

**Diferenças Sexuais no Relaxamento Induzido pelo
Agonista Seletivo do GPER em Artérias de Resistência de
Ratos Gonadectomizados**

Pollyana Peixoto

Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas

Doutorado em Ciências Fisiológicas

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Vitória, Fevereiro de 2022**

Pollyana Peixoto

**Diferenças Sexuais no Relaxamento Induzido pelo
Agonista Seletivo do GPER em Artérias de Resistência de
Ratos Gonadectomizados**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal
do Espírito Santo como requisito final para
obtenção do título de Doutora em Ciências
Fisiológicas.**

**Orientador: Prof. Dr. Roger Lyrio dos Santos.
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Nazaré Souza Bissoli.**

Vitória, Fevereiro de 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

**REGISTRO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE TESE DA
CANDIDATA AO TÍTULO DE DOUTORA PELO PPGCF/CCS/UFES**

Nº. Matrícula do(a) Candidato(a): 2017143213

A Comissão Julgadora que examinou a Tese de Doutorado, intitulada "**DIFERENÇAS SEXUAIS NO RELAXAMENTO INDUZIDO PELO AGONISTA SELETIVO DO GPER EM ARTÉRIAS DE RESISTÊNCIA DE RATOS GONADECTOMIZADOS**", apresentada e defendida publicamente pela aluna **POLLYANA PEIXOTO**, no dia 11 de fevereiro de 2022, às 14h, decidiu, por unanimidade, aprovar a referida Tese de Doutorado e, portanto, declara que a aluna faz jus à obtenção do Título Doutora em Ciências Fisiológicas.

Vitória – ES, 11 de fevereiro de 2022.

Profº. Drº. Roger Lyrio dos Santos
(Orientador)

Profª. Drª. Nazaré Souza Bissoli
(Co-orientadora)

Profª. Drª. Alessandra Simão Padilha
(Examinador Interno)

Profª. Drª. Sonia Alves Gouvea
(Examinador Interno)

Profª. Drª. Ana Raquel Santos de
Medeiros Garcia
(Examinador Externo)

Profª. Drª. Girlandia Alexandre Brasil
(Examinador Externo)

Observação: Documento de tramitação interna da Ufes. Não é comprobatório de conclusão de curso.

Campus Universitário de Maruípe – Av. Marechal Campos, 1468 – Maruípe, Vitória – ES, 29043-900
Tel. (27) 3335-7340 | cienciasfisiologicas.ufes.br | pos.cienciasfisiologicas@ufes.br

Peixoto, Pollyana, 1993

Diferenças Sexuais no Relaxamento Induzido pelo Agonista Seletivo do GPER em Artérias de Resistência de Ratos Gonadectomizados. [Vitória] 2022

xxi, 86 p., 29,7 cm (UFES, D. Sc., Ciências Fisiológicas, 2022)

Tese, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF.

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

AGRADECIMENTOS

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

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

Ao meu namorado **Arthur Horta Gasperazzo**, por abraçar meus planos como os seus, pela paciência, pela compreensão de minhas ausências, pelo incentivo, por ouvir as minhas angústias, apoiar as minhas decisões e sempre mostrar que tudo vai ficar bem. Obrigada por suportar os momentos difíceis comigo e por me mostrar o lado leve da vida. Te amo!

À minha prima **Lara Bulhões Melo**, uma amiga/irmã pra todas as horas que deixa o meu dia a dia mais divertido. Obrigada pelo companheirismo, pela admiração e carinho.

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

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

Ao meu orientador, Prof^o. Dr^o. **Roger Lyrio dos Santos**, pela oportunidade de cursar o doutorado e realizar esta pesquisa. Agradeço especialmente pelo projeto de doutorado e por sua essencial orientação.

À Prof^a. Dr^a. **Alessandra Simão Padilha**, Prof^a. Dr^a. **Ana Raquel Santos de Medeiros Garcia**, Prof^a. Dr^a. **Girlandia Alexandre Brasil** e Prof^a. Dr^a. **Sonia Alves Gouvea**, meu agradecimento não somente por aceitarem o convite de compor a banca examinadora desta tese, mas, sobretudo, pelas significativas contribuições.

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

Aos alunos e ex-alunos de iniciação científica **Priscilla Duarte Conrado, Antonio Tonon Bissoli, Felipe Tonon Firmino e Leonardo da Silva Escouto**, parceiros fundamentais no cumprimento das rotinas dos experimentos.

A toda equipe do Laboratório de Hipertensão Experimental (LHE – UFES) por todo companheirismo e ajuda especialmente aos alunos e ex-alunos **Antonio Tonon Bissoli, Felipe Tonon Firmino, Leonardo da Silva Escouto, Mariana dos Reis Couto, Phablo Wendell Costalonga Oliveira, Silas Nascimento Ronchi e Thatiany Jardim Batista**.

Aos colegas do Laboratório de Laboratório de Eletromecânica Cardíaca e Reatividade Vascular (LEMC – UFES), mas de modo particular aos alunos **Felipe Martinuzzo Filetti, Grazielle Zandominegue Ronchetti, Renata Andrade Ávila e Sabrina Bertoli Rodrigues** pelo auxílio e disponibilidade em todos os momentos. Aproveito para agradecer de forma especial à **Sabrina Bertoli Rodrigues**, uma amiga em todas as horas que deixa transparecer de modo suave todo seu cuidado e atenção para com o próximo. Obrigada pela sua generosidade, companhia e conselhos.

Aos ex-alunos do Laboratório de Regulação Neurohumoral da Circulação **Erick Roberto Gonçalves Claudio, Fabrício Bragança da Silva e Laís Almeida Menezes** pelo auxílio e disponibilidade em todos os momentos.

Ao corpo discente deste programa de pós-graduação pela confiança em mim enquanto sua representante no colegiado, e em especial, aos meus colegas de Comissão Discente **Igor Ferraz da Silva e Antonio Ferreira de Melo Junior**.

À Prof^a. Dr^a. **Alessandra Simão Padilha**, Prof^a. Dr^a. **Glauca Rodrigues de Abreu**, Prof^o. Dr^o. **Leonardo dos Santos**, Prof^a. Dr^a. **Maria Teresa Martins de Araujo**, Prof^o. Dr^o. **Nyam Florencio da Silva** e Prof^a. Dr^a. **Suely Gomes de Figueiredo** pelos conselhos, disposição em ajudar e suporte na realização do referido estudo.

À Profª. Drª. **Virgínia Soares Lemos** e todos os alunos do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular (ICB – UFMG) particularmente ao aluno **Ildernandes Vieira-Alves** pela excelente contribuição na realização deste estudo.

À Profª. Drª. **Luciana Venturini Rossoni** e a aluna **Gisele Kruger Couto** do Laboratório de Fisiologia Vascular (ICB – USP) pela parceria e auxílio neste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF – UFES) pelo empenho em ensinar e a atual coordenadora deste programa de pós-graduação, Profª. Drª. **Silvana dos Santos Meyrelles**. Aos técnicos de laboratório, em especial ao **Anderson de Almeida Barbosa**, ao médico veterinário **Rodolpho José da Silva Barros** e aos demais funcionários que direta ou indiretamente me ajudaram de alguma maneira.

Ao apoio financeiro da CAPES e FAPES.

Muito obrigada!!!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1. ESTRÓGENOS ENDÓGENOS E SAÚDE CARDIOVASCULAR.....	23
1.2. FUNÇÃO VASCULAR DOS ESTRÓGENOS.....	24
1.2.1. Óxido Nítrico	26
1.2.2. Prostanóides	28
1.2.3. Hiperpolarização dependente do endotélio – EDH	29
1.3. MECANISMOS DE AÇÃO DOS ESTRÓGENOS.....	30
1.3.1. Receptor de estrogênio acoplado a proteína G (GPER)	31
2. OBJETIVOS	35
2.1. OBJETIVO GERAL.....	35
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	36
3.2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	36
3.2.1. Ovariectomia	36
3.2.2. Orquidectomia	37
3.2.3. Reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência	37
3.2.4. Expressão proteica tecidual da eNOS, nNOS, Akt 1/2/3 e ERK 1/2 pela técnica de western blotting	39
3.2.5. Determinação da produção <i>in situ</i> de óxido nítrico (NO) pela técnica de fluorescência ao diacetato de 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína (DAF-FM)	41
3.2.6. Determinação da produção <i>in situ</i> de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pela técnica de fluorescência ao 2',7' diclorodihidrofluoresceína-diacetato (H₂DCF-DA)	42
3.2.7. Imunolocalização do GPER pela técnica de imunofluorescência	43
3.2.8. Ensaio de Imunofluorescência para marcação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS)	44
3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
4. RESULTADOS	47

4.1. RESPOSTA VASODILATADORA AO AGONISTA SELETIVO DO GPER EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RESISTÊNCIA.....	47
4.1.1. Avaliação da resposta vasodilatadora dependente do endotélio.....	48
4.1.2. Avaliação da participação dos mediadores endoteliais de relaxamento.....	49
4.1.2.1. Avaliação da participação do óxido nítrico (NO).....	49
4.1.2.2. Avaliação das vias de sinalização PI3k-Akt e MEK-ERK.....	53
4.1.2.3. Avaliação da participação dos prostanóides.....	55
4.1.2.4. Avaliação da participação da hiperpolarização dependente do endotélio (EDH).....	55
5. DISCUSSÃO.....	58
6. SUMARIZAÇÃO DOS RESULTADOS.....	65
7. CONCLUSÃO.....	66
8. REFERÊNCIAS.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos primários utilizados para western blot.....41

Tabela 2: Anticorpos secundários utilizados para western blot.....41

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura do GPER.....32
- Figura 2:** Estrutura molecular do (A) estrogênio e (B) G-1.....33
- Figura 3:** Organograma dos procedimentos experimentais.....36
- Figura 4:** Esquema representativo do protocolo das curvas concentração-resposta ao G-1 (1 nM – 10 mM) antes e após a incubação por 30 minutos com os fármacos estudados.....39
- Figura 5:** (A) Curva concentração-resposta dos anéis vasculares de ratos gonadectomizados (OVX: n = 47; ORX: n = 42) ao agonista seletivo do GPER (G-1, 1 nM – 10 µM). (B) Resposta à concentração máxima dos anéis vasculares ao agonista seletivo do GPER (G-1, 1 nM – 10 µM) e ao solvente dimetilsulfóxido (DMSO, OVX: n = 5; ORX: n = 5). Efeito do antagonista seletivo de GPER (G36 - 1 µM, OVX: n = 7; ORX: n = 7) e do antagonista simultâneo do RE α e RE β (ICI 182,780 - 1 µM, OVX: n = 7; ORX: n = 7) em fêmeas e machos gonadectomizados. Os valores foram expressos como média \pm EPM. * p < 0,05 vs DMSO. ANOVA duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni.....47
- Figura 6:** (A) Curva concentração-resposta ao agonista seletivo do GPER (G-1, 1 nM – 10 µM) em artérias mesentéricas de resistência (OVX: n = 47; ORX: n = 42). Efeito do agonista na ausência do endotélio (OVX: n = 7; ORX: n = 7). O gráfico de barras mostra a resposta de relaxamento à concentração máxima. (B) Imunodeteção do GPER em seções arteriais microscópicas (OVX: n = 5; ORX: n = 5), com a quantificação da fluorescência resultante nas diferentes camadas vasculares. Barra de escala = 20 µm. Os valores foram expressos como a média \pm EPM. * p < 0,05 comparado com a curva obtida antes da remoção do endotélio. ANOVA duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni ou teste de Mann-Whitney.....48
- Figura 7:** (A) Curva concentração-resposta ao agonista seletivo do GPER (G-1, 1 nM – 10 µM) em artérias mesentéricas de resistência (OVX: n = 47; ORX: n = 42). Efeito da inibição não seletiva da enzima óxido nítrico sintase (NOS) com N^w-nitro-L-arginina metil éster [L-NAME - 300 µM, (OVX: n = 7; ORX: n = 7)]. O gráfico de barras mostra a resposta de relaxamento à concentração máxima. (B) Análise representativa de microscopia de fluorescência marcada com diacetato de 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína (DAF-FM) em seções arteriais microscópicas (OVX: n = 5; ORX: n = 5) na ausência ou presença de G-1 [10 µM], com quantificação da fluorescência resultante. Barra de escala = 20 µm. Os valores foram expressos como a média \pm EPM. * p < 0,05 comparado com a curva obtida antes da inibição; * p < 0,05 vs basal. ANOVA uma ou duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni ou Newman-Keuls.....50
- Figura 8:** (A) Curva concentração-resposta ao agonista seletivo do GPER (G-1, 1 nM – 10 µM) em artérias mesentéricas de resistência (OVX: n = 47; ORX: n = 42). Efeito da inibição seletiva da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) com 1400W [10 µM, (OVX: n = 7; ORX: n = 7)]. O gráfico de barras mostra a resposta de

relaxamento à concentração máxima. (B) Imunodeteccção da iNOS em seções arteriais microscópicas (OVX: n = 5; ORX: n = 5), com a quantificação da fluorescência resultante na área vascular total. Barra de escala = 20 µm. Os valores foram expressos como média ± EPM. * p < 0,05 comparado com a curva obtida antes da inibição; † p < 0,05 vs OVX + 1400W; * p < 0,05 vs basal. ANOVA duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni ou Teste-t.....51

