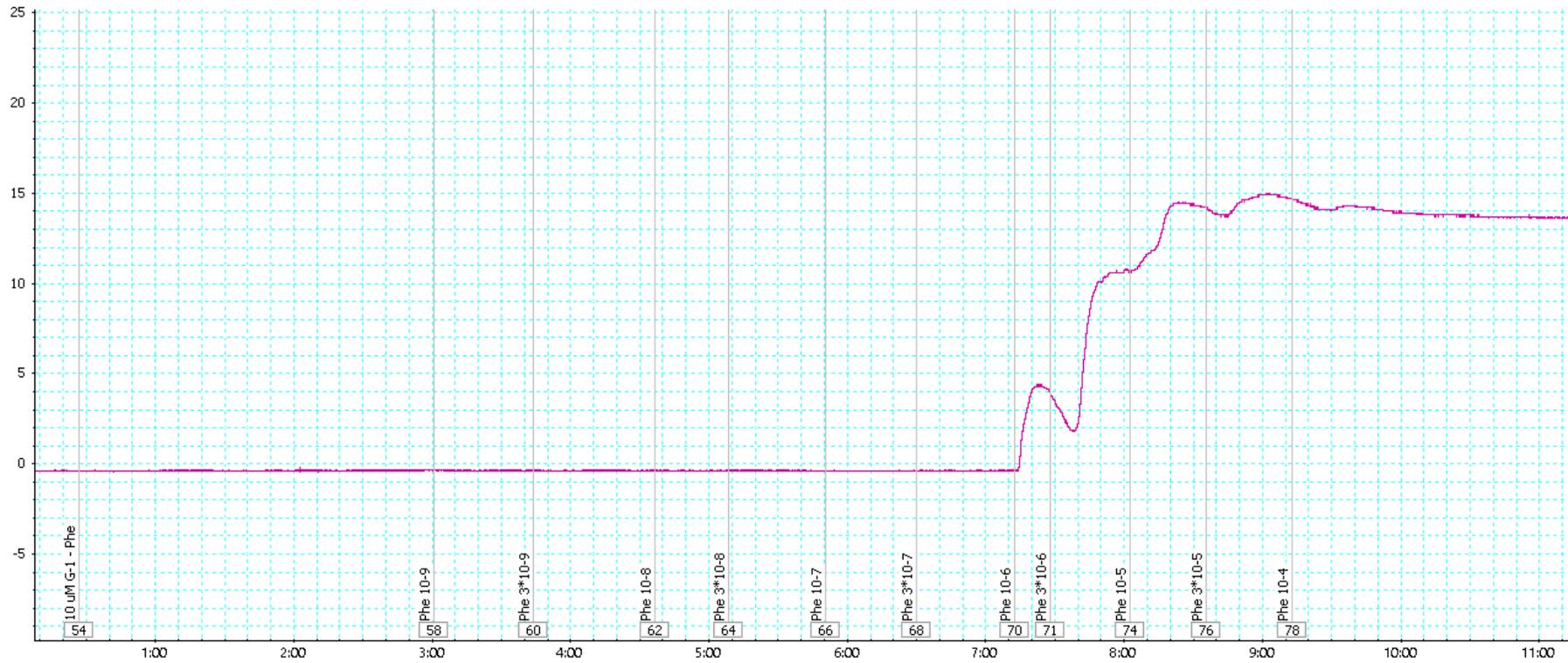
APÊNDICE F - REGISTRO TÍPICO DA REATIVIDADE VASCULAR À FENILEFRINA COM INCUBAÇÃO DE 0,1 μM EM ARTÉRIA MESENTÉRIC DE RESISTÊNCIA DE MACHO SHR



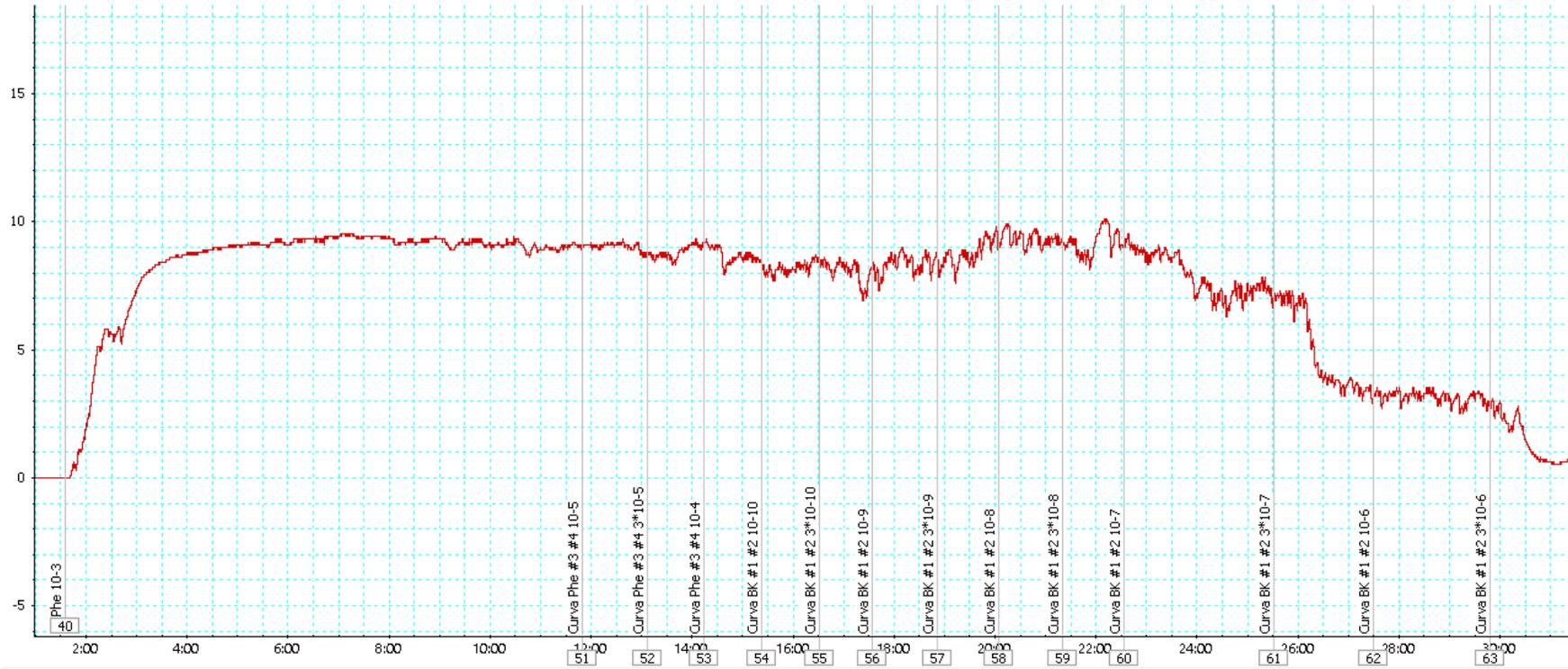
APÊNDICE G - REGISTRO TÍPICO DA REATIVIDADE VASCULAR À ACETILCOLINA COM INCUBAÇÃO DE 10 μ M EM ARTÉRIA MESENTÉRICA DE RESISTÊNCIA DE MACHO SHR