Figura 9: (A) Curva concentração-resposta ao agonista seletivo do GPER (G-1, 1 nM – 10 µM) em artérias mesentéricas de resistência (OVX: n = 47; ORX: n = 42). Efeito da inibição seletiva da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) com N^ω-propil-L-arginina [L-NPA - 2 µM, (OVX: n = 7; ORX: n = 7)]. O gráfico de barras mostra a resposta de relaxamento à concentração máxima. (B) Análise densitométrica da quantificação dos níveis de expressão proteica relativa da enzima nNOS (155 kDa), normalizada por α-actina (40 kDa), em artérias de resistência mesentérica (OVX: n = 4-8; ORX: n = 4-8). Linha pontilhada representativo das artérias basais como 100%. Os valores foram expressos como média ± EPM. * p < 0,05 comparado com a curva obtida antes da inibição. ANOVA duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni.....52

Figura 10: Análise densitométrica da quantificação dos níveis de expressão proteica relativa da enzima eNOS total (140 kDa) e p-eNOS (140 kDa), normalizada por α-actina (40 kDa) e eNOS total respectivamente, em artérias de resistência mesentérica (OVX: n = 4-8; ORX: n = 4-8). Linha pontilhada representativo das artérias basais como 100%. Os valores foram expressos como média ± EPM. * p < 0,05 vs OVX + G-1. ANOVA duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni.....53

Figura 11: (A) Curva concentração-resposta ao agonista seletivo do GPER (G-1, 1 nM – 10 µM) em artérias mesentéricas de resistência (OVX: n = 47; ORX: n = 42). Efeito da inibição da via de sinalização rápida PI3k-Akt com LY-294,002 [2.5 µM, (OVX: n = 7; ORX: n = 7)]. O gráfico de barras mostra a resposta de relaxamento à concentração máxima. Análise densitométrica da quantificação dos níveis de expressão proteica relativa da enzima (B) Akt 1/2/3 total (56 kDa) e p-Akt 1/2/3 (60 kDa), normalizada por α-actina (40 kDa) e Akt 1/2/3 total, respectivamente e (C) ERK 1/2 total (42-44 kDa) e p-ERK 1/2 (42-44 kDa), normalizada por α-actina (40 kDa) e ERK 1/2 total, respectivamente em artérias de resistência mesentérica (OVX: n = 4-8; ORX: n = 4-8). Linha pontilhada representativo das artérias basais como 100%. Os valores foram expressos como média ± EPM. * p < 0,05 comparado com a curva obtida antes da inibição; † p < 0,05 vs OVX + 1400W; * p < 0,05 vs OVX + G-1 ou ORX + G-1. ANOVA duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni.....54

Figura 12: Curva concentração-resposta ao agonista seletivo do GPER (G-1, 1 nM – 10 µM) em artérias mesentéricas de resistência (OVX: n = 47; ORX: n = 42). Efeito da inibição não seletiva da enzima ciclooxigenase (COX) com indometacina [INDO - 10 µM, (OVX: n = 7; ORX: n = 7)]. O gráfico de barras mostra a resposta de relaxamento à concentração máxima. Os valores foram expressos como média ± EPM. ANOVA duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni.....55

Figura 13: Curva concentração-resposta ao agonista seletivo do GPER (G-1, 1 nM – 10 µM) em artérias mesentéricas de resistência (OVX: n = 47; ORX: n = 42). Efeito da inibição inespecífica da enzima citocromo P450 (CYP) com clotrimazol [CLOT -

0,75 μM , (OVX: n = 7; ORX: n = 7)]. O gráfico de barras mostra a resposta de relaxamento à concentração máxima. Os valores foram expressos como média \pm EPM. ANOVA duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni.....56

Figura 14: (A) Curva concentração-resposta ao agonista seletivo do GPER (G-1, 1 nM – 10 μM) em artérias mesentéricas de resistência (OVX: n = 47; ORX: n = 42). Efeito da inibição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com catalase [CAT - 1000 u/mL, (OVX: n = 7; ORX: n = 7)]. O gráfico de barras mostra a resposta de relaxamento à concentração máxima. (B) Análise representativa de microscopia de fluorescência dos sinais emitidos pela oxidação do 2', 7'- diclorofluoresceína (DCF-DA) em seções arteriais microscópicas (OVX: n = 5; ORX: n = 5) na ausência ou presença de G-1 [10 μM], com quantificação da fluorescência resultante. Barra de escala = 20 μM . Os valores foram expressos como média \pm EPM. * p < 0,05 comparado com a curva obtida antes da inibição. † p < 0,05 vs ORX+ CAT; * p < 0,05 vs basal ou G-1 + CAT ou ORX + G-1. ANOVA uma ou duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni ou Newman-Keuls.....57

LISTA DE ABREVIATURAS

- [Ca²⁺]_i** Concentração intracelular de íons cálcio
- °C** Graus Celsius
- μM** Micromolar
- %** Porcentagem
- AA** Ácido araquidônico
- AC** Adenilil ciclase
- ACh** Acetilcolina
- Akt** Proteína quinase B
- ANG II** Angiotensina II
- ANOVA** Análise de variância
- BH4 (6R)** - 5,6,7,8-tetrahidro-L-biopterina
- BK_{Ca}** Canal para potássio ativado por cálcio de alta condutância
- bNOS** Óxido nítrico sintase neuronal
- Ca²⁺** Íon cálcio
- CaM** Calmodulina
- cAMP** 3', 5'-monofosfato cíclico de adenosina
- CAPES** Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior
- CAT** Catalase
- Cav** Canais para Ca²⁺ operados por voltagem
- Cav-1** Caveolina-1
- CEUA** Comissão de Ética no Uso de Animais
- cGMP** 3', 5'-monofosfato cíclico de guanosina
- CLOT** Clotrimazol
- cMLV** Células do músculo liso vascular
- cNOS** Óxido nítrico sintase endotelial
- CONCEA** Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

COX Ciclooxygenase

COX-1 Ciclooxygenase-1

COX-2 Ciclooxygenase-2

CYP Citocromo P450

DAF-FM Diacetato de 4-amino-5-metilamino-2', 7'-difluorofluoresceína

DAG Diacilglicerol

DCF-DA 2',7' diclorodihidrofluoresceína-diacetato

DCVs Doenças cardiovasculares

DMSO Dimetilsulfóxido

E Estrogênio

EDH Hiperpolarização dependente do endotélio

EETs Ácidos epoxieicosatrienoicos

eNOS Óxido nítrico sintase endotelial

EPM Erro padrão da média

ERK Quinase regulada por sinais extracelulares

ER α Receptor de estrogênio alfa

ER β Receptor de estrogênio beta

ET-1 Endotelina-1

FAD Flavina-adenina-dinucleotídeo

FAPES Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo

FMN Mononucleotídeo de flavina

G-1 1-[4-(6-bromobenzo[1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]quinolin-8-yl]-ethanone

G36 4-(6-bromo-benzo[1,3]dioxol-5-yl)-8-isopropyl-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]quinolone

GCs Guanilato ciclase citosólica solúvel

GPCR Receptor acoplado à proteína G

GPGR Receptor de estrogênio acoplado a proteína G

Gs Proteína G estimulatória

H₂O₂ Peróxido de hidrogênio

H₂S Sulfeto de hidrogênio

ICB Instituto de Ciências Biológicas

ICB Instituto de Ciências Biomédicas

IK_{Ca} Canal para potássio ativado por cálcio de condutância intermediária

INDO Indometacina

iNOS Óxido nítrico sintase induzível

IP3 Inositol 1,4,5-trifosfato

IP Receptor de prostaciclina

i.p. Intraperitoneal

K⁺ Íon potássio

K_{ATP} Canal para potássio sensível a ATP

K_{Ca} Canal para potássio ativado por cálcio

K_{IR} Canal para potássio retificador de influxo

K_V Canal para potássio ativado por voltagem

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

L-NPA N^ω-propil-L-arginina

macNOS Óxido nítrico sintase induzível

MEK Proteína quinase ativada por mitógeno

mL Mililitros

MLCK Quinase de cadeia leve da miosina

MLV Músculo liso vascular

NADPH Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato

nM Nanomolar

nNOS Óxido nítrico sintase neuronal

NO Óxido nítrico

NOS Óxido nítrico sintase

NOX NADPH oxidase

O₂ Oxigênio

O₂⁻ Ânion superóxido

ORX Orquidectomizado

OVX Ovariectomizada

PE Fenilefrina

PGG₂ Prostaglandina G2

PGH₂ Prostaglandina H2

PGI₂ Prostaciclina

PGs Prostaglandinas

PI3k Fosfatidilinositol-3-quinase

PIP₂ Fosfatidilinositol bifostato

PKG Proteína quinase G

PLA₂ Fosfolipase A₂

PLC Fosfolipase C

PNs Prostanóides

PPGCF Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas

RE Receptor de estrogênio

RE α Receptor de estrogênio do tipo alfa

RE β Receptor de estrogênio do tipo beta

SK_{Ca} Canal para potássio ativado por cálcio de baixa condutância

TXA₂ Tromboxano A₂

U.A Unidades arbitrárias

UFES Universidade Federal do Espírito Santo

UFMG Universidade Federal de Minas Gerais

USP Universidade de São Paulo

RESUMO

Introdução: Os efeitos não genômicos do estrogênio, que incluem efeitos vasculares rápidos, têm sido atribuídos ao receptor de estrogênio acoplado à proteína G (GPER). No entanto, os mecanismos subjacentes aos efeitos vasculares modulados pelo GPER não são bem conhecidos, inclusive no contexto das artérias de resistência, especialmente na privação de hormônios sexuais gonadais. Assim, investigamos a função vascular do GPER em artérias mesentéricas de resistência de ratos gonadectomizados de ambos os sexos.

Métodos: Foram utilizados ratos Wistar (12 semanas de idade) de ambos os sexos. A gonadectomia foi realizada. Após 21 dias, os ratos foram eutanasiados. Artérias mesentéricas de terceira ordem foram isoladas e montadas. Curvas de concentração-resposta foram obtidas por adições cumulativas do agonista G-1 (1 nM - 10 μ M) ou veículo (dimetilsulfóxido – DMSO) em vasos pré-contraídos com fenilefrina. Os efeitos vasodilatadores do G-1 foram avaliados antes e após a remoção do endotélio ou incubação por 30 min com inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), inibidor não seletivo da enzima ciclooxigenase (COX), inibidor inespecífico da enzima citocromo P450 (CYP) ou varredor enzimático de H_2O_2 (L-NAME, INDOMETACINA, CLOTRIMAZOL e CATALASE, respectivamente), inibidor da via de sinalização rápida PI3K-Akt (LY-294,002), inibidor seletivo da enzima iNOS (1400W), inibidor seletivo da enzima nNOS (L-NPA), antagonista seletivo de GPER (G36) e antagonista simultâneo do RE α e RE β (ICI 182,780). A expressão proteica tecidual da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), proteína quinase B (Akt 1/2/3) e quinase regulada por sinais extracelulares (ERK 1/2) foi mensurada por western blotting, com e sem estímulo (G-1, 10 μ M). Os níveis vasculares de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram determinados *in situ* utilizando a sonda diacetato de 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína (DAF-FM) e 2',7'-diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCF-DA), respectivamente, com e sem estímulo de G-1 [10 μ M] na presença ou não de L-NAME [300 μ M] ou catalase [1000 unt/ml], respectivamente. A imunofluorescência para marcação do GPER ou iNOS foi realizada nas artérias investigadas por imunofluorescência. Os dados foram analisados por ANOVA uma ou duas vias, seguida do teste post-hoc de Bonferroni/Newman-Keuls ou Teste-t. Teste de Mann-Whitney foi utilizado para os dados não-paramétricos. Foi considerado $p < 0,05$. Os protocolos foram aprovados pela CEUA-UFES (067/2017).

Resultados: O agonista seletivo do GPER induziu relaxamento dependente de concentração nas artérias mesentéricas de resistência de fêmea (93.6 ± 0.8 %) e macho (90.0 ± 1.3 %) gonadectomizados, sem diferença entre os sexos. Na ausência de endotélio, a resposta ao G-1 foi diminuída em fêmea (54.4 ± 1.6 %) e macho (46.9 ± 1.9 %), mas não foi abolida. A marcação do GPER foi similar nas secções arteriais dos grupos estudados, independente da camada vascular. O vasorelaxamento foi atenuado em ambos os grupos na presença de L-NAME (OVX: 68.5 ± 6.6 % vs ORX: 65.3 ± 4.0 %). A produção local de NO também foi similar nos animais gonadectomizados. 1400W (OVX: 96.5 ± 1.2 % vs ORX: 63.6 ± 5.4 %*) e LY-294,002 (OVX: 91.7 ± 2.1 % vs ORX: 75.6 ± 3.5 %*) reduziram a resposta à concentração máxima apenas no macho. A marcação da iNOS foi significativamente maior nas secções arteriais dos animais ORX. A expressão proteica da p-eNOS (OVX: 99.6 ± 7.4 U.A vs ORX: 151.8 ± 5.5 U.A*) e p-Akt 1/2/3 (OVX: 104.3 ± 7.9 U.A

vs ORX: 134.5 ± 7.9 U.A*) foram maiores no grupo ORX. eNOS (OVX: 104.2 ± 12.6 U.A vs ORX: 117.1 ± 5.8 U.A), Akt 1/2/3 (OVX: 108.0 ± 6.6 U.A vs ORX: 107.9 ± 14.6 U.A) e ERK 1/2 (OVX: 91.1 ± 2.2 U.A vs ORX: 96.4 ± 1.7 U.A) total foram similares entre os grupos. Por outro lado, p-ERK 1/2 apresentou aumento na expressão somente no grupo OVX (OVX: 146.2 ± 2.2 U.A* vs ORX: 97.0 ± 14.5 U.A). L-NPA (OVX: 88.3 ± 2.3 % vs ORX: 84.8 ± 3.3 %) promoveu maior responsividade vasodilatadora em ambos os sexos, sem alterar a resposta vasodilatadora à concentração máxima. A expressão proteica da nNOS total foi aumentada, sem diferença entre os grupos, após o estímulo com agonista (OVX: 126.5 ± 5.6 U.A vs ORX: 124.0 ± 17.9 U.A). CATALASE (OVX: 72.1 ± 2.9 %* vs ORX: 90.7 ± 2.8 %) reduziu o relaxamento à concentração máxima apenas na fêmea. A produção *in situ* de H₂O₂ também foi maior nas secções arteriais das fêmeas. INDOMETACINA (OVX: 97.1 ± 1.0 % vs ORX: 95.3 ± 0.6 %) e CLOTRIMAZOL (OVX: 92.4 ± 2.3 % vs ORX: 92.2 ± 2.1 %) não reduziram o vasorelaxamento em nenhum dos grupos.