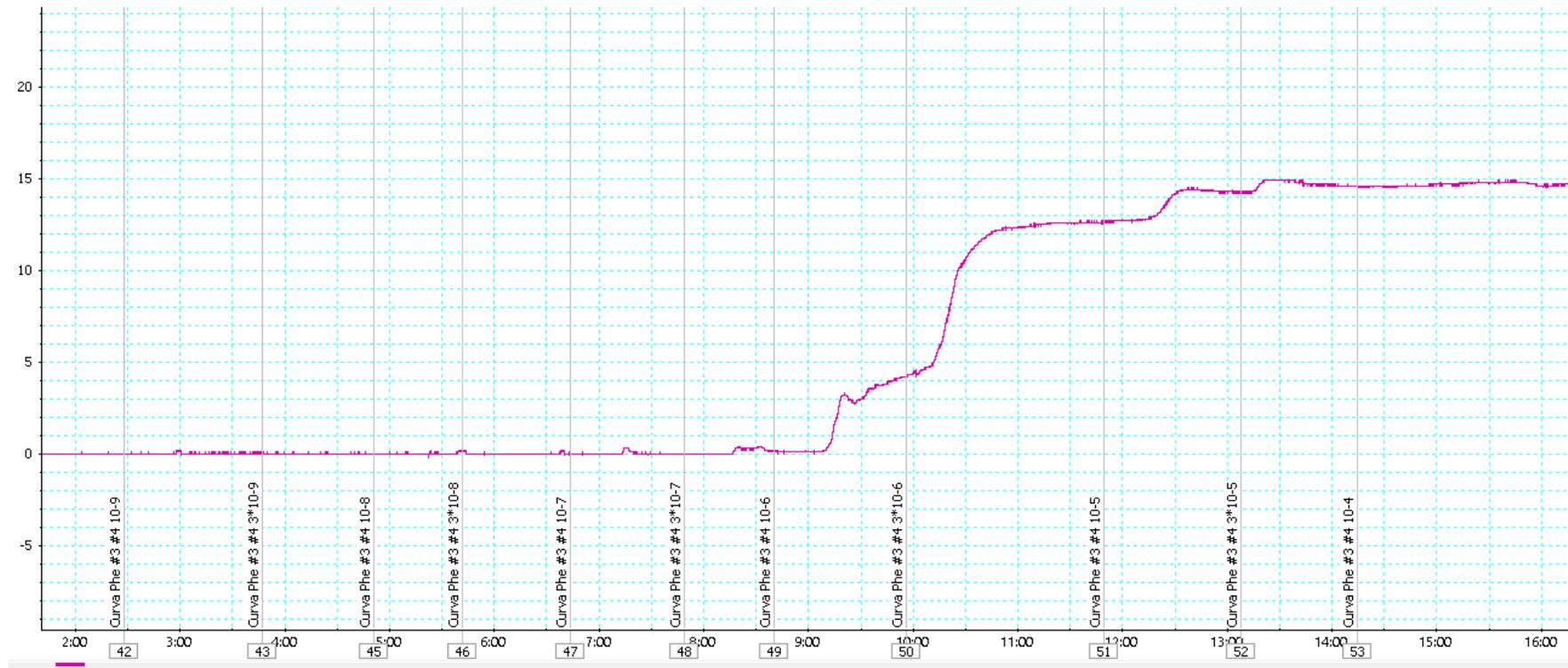
APÊNDICE H - REGISTRO TÍPICO DA REATIVIDADE VASCULAR À FENILEFRINA COM INCUBAÇÃO DE 10 μ M EM ARTÉRIA MESENTÉRIC DE RESISTÊNCIA DE MACHO SHR



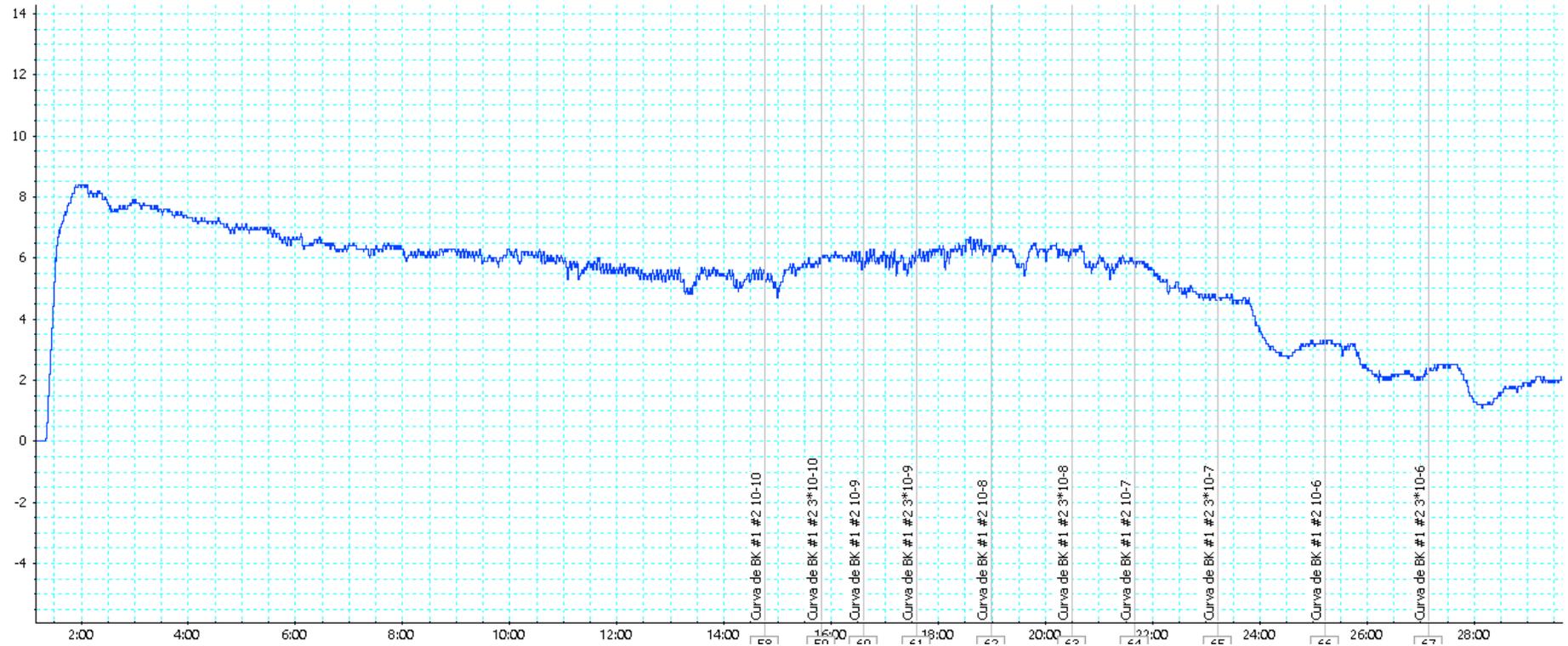
APÊNDICE I - REGISTRO TÍPICO DA REATIVIDADE VASCULAR À BRADICININA EM ARTÉRIA MESENTÉRICA DE RESISTÊNCIA DE FÊMEA SHR GRUPO TRATAMENTO COM G36



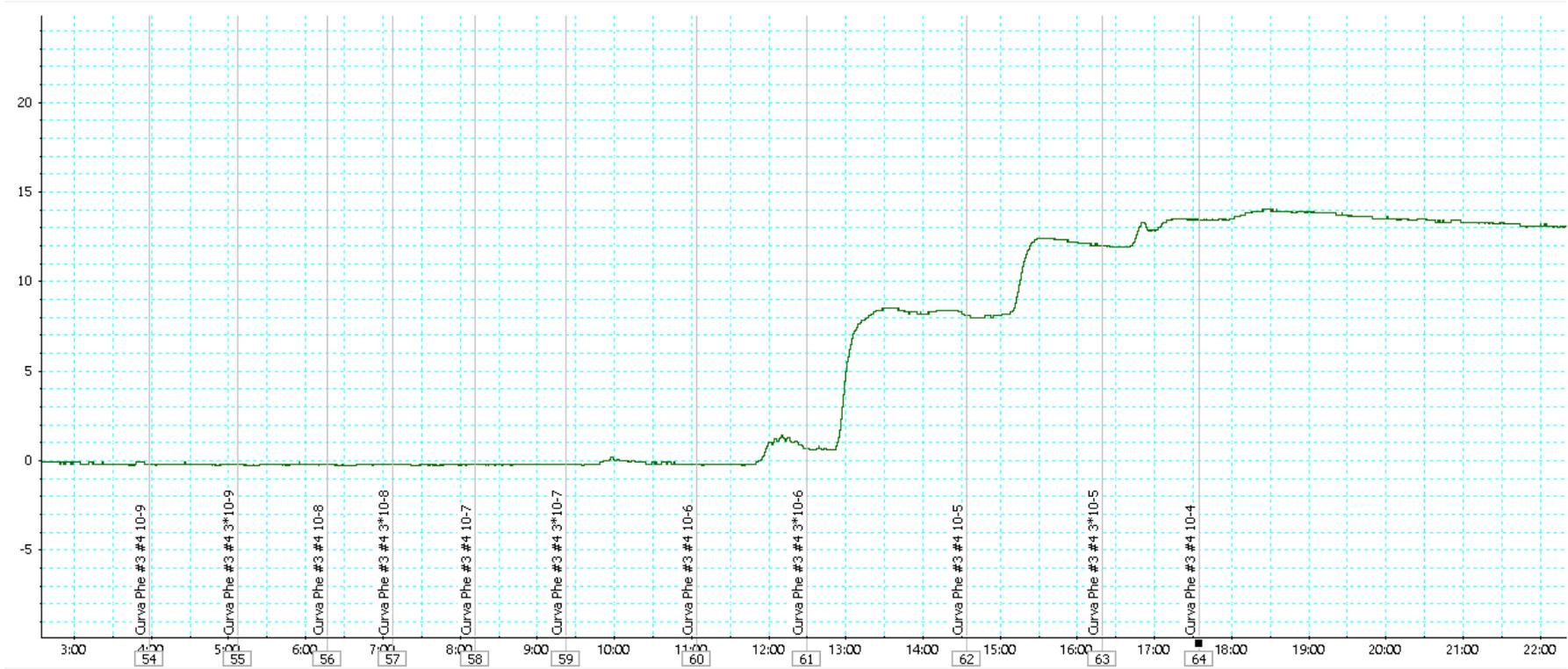
APÊNDICE J - REGISTRO TÍPICO DA REATIVIDADE VASCULAR À FENILEFRINA EM ARTÉRIA MESENTÉRICA DE RESISTÊNCIA DE FÊMEA SHR GRUPO TRATAMENTO COM G36