Conclusão: Esses achados sugerem que o GPER modula o relaxamento vascular por meio de diferentes mediadores endoteliais e mecanismos que variam de acordo com o sexo. Os resultados obtidos no presente estudo fornecem uma nova visão sobre os efeitos das respostas induzidas pelo estrogênio via GPER sobre a função vascular na privação de hormônios sexuais gonadais.

Palavras-chave: GPER, Diferenças sexuais, Gonadectomia, Relaxamento vascular, Artérias mesentéricas de resistência.

ABSTRACT

Introduction: Non-genomic effects of estrogen, which include rapid vascular effects, have been attributed to the G protein-coupled estrogen receptor (GPER). However, the mechanisms underlying the vascular effects modulated through GPER are not well known, including in the context of resistance arteries, especially in deprivation of gonadal sex hormones. Thus, we investigated the vascular function of GPER in mesenteric resistance arteries from gonadectomized rats of both sex.

Methods: Wistar rats (12 weeks old) of both sexes were used. Gonadectomy was performed. After 21 days, rats were euthanized. Third-order mesenteric arteries were isolated and mounted. Concentration-response curves were obtained by cumulative additions of G-1 agonist (1 nM - 10 μ M) or vehicle (dimethyl sulfoxide – DMSO) in vessels pre-contracted with phenylephrine. The vasodilatory effects of G-1 were assessed before and after removal of the endothelium or incubation for 30 min with non-selective inhibitor of the enzyme nitric oxide synthase (NOS), non-selective inhibitor of the cyclooxygenase enzyme (COX), non-specific inhibitor of the cytochrome P450 enzyme (CYP) or H₂O₂ enzymatic scavenger (L-NAME, INDOMETACIN, CLOTRIMAZOLE and CATALASE, respectively), PI3K-Akt fast signaling pathway inhibitor (LY-294.002), selective iNOS enzyme inhibitor (1400W), selective enzyme inhibitor nNOS (L-NPA), selective GPER antagonist (G36) and simultaneous RE α and RE β antagonist (ICI 182,780). Tissue protein expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), neuronal nitric oxide synthase (nNOS), protein kinase B (Akt 1/2/3) and extracellular signal-regulated kinase (ERK 1/2) was measured by western blotting, with and without stimulus (G-1, 10 μ M). Vascular levels of nitric oxide (NO) and hydrogen peroxide (H₂O₂) were determined in situ using 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM) and 2',7' dichlorodihydrofluorescein-diacetate (DCF-DA), respectively, with and without G-1 stimulation [10 μ M] in the presence or not of L-NAME [300 μ M] or catalase [1000 unt/ml], respectively. Immunofluorescence for labeling GPER or iNOS was performed in arteries investigated by immunofluorescence. Data were analyzed by one-way or two-way ANOVA, followed by post-hoc Bonferroni/Newman-Keuls or t-test. Mann-Whitney test was used for non-parametric data. It was considered p < 0.05. The protocols were approved by CEUA-UFES (067/2017).

Results: Selective GPER agonist induced concentration-dependent relaxation in mesenteric resistance arteries in both female (93.6 \pm 0.8 %) and male (90.0 \pm 1.3 %) gonadectomized, without sex difference. In the endothelium absence, the response to G-1 was decreased in both female (54.4 \pm 1.6 %) and male (46.9 \pm 1.9 %), but was not abolished. GPER marking was similar in the arterial sections of the studied groups, regardless of the vascular layer. Vasorelaxation was attenuated in both groups in the presence of L-NAME (OVX: 68.5 \pm 6.6 % vs ORX: 65.3 \pm 4.0 %). Local NO production was also similar in the gonadectomized animals. 1400W (OVX: 96.5 \pm 1.2 % vs ORX: 63.6 \pm 5.4 %*) and LY-294.002 (OVX: 91.7 \pm 2.1 % vs ORX: 75.6 \pm 3.5 %*) reduced the response to maximum concentration only in males. iNOS labeling was significantly higher in the arterial sections of ORX animals. Protein expression of p-eNOS (OVX: 99.6 \pm 7.4 U.A vs ORX: 151.8 \pm 5.5 U.A*) and p-Akt 1/2/3 (OVX: 104.3 \pm 7.9 U.A vs ORX: 134.5 \pm 7.9 U.A*) were higher in the ORX group. eNOS (OVX: 104.2 \pm 12.6 U.A vs ORX: 117.1 \pm 5.8 U.A), Akt 1/2/3 (OVX: 108.0 \pm 6.6 U.A vs ORX: 107.9 \pm 14.6 U.A) and ERK 1/2 (OVX: 91.1 \pm 2.2 U.A vs

ORX: 96.4 ± 1.7 U.A) total were similar between groups. On the other hand, p-ERK 1/2 showed an increase in expression only in the OVX group (OVX: 146.2 ± 2.2 U.A* vs ORX: 97.0 ± 14.5 U.A). L-NPA (OVX: 88.3 ± 2.3 % vs ORX: 84.8 ± 3.3 %) promoted greater vasodilator responsiveness in both sexes, without changing the vasodilator response at maximum concentration. Protein expression of total nNOS was increased, with no difference between groups, after agonist stimulation (OVX: 126.5 ± 5.6 U.A vs ORX: 124.0 ± 17.9 U.A). CATALASE (OVX: 72.1 ± 2.9 %* vs ORX: 90.7 ± 2.8 %) reduced relaxation to maximum concentration only in female. In situ production of H_2O_2 was also higher in the female arterial sections. INDOMETHACIN (OVX: 97.1 ± 1.0 % vs ORX: 95.3 ± 0.6 %) and CLOTRIMAZOLE (OVX: 92.4 ± 2.3 % vs ORX: 92.2 ± 2.1 %) did not reduced vasorelaxation in either group.

Conclusion: These findings suggest that GPER modulated vascular relaxing through different endothelial mediators and mechanisms that will vary according to sex. The results obtained in the present study provide new insight into the effects of oestrogen-induced responses via GPER on vascular function in deprivation of gonadal sex hormones.

Key words: GPER, Sex differences, Gonadectomy, Vascular relaxation, Mesenteric resistance arteries.

1. INTRODUÇÃO

1.1. ESTRÓGENOS ENDÓGENOS E SAÚDE CARDIOVASCULAR

Estudos evidenciam que, mulheres e homens diferem em incidência e prevalência de doenças cardiovasculares (DCVs), sendo mais frequentes em homens do que em mulheres na pré-menopausa de mesma idade (TUNSTALL-PEDOE *et al.*, 1994; ROSENTHAL & OPARIL, 2000; MARK *et al.*, 2007; OCARINO *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2012; SHUFELT *et al.*, 2018). Não obstante, com o aumento cada vez maior da expectativa de vida da população mundial, mais mulheres têm atingido a fase pós-menopausa, o que vem acompanhado de maior incidência epidemiológica de DCVs (BARTON & MEYER, 2009; YANG & RECKELHOF, 2011; BAI & WANG, 2020; VOGEL *et al.*, 2021). À vista disso, a menopausa se torna um fator de risco para DCVs, causa importante de mortes em países industrializados (GILDE *et al.*, 2003; LEKONTSEVA *et al.*, 2009; VOGEL *et al.*, 2021).

Nessa perspectiva, evidências recentes sugerem que o hipogonadismo masculino ou a terapia de privação androgênica administrada a homens com câncer de próstata estão relacionados a complicações cardiovasculares como aumento do risco trombótico, aumento do risco de infarto do miocárdio, arritmia grave, acidente vascular cerebral e morte súbita cardíaca (HU *et al.*, 2020; GHEORGHE *et al.*, 2021; CEREDA *et al.*, 2022). Possivelmente, esses efeitos adversos podem ser atribuídos às implicações clínicas da fisiologia da testosterona e sua aromatização ao estradiol (RUSSELL & GROSSMANN, 2019).

Vale ressaltar que, as doenças do sistema cardiovascular representam a principal causa de morbidade e mortalidade entre homens e mulheres nos países desenvolvidos, e têm se tornado cada vez mais prevalentes nos países em desenvolvimento (MENSAH & BROWM, 2007; WANG *et al.*, 2014; SIMSEKYILMAZ *et al.*, 2015; VOGEL *et al.*, 2021), sendo a principal causa de morte ao longo do século XXI (MURRAY & LOPEZ, 1997; MOZAFFARIAN *et al.*, 2016; VOGEL *et al.*, 2021). Além disso, é importante destacar que o declínio severo na produção de hormônios sexuais ovarianos, fenômeno característico observado na fase pós-menopausa, contribui para o aumento de eventos cardiovasculares nocivos nessas mulheres (KANNEL *et al.*, 1976; BUSH, 1990; BARRETT-CONNOR & BUSH, 1991;

SHUFELT *et al.*, 2018), impulsionando a inversão da disparidade sexual. Isso é consistente com a observação de que os estrógenos desempenham importante papel cardioprotetor com conseqüente manutenção da saúde cardiovascular (ORSHAL & KHALIL, 2004; MARIC-BILKAN & MANIGRASSO, 2012).

Dentro desse contexto, estudos têm indicado que os estrogênios endógenos (particularmente sua forma fisiologicamente mais relevante, 17 β -estradiol ou E), estão associados a efeitos anti-inflamatórios (PACIFICI, 1996; STORK *et al.*, 2004; VURAL *et al.*, 2006; MOREAU *et al.*, 2013a) e propriedades antioxidantes diretas e indiretas (DANTAS *et al.*, 2002; STREHLOW *et al.*, 2003; MOREAU *et al.*, 2013b) que são cruciais para a manutenção da função vascular. Notavelmente, o 17 β -estradiol pode exercer potentes efeitos modulatórios que contribuem para a homeostase vascular independente do sexo, conforme demonstrado anteriormente em fêmeas (BARTON & MEYER, 2009; YANG & RECKELHOFF, 2011) e machos (BLUMENTHAL *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 2000; HESS, 2003; DOS SANTOS *et al.*, 2014; HSU *et al.*, 2016).

1.2. FUNÇÃO VASCULAR DOS ESTRÓGENOS

O 17 β -estradiol pode promover vasoproteção por sua interação com os receptores vasculares de estrogênio (genômicos e/ou não genômico) presentes nas células que compõem a parede vascular (DANTAS *et al.*, 1999; CHAKRABARTI *et al.*, 2014; MARTIN & EYSTER, 2016).

A parede dos vasos sanguíneos varia em diâmetro e composição (de acordo com seu papel fisiológico), sendo formada basicamente por três camadas: túnica adventícia, túnica média e túnica interna (BURTON, 1954). A modelagem estrutural da parede arterial, por sua vez, consiste de componentes celulares e extracelulares que foram tradicionalmente classificados em três camadas concêntricas, sendo elas (i) túnica íntima - revestimento endotelial mais uma fina camada de tecido conjuntivo subjacente chamada subendotélio; (ii) túnica média - camadas alternadas de membranas elásticas (lâmina elástica) e músculo liso; e (iii) túnica adventícia - tecido conjuntivo bastante denso carregando pequenos vasos sanguíneos (*vaso vasorum*) e terminações nervosas (MARTINEZ-LEMUS *et al.*, 2009; MARTINEZ-LEMUS, 2012).

A superfície endotelial tem sido considerada um importante órgão regulador (sistema autócrino, parácrino e endócrino) que está envolvido na síntese e liberação de substâncias metabolicamente ativas, capazes de promover a manutenção da homeostase e do tônus vascular (RUBANYI, 1993; DONATO *et al.*, 2009). A produção equilibrada dos fatores vasoativos ocorre por meio da liberação de potentes substâncias vasorelaxantes que regulam o tônus vascular, como o óxido nítrico (NO), a prostaciclina (PGI₂) e a hiperpolarização dependente do endotélio (EDH), bem como pela liberação de fatores vasoconstritores, tais como endotelina-1 (ET-1), a angiotensina II (ANG II) e os produtos do metabolismo do ácido araquidônico como o tromboxano A₂ (TXA₂) (SANDOO *et al.*, 2010). O endotélio vascular é composto por uma única camada de células (tecido epitelial pavimentoso), situadas estrategicamente entre o sangue circulante e o músculo liso vascular (MLV), com a capacidade de responder às mudanças (físicas, químicas e humorais) por meio da produção e liberação de uma série de substâncias biologicamente ativas (NAGAO & VANHOUTTE, 1993; PEARSON & VANHOUTTE, 1993) capazes de modular o tônus do MLV subjacente (VANHOUTTE *et al.*, 2017), fator determinante de resistência vascular.

A síntese das substâncias vasoativas nas células endoteliais requer aumento na concentração intracelular de íons cálcio (Ca²⁺) (FILIPPINI *et al.*, 2019). É importante ressaltar que, o aumento na oferta do Ca²⁺ à maquinaria celular endotelial, pode ser modulado pelo estrogênio. Este aumento, por sua vez, pode resultar tanto da ativação rápida da fosfolipase C (PLC), a qual hidrolisa a fosfatidilinositol bifostato (PIP₂), levando a síntese dos segundos mensageiros inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG), provocando a liberação de Ca²⁺ pelo retículo sarcoplasmático e mobilização de Ca²⁺ através de canais da membrana, respectivamente (LE MELLAY *et al.*, 1997), quanto pela ativação direta de canais para potássio ativados por cálcio (K_{Ca}) na membrana dessas células, o que levaria a hiperpolarização com resultante aumento do influxo de Ca²⁺ (RUSKO *et al.*, 1995).

A camada de músculo liso da parede vascular também pode ter seu controle intrínseco regulado por mecanismos diretos sobre suas células (TOUYZ *et al.*, 2018). Dentre os mecanismos diretos pelos quais o estrogênio afeta o tônus vascular, encontram-se: (i) inibição dos canais para cálcio do tipo L voltagem dependente

(CREWS & KHALIL, 1999; MAZZUCA *et al.*, 2015), atuando sobre os mecanismos de liberação intracelular de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático e entrada de Ca^{2+} a partir do espaço extracelular (RUEHLMANN *et al.*, 1998). Os efeitos inibitórios sobre a mobilização de Ca^{2+} ocorrem por meio da redução na concentração intracelular desse íon desencadeada pelo antagonismo dos canais de Ca^{2+} (SUDHIR *et al.*, 1995; RESLAN & KHALIL, 2012) e conseqüentemente relaxamento; e (ii) o E estimula diretamente a corrente de saída de potássio (WHITE *et al.*, 1995; ROSENFELD *et al.*, 2000; TEP-AREENAN *et al.*, 2003) com conseqüente hiperpolarização das células do músculo liso vascular (cMLV), ao mesmo tempo, essa hiperpolarização reduz a probabilidade de abertura dos canais para cálcio do tipo L levando ao relaxamento do MLV (VALVERDE *et al.*, 1999).

Adicionalmente, o estrogênio tem numerosos efeitos biológicos potencialmente favoráveis, incluindo o favorecimento da produção e liberação equilibrada de fatores vasoativos bem como a regulação do crescimento e da proliferação das cMLV e propriedades antiinflamatórias e antioxidantes, apontando para um papel crítico na determinação da saúde vascular (DONATO *et al.*, 2009; SANDOO *et al.*, 2010; RESLAN & KHALIL, 2012; USSELMAN *et al.*, 2016).

1.2.1. Óxido Nítrico

Evidências disponíveis indicam que a liberação de óxido nítrico (NO) pode ser modulada positivamente pelo estrogênio (WEINER *et al.*, 1994; WHITE *et al.*, 1995; KHALIL, 2013). O NO é um radical livre gasoso, com uma meia-vida curta, mas extremamente difusível pela membrana celular. É uma molécula bio-reguladora que exerce papel fundamental nos sistemas nervoso, imunológico e cardiovascular (MONCADA *et al.*, 1991; ALJADA & DANDONA, 1998). O envolvimento fisiológico deste fator parácrino no sistema vascular inclui: (i) vasodilatação potente; (ii) modulação da agregação e adesão plaquetária; (ii) inibição da coagulação, da oxidação da lipoproteína de baixa densidade e da proliferação celular; e (iv) redução da expressão de genes pró-inflamatórios (FÉLÉTOU & VANHOUTTE, 2009; FÖRSTERMANN, 2010; MUTCHLER & STRAUB, 2015).

A biossíntese do NO envolve um processo enzimático a partir dos co-substratos L-arginina, oxigênio molecular (O_2) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) reduzida (doador de elétrons), onde ocorre oxidação de cinco

elétrons de L-arginina a NO, juntamente com a produção estequiométrica de L-citrulina pela ação catalisadora da enzima óxido nítrico sintase (NOS) com participação dos cofatores flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD), mononucleotídeo de flavina (FMN) e (6R) - 5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterina (BH4) (PALMER *et al.*, 1988; FÖRSTERMANN & MÜNZEL, 2006; THOMAS *et al.*, 2008; FÖRSTERMANN, 2010; FÖRSTERMANN & SESSA, 2012; MUTCHLER & STRAUB, 2015).

Em mamíferos, existem três diferentes isoformas da enzima NOS: a (i) NO sintase neuronal (nNOS, bNOS, tipo I) constitutivamente presente nas células neuronais centrais e periféricas e em certas células epiteliais (MONCADA *et al.*, 1997; MUNGRUE *et al.*, 2002; WALFORD & LOSCALZO, 2003); a (ii) NO sintase induzível (iNOS, macNOS, tipo II) geralmente não é expressa constitutivamente, mas pode ser induzida em macrófagos e muitas outras células (DELL'ALBANI *et al.*, 2001) e a (iii) NO sintase endotelial (eNOS, cNOS, tipo III) constitutivamente encontrada principalmente em células endoteliais (ZHANG & HINTZE, 2006). A enzima existe como homodímero, sendo que cada monômero é composto por um domínio redutase (homólogo ao NADPH:450 redutase) e um domínio oxidase (classe de proteínas heme-tiol). Ligando os dois domínios existe uma molécula de calmodulina (CaM), que regula o fluxo de elétrons entre os domínios. Dentre as três isoformas descritas, a iNOS é a única que não tem sua atividade regulada pelo Ca^{2+} (ALJADA & DANDONA, 1998; GROVES & WANG, 2000; ALDERTON *et al.*, 2001; ZHOU & ZHU, 2009).

No sistema vascular, há maior expressão da isoforma endotelial, que está associada à uma molécula de caveolina-1 (Cav-1) na membrana celular, ligada a receptores para sinalizadores. A atividade da eNOS e/ou interação com as fosfatases e quinases capazes de alterar essa fosforilação, pode ser modulada pelo estrogênio. Sugere-se que a eNOS possa ser regulada pela ativação rápida da fosfatidilinositol-3-quinase/proteína quinase B (PI3k-Akt) e subsequente fosforilação no resíduo de serina 1177 (HAYNES *et al.*, 2000; SIMONCINI *et al.*, 2000), assim como pela proteína quinase ativada por mitógeno/quinase regulada por sinais extracelulares (MEK-ERK) com fosforilação no resíduo de serina 635 (RAMADOSS *et al.*, 2013), estimulando a sua atividade e iniciando a produção do NO. Uma vez sintetizado e liberado pelo endotélio, sua principal ação fisiológica está associada à ativação da guanilato ciclase citosólica solúvel (GCs) e consequente aumento da

concentração intracelular de 3', 5'-monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), que por sua vez ativa a proteína quinase G (PKG) promovendo o relaxamento da musculatura lisa vascular por meio da (i) ativação dos canais para potássio (BOLOTINA *et al.*, 1994; ARNOLD *et al.*, 1977; FÉLÉTOU & VANHOUTTE, 2000; PACHER *et al.*, 2007); (ii) estimulação da atividade da bomba Na^+/K^+ -ATPase (GUPTA *et al.*, 1994); (iii) inibição da produção de IP3 e fosforilação do receptor IP3; (iv) estimulação da Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática; e (v) fosforilação da quinase de cadeia leve da miosina (MLCK) (CARVAJAL *et al.*, 2000; MARÍN & RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 1997).

1.2.2. Prostanóides

Os prostanóides (PNs) mais comuns incluem as prostaglandinas (PGs), tais como a prostaciclina (PGI_2) e o tromboxano A_2 (TXA_2). São mediadores lipídicos cíclicos (superfamília dos eicosanóides) derivados da ciclo-oxigenação enzimática (via da ciclooxigenase - COX), de ácidos graxos polinsaturados lineares como o ácido araquidônico (AA). Liberados pela parede vascular (predominantemente pelo endotélio) possuem ação vasomotora, os quais desempenham importante função na regulação da permeabilidade e tônus vascular (ALVAREZ *et al.*, 2005; ALVAREZ *et al.*, 2007; HORIKAMI *et al.*, 2020).

Biologicamente, a síntese dos PNs é desencadeada pela ação de duas isoformas principais da ciclooxigenase, denominadas ciclooxigenase-1 (COX-1) e ciclooxigenase-2 (COX-2) (SMITH *et al.*, 1996). As propriedades da COX-1 são diferentes das da COX-2 (MORITA, 2002). Sugere-se que a COX-1 é a isoforma constitutiva presente em níveis relativamente estáveis em muitos tecidos e células (LUO *et al.*, 2016). Em contra partida, a COX-2 é a isoforma induzida, regulada positivamente principalmente por estímulos pró-inflamatórios (PATRONO, 2016).

Os componentes catalisadores (COX-1 e COX-2) influenciam diretamente na sinalização da cascata dos eicosanóides. Inicialmente, ocorre a liberação do AA a partir dos fosfolípidios de membrana, por ação da fosfolipase A_2 (PLA_2). Em seguida, o AA é convertido a endoperóxido prostaglandina G_2 (PGG_2), produto intermediário da reação, por ação da COX (COX-1 e COX-2), para então formar prostaglandina H_2 (PGH_2) sob ação de peroxidases. PGH_2 é um produto vasoconstritor precursor imediato de muitas outras prostaglandinas e tromboxanos. Por fim, ocorre a

conversão de PGH_2 para produtos finais de PNs, biologicamente ativos, por ação de sintases ou isomerases específicas (CHANG *et al.*, 1987; BOS *et al.*, 2004).

O estrogênio possui efeito modulatório sobre a função endotelial por estimular a liberação da prostaciclina (PGI_2), um dos metabólitos da COX (ÁLVAREZ *et al.*, 2002; SHERMAN *et al.*, 2002). A vasodilatação em resposta a PGI_2 ocorre por união a seu receptor específico (IP) que está acoplado à proteína G estimulatória (Gs). Esta união ativa a adenilil ciclase (AC), produz aumento da concentração de 3', 5'-monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) e vasodilatação. O mecanismo de vasorelaxamento está geralmente associado à hiperpolarização das cMLV podendo envolver a abertura de canais para potássio sensíveis a ATP (K_{ATP}), ativados por cálcio de alta condutância (BK_{Ca}), retificadores de influxo (K_{IR}) e os ativados por voltagem (K_{V}) (FÉLÉTOU & VANHOUTTE, 2006; GRYGLEWSKI, 2008; FÉLÉTOU & VANHOUTTE, 2009).

1.2.3. Hiperpolarização dependente do endotélio – EDH

A EDH é um conjunto de diferentes vias vasorelaxantes derivadas do endotélio vascular, com grande importância nas artérias de resistência e arteríolas (WOOLFSON & POSTON, 1990; ADEAGBO & TRIGGLE, 1993; URAKAMI-HARASAWA *et al.*, 1997), a partir de diferentes fontes que compreendem os ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) derivados do AA pela via da enzima citocromo P450 (CYP) (CAMPBELL & HARDER, 2001; HUANG *et al.*, 2004), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que é formado a partir da dismutação do ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) cuja maior fonte nos vasos é proveniente da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (NOX) (MÜNDEL *et al.*, 1999; MATOBA *et al.*, 2000; LUCCHESI *et al.*, 2005), o peptídeo natriurético do tipo C (CHAUHAN *et al.*, 2003), o íon potássio (K^+) (EDWARDS *et al.*, 1998), o sulfeto de hidrogênio (H_2S) (ZHAO *et al.*, 2001) e as junções comunicantes mioendoteliais (junções GAP) (GRIFFITH & TAYLOR, 1999; SANDOW & HILL, 2000), potenciais agentes vasodilatadores em resposta ao estrogênio (GOLDING & KEPLER, 2001).

Sabe-se que o E pode modular a EDH estimulando sua síntese (ORSHAL & KHALIL, 2004) com consequente ativação de K_{Ca} (de condutância intermediária - IK_{Ca} e/ou de baixa condutância - SK_{Ca}), provocando hiperpolarização da membrana muscular lisa (ZYGMUNT *et al.*, 1997; CHATAIGNEAU *et al.*, 1998). Os potenciais

mecanismos que levam à hiperpolarização derivada do endotélio podem envolver (i) síntese de EDH, por meio da ativação de receptores das células endoteliais levando ao aumento da concentração do cálcio intracelular, e hiperpolarização endotelial por efluxo de K^+ através dos K_{Ca} ; (ii) hiperpolarização endotelial conduzida para as cMLV, através das junções GAP, que ativa os canais K_{Ca} e causa hiperpolarização dependente do endotélio; e (iii) hiperpolarização das cMLV por meio da redução na concentração intracelular de cálcio através do fechamento dos canais para Ca^{2+} tipo L operados por voltagem (Cav) ocasionado pela queda no potencial de membrana (NELSON & QUAYLE, 1995; LUKSHA *et al.*, 2004; SHIMOKAWA & MATOBA, 2004).

1.3. MECANISMOS DE AÇÃO DOS ESTRÓGENOS

O hormônio esteroide 17β -estradiol pode ter sua ação mediada pela regulação da transcrição de genes ou através da via de sinalização intracelular (extra-nuclear) (MEYER *et al.*, 2006; MEYER & BARTON, 2009; HAMILTON *et al.*, 2017). O impacto do estrogênio, mediado por vias de sinalização agudas genômicas e não genômica é dependente do subtipo de receptor de estrogênio (RE), proteína intracelular de alta afinidade ao hormônio (HALL *et al.*, 2001).