APÊNDICE K - REGISTRO TÍPICO DA REATIVIDADE VASCULAR À BRADICININA EM ARTÉRIA MESENTÉRICA DE RESISTÊNCIA DE FÊMEA SHR GRUPO VEÍCULO



APÊNDICE L - REGISTRO TÍPICO DA REATIVIDADE VASCULAR À FENILEFRINA EM ARTÉRIA MESENTÉRICA DE RESISTÊNCIA DE FÊMEA SHR GRUPO VEÍCULO



APÊNDICE E – Capa do artigo publicado na revista *Frontiers in Physiology* – *Vascular Physiology* com parte dos dados apresentados na presente tese.



ORIGINAL RESEARCH
 PUBLISHED: 20 July 2021
 doi: 10.3389/fphys.2021.650291



Sex Differences in the Vasodilation Mediated by G Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER) in Hypertensive Rats

Nathalie Tristão Banhos Delgado¹, Wender do Nascimento Rouver¹, Leandro Ceotto Freitas-Lima², Ildebrandes Vieira-Alves³, Virginia Soares Lemos³ and Roger Lyrio dos Santos^{4*}

¹ Department of Physiological Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Brazil

² Department of Biophysics, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ³ Department of Physiology and Biophysics, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Ana Paula Gavil, State University of Campinas, Brazil

Reviewed by:

Rigo J. Costa, University of São Paulo, Brazil

Adán Dagnino-Acosta, University of Colima, Mexico

Carmita Rocco, University of Calabria, Italy

*Correspondence:

Roger Lyrio dos Santos

rogalyrio@hotmail.com

Specialty section:

This article was submitted to

Vascular Physiology,

a section of the journal

Frontiers in Physiology

Received: 27 January 2021

Accepted: 22 June 2021

Published: 29 July 2021

Citation:

Delgado NTB, Rouver WN, Freitas-Lima LC, Vieira-Alves I, Lemos VS and Santos RL (2021) Sex

Differences in the Vasodilation

Mediated by G Protein-Coupled

Estrogen Receptor (GPER)

in Hypertensive Rats.

Front. Physiol. 12:650291.

doi: 10.3389/fphys.2021.650291

Background: The protective effect of estrogen on the vasculature cannot be explained only by its action through the receptors ER α and ER β . G protein-coupled estrogen receptors (GPER)—which are widely distributed throughout the cardiovascular system—may also be involved in this response. However, little is known about GPER actions in hypertension. Therefore, in this study we evaluated the vascular response mediated by GPER using a specific agonist, G-1, in spontaneously hypertensive rats (SHR). We hypothesized that G-1 would induce a relaxing response in resistance mesenteric arteries from SHR of both sexes.

Methods: G-1 concentration-response curves (1 nM–10 μ M) were performed in mesenteric arteries from SHR of both sexes (10–12-weeks-old, weighing 180–250 g). The effects of G-1 were evaluated before and after endothelial removal and incubation for 30 min with the inhibitors L-NAME (300 μ M) and indomethacin (10 μ M) alone or combined with clotrimazole (0.75 μ M) or catalase (1,000 units/mL). GPER immunolocalization was also investigated, and vascular hydrogen peroxide (H $_2$ O $_2$) and ROS were evaluated using dichlorofluorescein (DCF) and dihydroethidium (DHE) staining, respectively.

Results: GPER activation promoted a similar relaxing response in resistance mesenteric arteries of female and male hypertensive rats, but with the participation of different endothelial mediators. Males appear to be more dependent on the NO pathway, followed by the H $_2$ O $_2$ pathway, and females on the endothelium and H $_2$ O $_2$ pathway.

Conclusion: These findings show that the GPER agonist G-1 can induce a relaxing response in mesenteric arteries from hypertensive rats of both sexes in a similar way, albeit with differential participation of endothelial mediators. These results contribute to the understanding of GPER activation on resistance mesenteric arteries in essential hypertension.

Keywords: GPER, G-1, hypertension, mesenteric resistance arteries, estrogen, vascular reactivity