Os receptores estrogênicos que medeiam as ações clássicas, ou seja, a ligação do E aos receptores alfa ($RE\alpha$) e beta ($RE\beta$), possuem a estrutura modular de domínios funcionais característica da superfamília de receptores nucleares de esteroide, uma família de fatores de transcrição regulados por ligantes (HALL *et al.*, 2001; MATTHEWS & GUSTAFSSON, 2003). A primeira proteína de ligação ao estrogênio, $RE\alpha$ (RN3A1), foi identificada no tecido uterino de ratas na década de 60 (então denominado RE) (TALWAR *et al.*, 1964; SOLOFF & SZEGO, 1969). Até 1995, presumia-se que havia apenas um RE e que ele era responsável por mediar todos os efeitos fisiológicos, farmacológicos e antiestrogênicos naturais e sintéticos. No entanto, em 1996, um segundo RE foi identificado na próstata de ratos e designado como $RE\beta$ (RN3A2). $RE\beta$ difere do $RE\alpha$ em relação ao perfil de expressão (não presente na pituitária de adultos e endométrio) e domínio de ativação da transcrição (KUIPER *et al.*, 1996; DECHERING *et al.*, 2000).

Por outro lado, estudos epidemiológicos evidenciam que há controvérsias em torno do uso clínico de estrogênio exógeno como agente terapêutico para DCVs,

devido aos possíveis riscos de eventos trombóticos, cânceres e arritmias (YANG & RECKELHOFF, 2011). Terapias que envolvem compostos em esquema de reposição capazes de oferecer benefícios semelhantes ao estrogênio, sem os efeitos secundários indesejáveis da terapia de reposição hormonal clássica têm despertado interesse, dentre eles: fitoesteróides (DOS SANTOS *et al.*, 2016), tibolona (DE MEDEIROS *et al.*, 2012), moduladores seletivos de receptor de estrogênio, tais como o tamoxifeno e raloxifeno (BORGIO *et al.*, 2011; ROMERO *et al.*, 2012; LAMAS *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2015), principalmente por se tratar de um possível fator protetor contra o desenvolvimento de DCVs. Diante desse novo contexto, visar REs específicos no sistema cardiovascular pode resultar em novas e possivelmente mais seguras opções terapêuticas para cardioproteção (IORGA *et al.*, 2017).

1.3.1. Receptor de estrogênio acoplado a proteína G (GPER)

A sinalização celular rápida do estrogênio ocorre por meio de vias que envolvem uma subpopulação de REs localizados na membrana plasmática (REs transmembrana), responsáveis pela resposta aguda não genômica (PROSSNITZ & BARTON, 2011).

O terceiro RE foi identificado em meados da década de 1990, a partir de cDNA de células B linfoblásticas humanas, como um receptor acoplado à proteína G (GPCR) órfão (um receptor clonado sem nenhum ligante conhecido) (OWMAN *et al.*, 1996) e então nomeado primariamente como GPR30 (baseado no esquema de numeração sequencial para receptores órfãos) (CARMECI *et al.*, 1997; TAKADA *et al.*, 1997; PROSSNITZ & ARTERBURN, 2015). Posteriormente, na década de 2000, GPR30 passou a ser designado de GPER por possuir boa afinidade e induzir cascatas de sinalização intracelular rápida em resposta a ligação com E (ALEXANDER *et al.*, 2008).

O GPER pertence ao grupo de receptores transmembrana heptahelical acoplado à proteína G (THOMAS *et al.*, 2005), está localizado no cromossomo 7 locus 22, é composto por três éxons, apresenta um peso molecular de aproximadamente 38 KDa e possui 375 aminoácidos (MIZUKAMI, 2010). Embora a localização intracelular deste receptor tenha sido descrita na membrana plasmática (FUNAKOSHI *et al.*, 2006; FILARDO *et al.*, 2007), o GPER é encontrado de forma

predominante nas membranas do retículo endoplasmático e do aparelho de Golgi (REVANKAR *et al.*, 2005; SAKAMOTO *et al.*, 2007), possivelmente devido ao processo de endocitose após estimulação ser mais eficiente do que o mecanismo que transloca o receptor para a membrana plasmática (CHENG *et al.*, 2011).

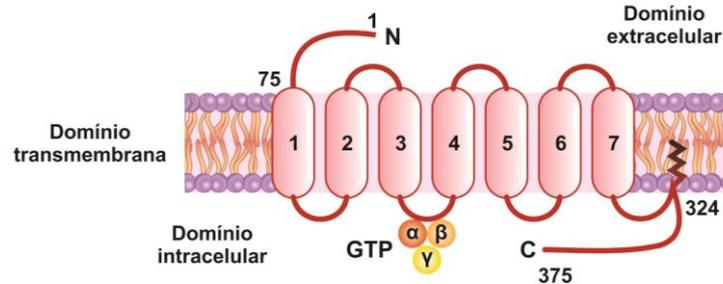


Figura 1: Estrutura do GPER. GPER, receptor de estrogênio acoplado a proteína G (acervo do laboratório).

O mRNA para GPER parece estar presente extensivamente na maioria dos sistemas fisiológicos, incluindo imune, reprodutivo, endócrino, musculoesquelético, nervoso central e renal (OLDE & LEEB-LUNDBERG, 2009; PROSSNITZ & BARTON, 2011) e mostra forte expressão especialmente no sistema cardiovascular, sugerindo papel fisiológico na regulação da função vascular e miocárdica (DESCHAMPS & MURPHY, 2009; FILICE *et al.*, 2009; HAAS *et al.*, 2009; JESSUP *et al.*, 2010; MEYER *et al.*, 2011; KANG *et al.*, 2012), o que aumenta a complexidade dos mecanismos envolvidos nas respostas fisiológicas ao E (PROSSNITZ & BARTON, 2014). No sistema vascular, em particular, a expressão do GPER se dá ao longo da parede do vaso de humanos e animais de ambos os sexos, o que aponta para uma ação dependente e independente do endotélio (YU *et al.*, 2011; AREFIN *et al.*, 2014). Adicionalmente, estudos têm demonstrado que a ativação do GPER pelo E ativa vias de sinalização como MEK-ERK (FILARDO *et al.*, 2000; FILARDO *et al.*, 2002) e PI3k-Akt (MEYER *et al.*, 2014).

Diversos grupos têm relacionado a ativação do GPER à efeitos cardiovasculares benéficos em modelos animais, como redução da pressão sanguínea (LINDSEY *et al.*, 2009), manutenção da glicemia (MARTENSSON *et al.*, 2009) e proteção contra aterosclerose (efeitos antiaterogênicos) (MEYER *et al.*, 2014). Por outro lado, estudos recentes têm indicado que a ausência do GPER

previne DCVs associadas com a síntese de $O_2^{\cdot-}$ pela NADPH oxidase (MEYER *et al.*, 2016; MEYER *et al.*, 2017).

Com a síntese do agonista seletivo (BOLOGA *et al.*, 2006) e subsequente identificação do antagonista seletivo (DENNIS *et al.*, 2011) estudos que abordam as funções celulares e fisiológicas do GPER cresceram. G-1 foi o primeiro agonista seletivo do GPER descrito (BOLOGA *et al.*, 2006) como ligante de alta afinidade em relação a esse receptor com pouca ou talvez nenhuma ligação a RE α ou RE β (REVANKAR *et al.*, 2005). Estudos recentes mostraram que o G-1 é uma ferramenta farmacológica altamente eficaz para investigar os efeitos vasculares do GPER (DESCHAMPS & MURPHY, 2009; FILICE *et al.*, 2009; HAAS *et al.*, 2009; JESSUP *et al.*, 2010; KANG *et al.*, 2012), e esses efeitos vasculares não estão associados ao risco de desenvolvimento de tumores (IGNATOV *et al.*, 2013; WEIßENBORN *et al.*, 2014; KANG *et al.*, 2015). Os efeitos desse agonista como vasodilatador foram determinados na aorta (LINDSEY *et al.*, 2009), artéria carótida (BROUGHTON *et al.*, 2010), artérias mesentéricas (LINDSEY *et al.*, 2011; LINDSEY *et al.*, 2013; LINDSEY *et al.*, 2014; PEIXOTO *et al.*, 2017), arteríolas intracerebrais (MURATA *et al.*, 2013), artérias uterinas (TROPEA *et al.*, 2015) e no leito vascular coronariano (DEBORTOLI *et al.*, 2017) de ratos, assim como, em artérias coronárias suínas (MEYER *et al.*, 2010) e nas artérias mamárias internas humanas (HAAS *et al.*, 2007). Contudo, também foi constatado o efeito vasoconstritor do G-1 no rim isolado e perfundido de ratos, sugerindo ações bivalentes deste fármaco (KURT & BUYUKAFSAR, 2013). Independente disso, a capacidade do GPER de induzir vasodilatação está bem estabelecida em modelos animais, bem como em artérias humanas (ZIMMERMAN *et al.*, 2016).



Figura 2: Estrutura molecular do (A) estrogênio e (B) G-1. G-1, 1-[4-(6-bromobenzo[1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]quinolin-8-yl]-ethanone (acervo do laboratório).

Finalmente, existem numerosas áreas em que falta o nosso conhecimento sobre o GPER e a sua função. Em particular, pouco se sabe sobre os mecanismos subjacentes aos efeitos vasculares modulados por esse receptor no contexto das artérias de resistência, especialmente na privação de hormônios sexuais gonadais. Diante desse contexto, é importante considerar que, muitos dos efeitos benéficos à preservação da saúde do estrogênio em todo o organismo são reproduzidos pelo agonista seletivo G-1, que, devido aos seus efeitos mínimos nos tecidos reprodutivos, pode ser considerado um composto estrogênico não feminizante e, portanto, de uso terapêutico potencial em mulheres e homens (PROSSNITZ, 2018). Baseado no exposto acima e no papel fundamental da artéria mesentérica na resistência vascular periférica e na homeostase do sistema vascular, a hipótese do presente estudo configura-se que o agonista seletivo do GPER é capaz de induzir relaxamento vascular agudo, por distintos mecanismos que diferem entre os sexos, em segmentos arteriais mesentéricos de resistência de ratos gonadectomizados.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Analisar possíveis diferenças sexuais na resposta de relaxamento aguda induzida pelo agonista seletivo do receptor de estrogênio acoplado a proteína G (GPER) em artérias mesentéricas de resistência de ratos gonadectomizados.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar, em artérias mesentéricas de resistência de ratos gonadectomizados:
 - i. A seletividade e especificidade da resposta de relaxamento aguda induzida pelo agonista seletivo do GPER;
 - ii. A participação do endotélio na resposta vasodilatadora aguda ao G-1;
 - iii. A contribuição dos principais mediadores endoteliais de relaxamento na vasodilatação aguda modulada pelo GPER;
 - iv. O envolvimento das isoformas da enzima óxido nítrico sintase (eNOS, iNOS e nNOS) na ação vasodilatadora aguda ao agonista seletivo G-1;
 - v. A participação das vias de sinalização rápida PI3k-Akt e MEK-ERK no relaxamento agudo induzido pelo G-1;

- Determinar o envolvimento das isoformas óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), das vias rápidas de sinalização proteína quinase B (Akt 1/2/3) e quinase regulada por sinais extracelulares (ERK 1/2) em artérias mesentéricas de resistência de ratos gonadectomizados;

- Verificar a produção *in situ* de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em artérias mesentéricas de resistência de ratos gonadectomizados;

- Avaliar a imunolocalização específica do GPER e da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em artérias mesentéricas de resistência de ratos gonadectomizados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) adultos (12 semanas de idade) de ambos os sexos fornecidos pelo biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram mantidos em ambiente com iluminação (ciclo claro-escuro de 12 horas), temperatura (22 °C) e umidade (40 - 60 %) controladas e livre acesso à água e ração (ração padrão para biotérios, Purina Labina, SP – Brasil). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes de pesquisa biomédica para cuidado e uso de animais de laboratório, como indicado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA (CONCEA-MCT, 2016) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (067/2017).

3.2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o seguinte organograma:

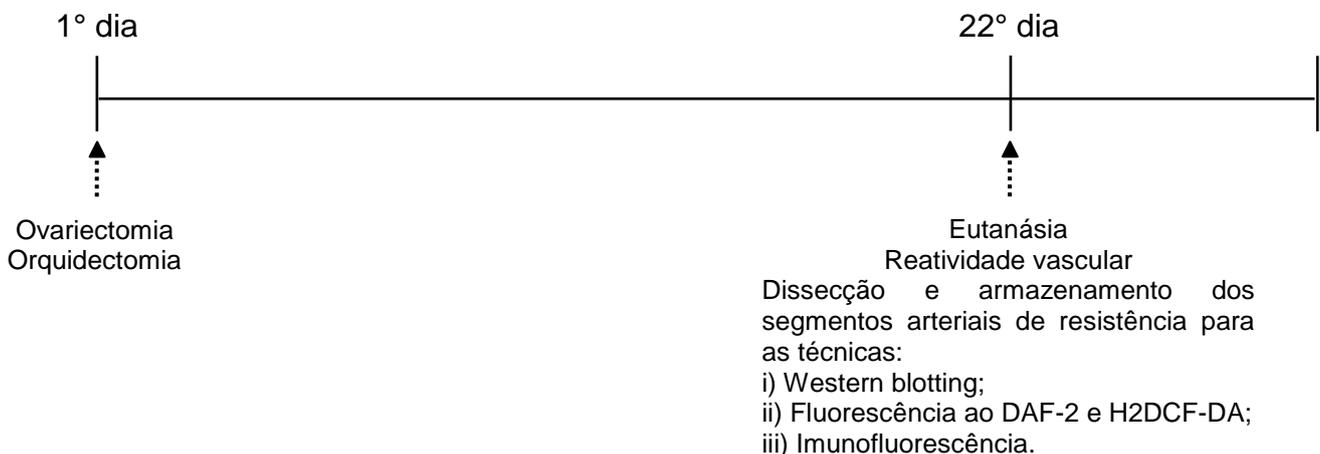


Figura 3: Organograma dos procedimentos experimentais.

3.2.1. Ovariectomia

A ovariectomia foi realizada bilateralmente sob anestesia intraperitoneal (i.p.) com mistura de cetamina (70 mg.kg⁻¹) e xilazina (10 mg.kg⁻¹). A cirurgia consistiu de uma incisão de 1 a 1,5 cm na pele, entre a última costela e a coxa, a 1 cm da linha

mediana, seguida de uma outra incisão perpendicular na camada muscular, abrindo a cavidade peritoneal para posterior remoção dos ovários e ligadura da tuba uterina. Após a retirada dos ovários, foi realizada sutura da musculatura e pele. O mesmo processo foi realizado no lado oposto. Ao final dos procedimentos cirúrgicos, os animais receberam analgésico (Flunixin meglumine, uma dose de $2,5 \text{ mg.kg}^{-1}$), antibiótico (Enrofloxacin, dose única de 10 mg.kg^{-1}) e permaneceram em gaiolas individuais em observação por um período de 72 horas. Em seguida, colocados em gaiolas coletivas. Os protocolos experimentais foram realizados 21 dias após a ovariectomia.

3.2.2. Orquidectomia

A orquidectomia foi realizada sob anestesia intraperitoneal (i.p.) com mistura de cetamina (70 mg.kg^{-1}) e xilazina (10 mg.kg^{-1}). A cirurgia consistiu de uma incisão perpendicular de 0,5 a 1 cm na região da linha mediana da bolsa escrotal, rompendo a cavidade escrotal, em seguida foi realizada outra incisão na camada muscular até atingir a túnica *vaginallis*. Os testículos foram expostos por compressão e uma ligadura feita em torno do cordão espermático para posterior remoção das gônadas. Após a retirada dos testículos, foi realizada sutura na bolsa testicular. Ao final dos procedimentos cirúrgicos, os animais receberam analgésico (Flunixin meglumine, uma dose de $2,5 \text{ mg.kg}^{-1}$), antibiótico (Enrofloxacin, dose única de 10 mg.kg^{-1}) e permaneceram em gaiolas individuais em observação por um período de 72 horas. Em seguida, colocados em gaiolas coletivas. Os protocolos experimentais foram realizados 21 dias após a orquidectomia.

3.2.3. Reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência

Os animais foram eutanasiados por decapitação, sem utilização de anestésicos, para evitar efeito depressor sobre a fase contrátil (HATANO *et al.*, 1989) e tiveram as artérias mesentéricas de terceira ordem identificadas, isoladas e dissecadas dos tecidos circundantes não vasculares. Os segmentos arteriais foram seccionados em anéis de 2 mm e montados entre dois fios de tungstênio (40 μm de diâmetro) dentro de câmaras do miógrafo de arame (Modelo 620M; Danish Myo Tecnologia, Aarhus, Dinamarca) preenchidas com solução de Krebs-Henseleit [composição em mM: NaCl (119), KCl (4.7), KH_2PO_4 (0.4), NaHCO_3 (14.9),

MgSO₄.7H₂O (1.17), CaCl₂.2H₂O (2.5) e glicose (5.5)], a 37 °C e gaseificada com mistura carbogênica (5 % CO₂ e 95 % O₂), como descrito por MULVANY & HALPERN (1977).

Após a montagem dos anéis nas câmaras do miógrafo de arame, a circunferência interna foi normalizada para 0,9·IC100, onde os anéis foram gradualmente estirados até que o diâmetro interno correspondesse a uma pressão transmural de 100 mmHg. Os anéis foram mantidos por um período de estabilização de 60 minutos. Após o período de estabilização, a viabilidade e integridade do endotélio foram testadas em resposta a administração de acetilcolina (ACh, 10 µM), nos anéis previamente contraídos com fenilefrina (PE, 3 µM). Os anéis foram considerados sem endotélio quando o relaxamento obtido foi ≤ 10 % em resposta a ACh após a remoção mecânica.

Posteriormente ao procedimento de padronização e nova estabilização de 30 minutos, em uma série de experimentos, as curvas concentração-resposta foram obtidas por adições cumulativas de G-1 (1 nM – 10 µM; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI – EUA) ou veículo (dimetilsulfóxido – DMSO) após prévia contração com 3 µM PE. O efeito vasodilatador do agonista foi estudado na ausência ou na presença de endotélio e dos inibidores farmacológicos N^ω-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, inibidor não seletivo da enzima NOS, 300 µM; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO – EUA), 1400W (inibidor seletivo da enzima iNOS, 10 µM; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO – EUA), N^ω-propil-L-arginina (L-NPA, inibidor seletivo da enzima nNOS, 2 µM; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA – EUA), LY-294,002 (inibidor da via de sinalização rápida PI3k-Akt, 2.5 µM; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO – EUA), INDOMETACINA (INDO, inibidor não seletivo da enzima COX, 10 µM; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO – EUA), CLOTRIMAZOL (CLOT, inibidor inespecífico da enzima CYP, 0.75 µM; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO – EUA), CATALASE (CAT, varredor enzimático de H₂O₂, 1000 u/mL; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO – EUA), G36 (antagonista seletivo do GPER, 1 µM; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI – EUA) ou ICI 182,780 (antagonista simultâneo do REα e REβ, 1 µM; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO – EUA) incubados 30 minutos antes da curva concentração-resposta de G-1. A aquisição dos dados foi realizada usando o sistema de aquisição LabChart 8 (AD Instruments Pty Ltd, New South Wales, Austrália).

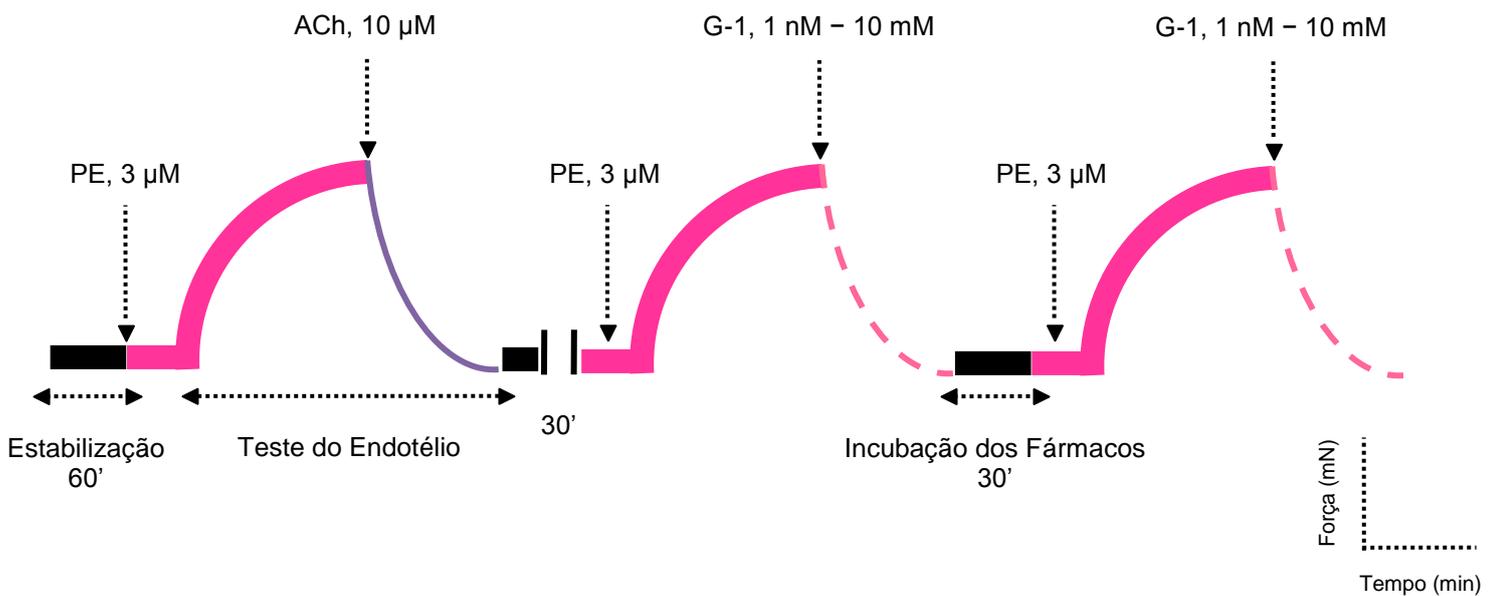


Figura 4: Esquema representativo do protocolo das curvas concentração-resposta ao G-1 (1 nM – 10 mM) antes e após a incubação por 30 minutos com os fármacos estudados.

3.2.4. Expressão proteica tecidual da eNOS, nNOS, Akt 1/2/3 e ERK 1/2 pela técnica de western blotting

O leito mesentérico foi isolado e as artérias de resistência (a partir dos terceiros ramos da artéria mesentérica superior) foram dissecadas e livres do tecido conectivo e adiposo. Os segmentos arteriais foram incubados, por 30 minutos, com solução de Krebs-Henseleit [composição em mM: NaCl (119), KCl (4.7), KH₂PO₄ (0.4), NaHCO₃ (14.9), MgSO₄.7H₂O (1.17), CaCl₂.2H₂O (2.5) e glicose (5.5)], a 37 °C e gaseificada com mistura carbogênica (5 % CO₂ e 95 % O₂), na ausência (basal – DMSO) ou presença de G-1 [1 nM – 10 µM], para investigar se a incubação com o agonista seletivo do GPER induziria alteração na expressão tecidual das proteínas de interesse. Após o período de incubação, as artérias foram banhadas em solução de Krebs-Henseleit gelada, armazenadas em microtubos, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C.

Posteriormente os tecidos foram homogeneizados em tampão para lise celular (RIPA, 1:10; Milipore, EUA) contendo inibidores de proteases e fosfatases [PMSF (1 mM); Na₃VO₄ (10 mM); FNa (100 mM); Na₄P₂O₇ (10 mM); coquetel inibidor de protease (PIC, 2µL/mL; Sigma-Aldrich, EUA)]. Em seguida, este homogeneizado

foi centrifugado (4000 rpm ou 1500G, 4 °C, 15 minutos) e o sobrenadante foi utilizado para determinação do conteúdo proteico utilizando o método de *Bicinchoninic Acid* (BCA protein assay kit, Thermo Scientific, EUA).

Quantidades iguais de proteínas (50 µg) provenientes dos sobrenadantes das artérias de resistência de cada animal foram diluídas em solução de Laemmli (Bio-rad, EUA) contendo Ditioneitol (DTT, 350 mM). Em seguida, as alíquotas foram fervidas a 100 °C por 5 minutos para desnaturação das proteínas. Após, as amostras e o peso molecular (Precision Plus Protein, Kaleidoscope, Bio-Rad, EUA) foram submetidos à separação eletroforética em gel de poliacrilamida 7,5 % com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em aparelho para minigel (Mini Protean III, Bio-Rad, EUA). Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana Hybond-P PVDF (Amersham-GE Healthcare, Reino Unido). A qualidade da transferência foi confirmada pela coloração do gel, durante 1 hora, com azul de coomassie e pela coloração das membranas, durante 20 minutos, com Ponceau 0,5 %. As membranas foram então incubadas com solução bloqueadora contendo 5 % de albumina diluída em tampão Tris (Tris-HCl 10 mM; NaCl 100 mM; Tween-20 0,1 %; pH 7,4), por 90 minutos, a temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas, durante toda a noite a 4 °C, com o anticorpo primário específico (tabela 1) diluído em albumina 3 %. Após a marcação com anticorpo primário, as membranas foram lavadas quatro vezes (4X) por 10 minutos com tampão Tris, sob agitação. Posteriormente, estas foram incubadas, por 90 minutos, com anticorpos secundários conjugados à peroxidase, diluídos em albumina 3 %, específicos para o anticorpo primário utilizado (tabela 2). Na sequência, o excesso dos anticorpos secundários da membrana foi lavado 4X por 10 minutos com tampão Tris. Ao final, as membranas foram incubadas com o reagente quimioluminescente (Pierce ECL plus Western Blotting Substrate, Thermo Fischer Scientific, EUA) e os imunocomplexos foram detectados utilizando o sistema automático de imagem molecular (Amersham Imager série 600, GE Healthcare Amersham, EUA). A intensidade das bandas da proteína-alvo foi quantificada usando o software Image J 1.4g (Wayne Rasband National Institutes of Health, EUA). A quantificação da expressão proteica da α -actina foi utilizada como controle interno de carregamento para normalização da expressão das demais proteínas avaliadas.

Tabela 1: Anticorpos primários utilizados para western blot

Anticorpo	Fabricante	Nº Catálogo	Peso molecular	Diluição do primário	Anticorpo secundário	Diluição do secundário
eNOS	BD Biosciences	610297	140 kDa	1:1000	M	1:5000
Phospho-eNOS (Ser1177)	Cell Signaling Technology	9571	140 kDa	1:1000	Rb	1:3000
Akt 1/2/3	Santa Cruz Biotechnology	sc-8312	56-62 kDa	1:1000	Rb	1:5000
p-Akt 1/2/3 (Ser 473)	Santa Cruz Biotechnology	sc-8312	56-62 kDa	1:400	Rb	1:1000
ERK 1/2	Cell Signaling Technology	9102	42-44 kDa	1:1000	Rb	1:10000
p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling Technology	9101	42-44 kDa	1:1000	Rb	1:8000
nNOS	BD Biosciences	610309	155 kDa	1:1000	M	1:7000
α -actina	Sigma Aldrich	A 2547	40 kDa	1:10000	M	1:12000

Tabela 2: Anticorpos secundários utilizados para western blot

Anticorpo	Fabricante	Nº Catálogo
Anti-rabbit IgG-HRP	Jackson Immuno Research	111-035-044
Anti-mouse IgG-HRP	Jackson Immuno Research	111-035-146

3.2.5. Determinação da produção *in situ* de óxido nítrico (NO) pela técnica de fluorescência ao diacetato de 4-amino-5-metilamino-2', 7'-difluorofluoresceína (DAF-FM)

Os segmentos das artérias mesentéricas de resistência (terceiros ramos da artéria mesentérica superior) de cada um dos grupos foram incorporados em meio de congelamento Tissue-Tek® O.C.T.™ (Sakura®, EUA) e posteriormente secções arteriais transversais (10 μ m) foram obtidas utilizando criostato (Leica 1850, Leica, EUA).

A análise da produção de NO foi determinada *in situ* utilizando o diacetato de 4-amino-5-metilamino-2', 7'-difluorofluoresceína (DAF-FM) (Invitrogen, #D23844) em cortes de artéria mesentérica de resistência por meio da microscopia de fluorescência. DAF-FM é uma sonda de permeabilidade à membrana não fluorescente até que reaja com NO para formar benzotriazol, um derivado fluorescente (LI *et al.*, 2021).

O protocolo foi realizado de acordo com COSTA *et al.* (2018), com algumas modificações. Brevemente, as lâminas foram incubadas por 15 minutos com PBS 1x com Ca^{2+} [0,45 μM], a 37 °C, em câmara úmida e protegidas da luz. Após isso, foi retirado o excesso de PBS 1x e para análise da produção do NO as lâminas dos animais OVX e ORX foram divididas em três grupos: **(1) Basal**: As lâminas foram incubadas com a sonda DAF-FM [8 μM] por 30 minutos; **(2) G-1**: As lâminas foram estimuladas com G-1 [10 μM] por 10 minutos, seguidos da incubação com DAF-FM por 30 minutos; **(3) G-1 + L-NAME**: as lâminas foram pré-incubadas com L-NAME [300 μM] por 10 minutos, seguidos da estimulação com G-1 por 10 minutos e DAF-2 por 30 minutos. Durante todo o protocolo experimental, as lâminas foram mantidas a 37 °C, em caixa úmida e protegidas da luz. As lâminas de controle negativo receberam a mesma quantidade de tampão e G-1, mas, sem a sonda fluorescente, objetivando observar se este produto produzia alguma fluorescência.

Imagens digitais foram obtidas na objetiva de 63x, usando o microscópio de fluorescência ApoTome.2 Zeiss com filtro de comprimento de onda 545 nm e analisadas no programa *Image pro plus 4.5.0.29*, usando a função de análise de densidade óptica de fluorescência da área de interesse (ROI manager). Quarenta áreas de interesse foram selecionadas em cada corte analisado, sendo que dois cortes de cada lâmina foram utilizados. Um número amostral de cinco animais por grupo experimental foi utilizado.

3.2.6. Determinação da produção *in situ* de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela técnica de fluorescência ao 2',7' diclorodihidrofluoresceína-diacetato (H2DCF-DA)

Os segmentos das artérias mesentéricas (terceiros ramos da artéria mesentérica superior) dos grupos experimentais foram embebidos em meio de congelamento Tissue-Tek® O.C.T.™ (Sakura®, EUA) e posteriormente secções arteriais transversais (10 μm) foram obtidas utilizando criostato (Leica 1850, Leica, EUA).

A quantificação da produção de H_2O_2 foi realizada de maneira indireta, por meio da utilização da sonda 2',7' diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCF-DA; Invitrogen (Carlsbad, CA – EUA). O DCF é uma sonda permeável à membrana

celular e não fluorescente. Entretanto, na presença de espécies reativas, especialmente o H_2O_2 , este composto é oxidado no interior da célula e produz um composto fluorescente, 2', 7'- diclorofluoresceína (DCF-DA) que permanece intracelular.

O protocolo foi realizado de acordo com COSTA *et al.* (2018), com algumas modificações. Resumidamente, as lâminas foram divididas também em três grupos, sendo eles: **(1) Basal**: As lâminas foram incubadas com a sonda DCF-DA [10 μ M] por 30 minutos; **(2) G-1**: As lâminas foram estimuladas com G-1 [10 μ M] por 10 minutos, seguidos da incubação com DCF-DA por 30 minutos; **(3) G-1 + Catalase**: As lâminas foram pré-incubadas com catalase [1000 unt/ml] por 10 minutos, seguidos da estimulação com G-1 por 10 minutos e DCF-DA por 30 minutos. Durante todo o protocolo experimental, as lâminas foram mantidas a 37 °C, em caixa úmida e protegidas da luz. As lâminas de controle negativo receberam a mesma quantidade de tampão e G-1, mas, sem a sonda fluorescente, objetivando observar se este produto produzia alguma fluorescência.

Imagens digitais foram obtidas usando o microscópio ApoTome.2 Zeiss, equipado com fluoresceína e filtro de comprimento de onda 545 nm, na objetiva de 63x. As imagens foram analisadas no programa *Image pro plus 4.5.0.29*, usando a função de análise de densidade óptica de fluorescência da área de interesse (ROI manager). Foram utilizados dois cortes de cada lâmina e 40 áreas de interesse foram selecionadas de cada corte. Um número amostral de cinco animais por grupo experimental foi utilizado.

3.2.7. Imunolocalização do GPER pela técnica de imunofluorescência

A detecção por imunofluorescência do GPER foi realizada em cortes de artérias mesentéricas, de acordo com AIRES *et al.* (2013) com algumas modificações. Para tal, as artérias foram cuidadosamente removidas, lavadas em PBS 1x para remoção do excesso de sangue e embebidas em meio para congelamento de tecidos Tissue-Tek® O.C.T.™ (Sakura®, EUA). Posteriormente foram cortadas a 10 μ m de espessura em um criostato (Leica, CM1850). As lâminas com os cortes foram armazenadas em freezer -80 °C.

No dia da realização da imunofluorescência, as lâminas foram retiradas do freezer e os cortes foram fixados com PFA 4 % por 15 minutos seguido de lavagem com solução BSA 1 %. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com BSA 3 % diluído em PBS 1x com 0,3 % de Triton-X por 30 minutos. Após o bloqueio e a devida lavagem, os cortes foram incubados *overnight* (16 horas) com anticorpos primários para rabbit policlonal anti-GPER (1:200, abcam) e sheep policlonal anti-VWF (1:400, abcam) em câmara fria e úmida (4 °C). Após lavagens, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário Goat anti-rabbit (1:300 - Alexa Fluor 555, Thermo Fisher) e Donkey anti-sheep (1:300, Alexa Fluor 488, Abcam) por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas receberam corante fluorescente seletivo de núcleos DAPI (dicloridrato de 4', 6-diamidino-2-fenilindol) 1: 250 por 5 minutos e foram cobertos com lamínula. Uma vez montadas, as lâminas foram analisadas em um microscópio de fluorescência ApoTome.2 Zeiss na objetiva de 63x.

As imagens adquiridas no microscópio de fluorescência foram processadas e analisadas pelo software *Image pro plus 4.5.0.29*, usando a função de análise de densidade óptica de fluorescência da área de interesse (ROI manager). Foram analisados dois cortes por lâmina, onde foi mensurada a intensidade de fluorescência vascular total, na camada média, adventícia e/ou endotelial. A intensidade de fluorescência dos vasos foi expressa em intensidade relativa de fluorescência (unidades arbitrárias) e a intensidade normalizada pela área delimitada.

3.2.8. Ensaio de Imunofluorescência para marcação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS)

O ensaio de imunofluorescência foi realizado em cortes de artérias mesentéricas, de acordo com AIREZ *et al.* (2013) com algumas modificações. Para tal, as artérias mesentéricas foram cuidadosamente removidas, lavadas em PBS 1x para remoção do excesso de sangue e então, embebidas em meio para congelamento Tissue-Tek® O.C.T.™ (Sakura®, EUA) e posteriormente realizado cortes de 10 µm utilizando criostato (Leica, CM1850). As lâminas com os cortes foram armazenadas em freezer -80 °C.

Para a realização da imunofluorescência, as lâminas foram inicialmente fixadas com PFA 4 %, durante 15 minutos e em seguida lavadas com solução BSA 1 %. Para o bloqueio de ligações inespecíficas, as lâminas foram incubadas com solução de BSA 3 % diluído em PBS 1x com 0,3 % de Triton-X durante 30 minutos. Após o bloqueio e lavagem, os cortes foram incubados com anticorpos primários para rabbit policlonal anti-iNOS (1:200, Santa Cruz Biotechnology) e sheep policlonal anti-VWF (1:400, abcam), em câmara úmida à 4 °C, durante 16 horas (overnight). Após lavagem no dia seguinte, o anticorpo secundário Goat anti-rabbit (1:300 - Alexa Fluor 555, Thermo Fisher) e Donkey anti-sheep (1:300, Alexa Fluor 488, Abcam) foi adicionado por 1 hora em temperatura ambiente. Passado este tempo, as lâminas foram incubadas com corante fluorescente seletivo de núcleos DAPI (dicloridrato de 4', 6-diamidino-2-fenilindol) 1: 250 por 5 minutos. Finalmente, as lâminas foram montadas o meio de montagem Fluoromount-G™ (Invitrogen).

As imagens foram capturadas usando o microscópio ApoTome.2 Zeiss na objetiva de 63x. As imagens foram analisadas no programa *Image pro plus 4.5.0.29*, usando a função de análise de densidade óptica de fluorescência da área de interesse (ROI manager). Foram utilizados dois cortes de cada lâmina, onde foi mensurada a intensidade de fluorescência vascular total. A intensidade de fluorescência dos vasos foi expressa em intensidade relativa de fluorescência (unidades arbitrárias) e a intensidade normalizada pela área delimitada.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) do número de animais usados em cada experimento (n). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para análise dos dados e aplicação dos testes estatísticos foi utilizado o programa GraphPad Prism Software 6.0 (San Diego, Califórnia, EUA). As curvas concentração-resposta foram calculadas por análise de variância (ANOVA), duas vias, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni e expressa em percentagem de relaxamento ao agonista. Para análise estatística da expressão proteica foi realizada ANOVA, duas vias, completamente randomizada. Quando a ANOVA apresentou significância estatística, o teste *post-hoc* de Bonferroni foi aplicado. Nos ensaios por microscopia de fluorescência a homogeneidade da variância foi verificada pelo Bartlett teste. Para as comparações entre os grupos, no

caso dos dados paramétricos, foi utilizada ANOVA uma via seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls ou Teste-t. Já para os dados não-paramétricos, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. RESPOSTA VASODILATADORA AO AGONISTA SELETIVO DO GPER EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RESISTÊNCIA

A resposta vasodilatadora ao agonista seletivo do receptor de estrogênio acoplado a proteína G (GPER) foi avaliada mediante a realização de curva concentração-resposta nas artérias mesentéricas de resistência dos grupos experimentais. O agonista seletivo G-1 (1 nM – 10 μ M) induziu relaxamento concentração dependente em ambos os grupos estudados, sem apresentar diferença entre os sexos (OVX: 93.6 ± 0.8 % vs ORX: 90.0 ± 1.3 %) (Figura 5A).

A seletividade e especificidade da ação vasodilatadora do G-1 foram testadas em segmentos arteriais pré-incubados com os antagonistas G36 (antagonista seletivo do GPER, 1 μ M) ou ICI 182,780 (antagonista simultâneo do RE α e RE β , 1 μ M). A resposta relaxante foi menor na presença do G36 nos segmentos de mesentérica de ambos os grupos (OVX: 42.3 ± 3.6 % vs ORX: 22.6 ± 5.0 %), enquanto que na presença de ICI 182,780 a resposta vasodilatadora do agonista G-1 não foi alterada (OVX: 91.2 ± 3.3 % vs ORX: 92.0 ± 2.7 %). As curvas concentração-resposta ao DMSO demonstraram apenas sucinto relaxamento (OVX: 17.9 ± 4.6 % vs ORX: 33.0 ± 1.5 %) (Figura 5B).

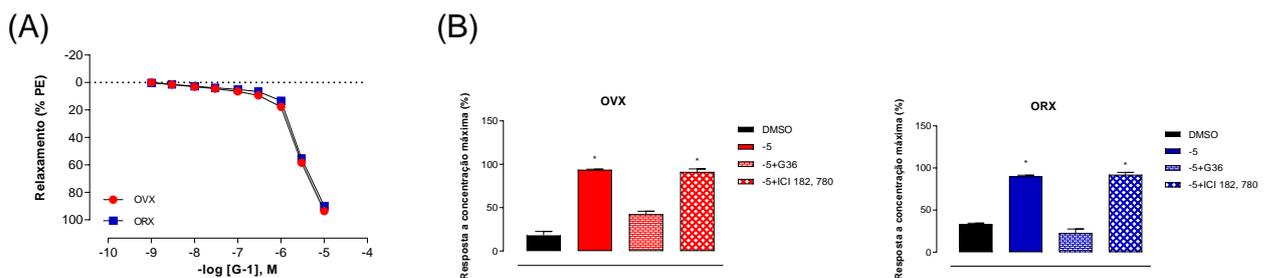
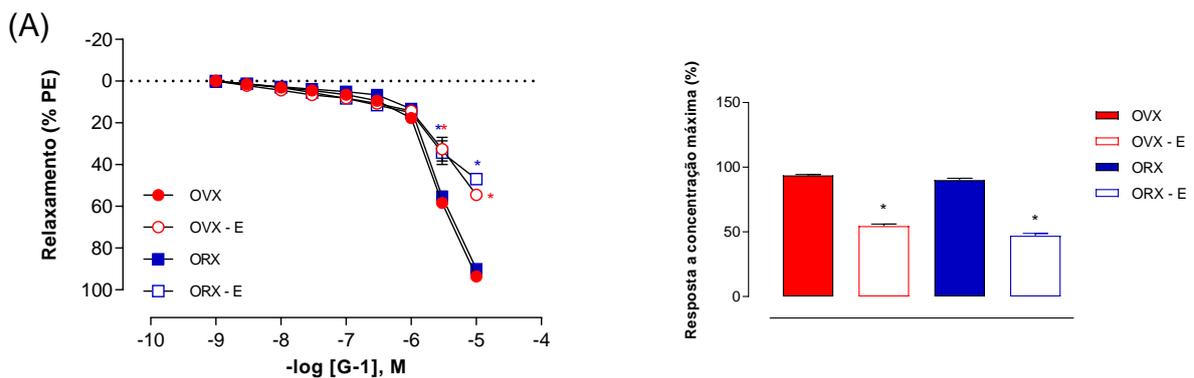


Figura 5: (A) Curva concentração-resposta dos anéis vasculares de ratos gonadectomizados (OVX: n = 47; ORX: n = 42) ao agonista seletivo do GPER (G-1, 1 nM – 10 μ M). (B) Resposta à concentração máxima dos anéis vasculares ao agonista seletivo do GPER (G-1, 1 nM – 10 μ M) e ao solvente dimetilsulfóxido (DMSO, OVX: n = 5; ORX: n = 5). Efeito do antagonista seletivo de GPER (G36 - 1 μ M, OVX: n = 7; ORX: n = 7) e do antagonista simultâneo do RE α e RE β (ICI 182,780 - 1 μ M, OVX: n = 7; ORX: n = 7) em fêmeas e machos gonadectomizados. Os valores foram expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs DMSO. ANOVA duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni.

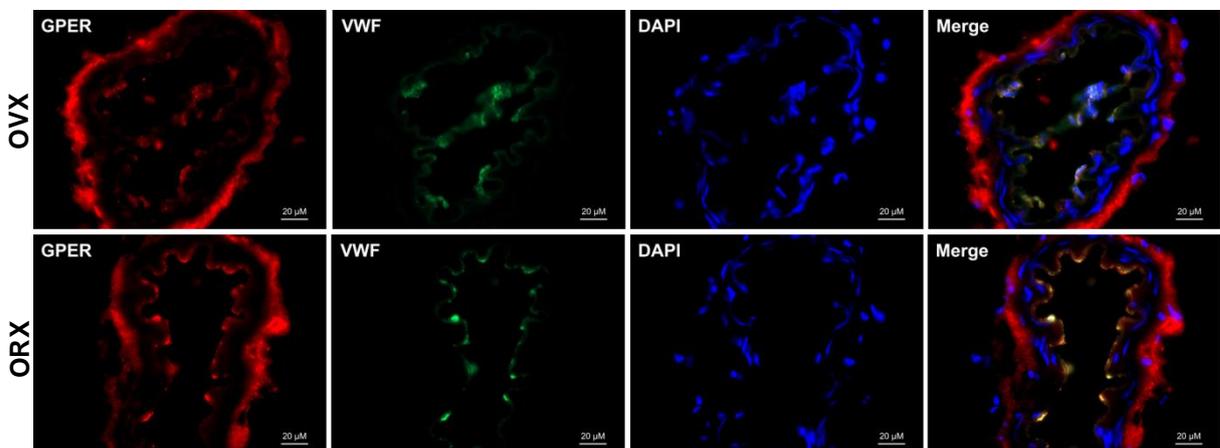
4.1.1. Avaliação da resposta vasodilatadora dependente do endotélio

Com a finalidade de investigar a participação do endotélio na resposta vasodilatadora ao G-1, curvas concentração-resposta foram construídas em segmentos arteriais após remoção mecânica da camada íntima vascular. A ausência do endotélio promoveu prejuízo na resposta vasodilatadora ao G-1 nos segmentos de mesentérica de ambos os sexos (OVX: 54.4 ± 1.6 % vs ORX: 46.9 ± 1.9 %), no entanto essa resposta não foi abolida, sugerindo modulação direta do GPER sobre o músculo liso vascular (MLV) (Figura 6A).

Do mesmo modo, mediante o desenvolvimento da técnica de imunofluorescência do GPER, as artérias mesentéricas de ratos gonadectomizados não apresentaram diferença na imunolocalização do receptor independente da camada vascular, corroborando com os dados obtidos com a remoção endotelial (Figura 6B).



(B)



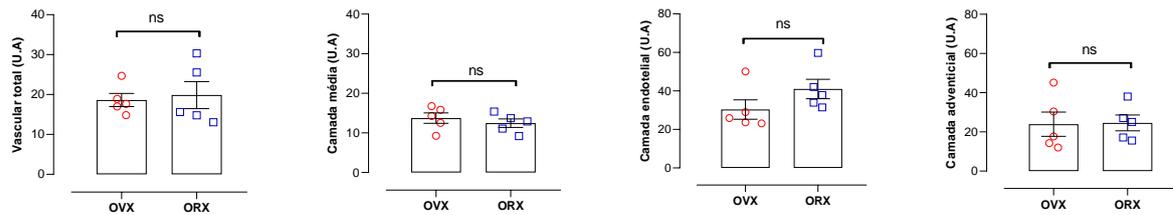


Figura 6: (A) Curva concentração-resposta ao agonista seletivo do GPER (G-1, 1 nM – 10 μ M) em artérias mesentéricas de resistência (OVX: n = 47; ORX: n = 42). Efeito do agonista na ausência do endotélio (OVX: n = 7; ORX: n = 7). O gráfico de barras mostra a resposta de relaxamento à concentração máxima. (B) Imunodeteção do GPER em seções arteriais microscópicas (OVX: n = 5; ORX: n = 5), com a quantificação da fluorescência resultante nas diferentes camadas vasculares. Barra de escala = 20 μ m. Os valores foram expressos como a média \pm EPM. * p < 0,05 comparado com a curva obtida antes da remoção do endotélio. ANOVA duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni ou teste de Mann-Whitney.

4.1.2. Avaliação da participação dos mediadores endoteliais de relaxamento

Para avaliar a participação dos mediadores endoteliais sobre a resposta vasodilatadora ao agonista seletivo G-1 em segmentos de artéria mesentérica, foi realizada uma sequência de experimentos de reatividade vascular após incubações farmacológicas.

4.1.2.1. Avaliação da participação do óxido nítrico (NO)

Inicialmente, as artérias mesentéricas foram incubadas com um inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS): L-NAME [300 μ M]. A resposta de relaxamento foi menor na presença de L-NAME nos segmentos de mesentérica de ambos os sexos (OVX: 68.5 \pm 6.6 % vs ORX: 65.3 \pm 4.0 %) quando comparado a curva do agonista sem a presença do inibidor (Figura 7A).

Para confirmar esta questão, a disponibilidade local de NO foi determinada nas artérias mesentéricas dos grupos experimentais. As seções arteriais dos animais gonadectomizados apresentaram similar produção local de NO, corroborando com os dados obtidos com a inibição farmacológica (Figura 7B).

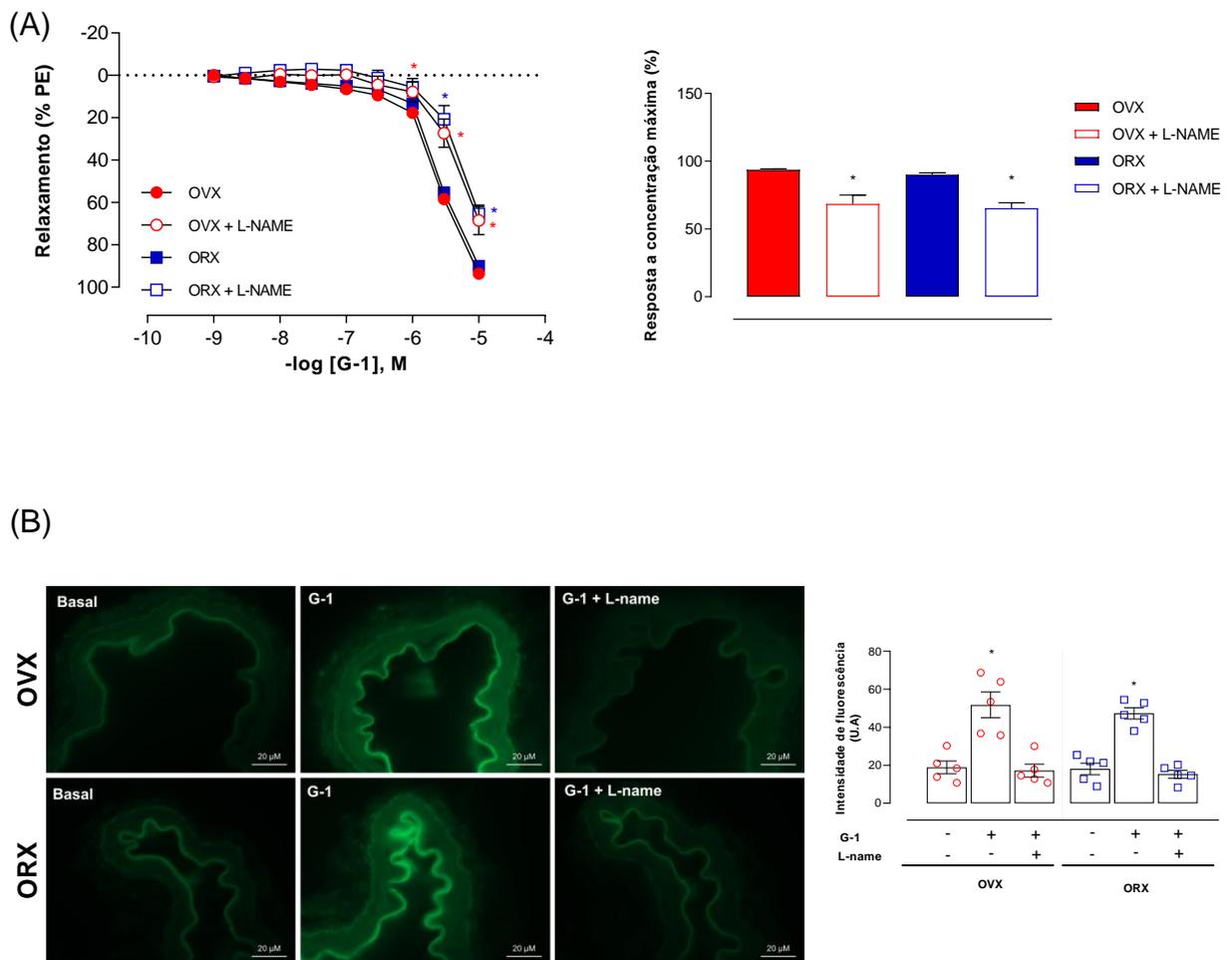


Figura 7: (A) Curva concentração-resposta ao agonista seletivo do GPER (G-1, 1 nM – 10 μ M) em artérias mesentéricas de resistência (OVX: n = 47; ORX: n = 42). Efeito da inibição não seletiva da enzima óxido nítrico sintase (NOS) com N^w-nitro-L-arginina metil éster [L-NAME - 300 μ M, (OVX: n = 7; ORX: n = 7)]. O gráfico de barras mostra a resposta de relaxamento à concentração máxima. (B) Análise representativa de microscopia de fluorescência marcada com diacetato de 4-amino-5-metilamino-2', 7'-difluorofluoresceína (DAF-FM) em seções arteriais microscópicas (OVX: n = 5; ORX: n = 5) na ausência ou presença de G-1 [10 μ M], com quantificação da fluorescência resultante. Barra de escala = 20 μ M. Os valores foram expressos como a média \pm EPM. * p < 0,05 comparado com a curva obtida antes da inibição; * p < 0,05 vs basal. ANOVA uma ou duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni ou Newman-Keuls.

Em sequência, foi estudado o envolvimento do óxido nítrico (NO) derivado da óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Para isso, os segmentos arteriais foram incubados com 1400W (10 μ M – inibidor seletivo da iNOS). 1400W alterou a responsividade vasodilatadora ao G-1, em ambos os sexos, reduzindo a resposta

vasodilatadora à concentração máxima apenas nas artérias mesentéricas dos animais machos (OVX: $96.5 \pm 1.2\%$ vs ORX: $63.6 \pm 5.4\%^*$) (Figura 8A).

Para confirmar os resultados funcionais obtidos, foi utilizada a técnica de imunofluorescência para verificar a influência da iNOS sobre a produção de NO vascular. Corroborando com os resultados funcionais encontrados, a marcação da iNOS foi significativamente maior nas seções arteriais dos animais orquidectomizados quando comparado aos animais ovariectomizados (Figura 8B).

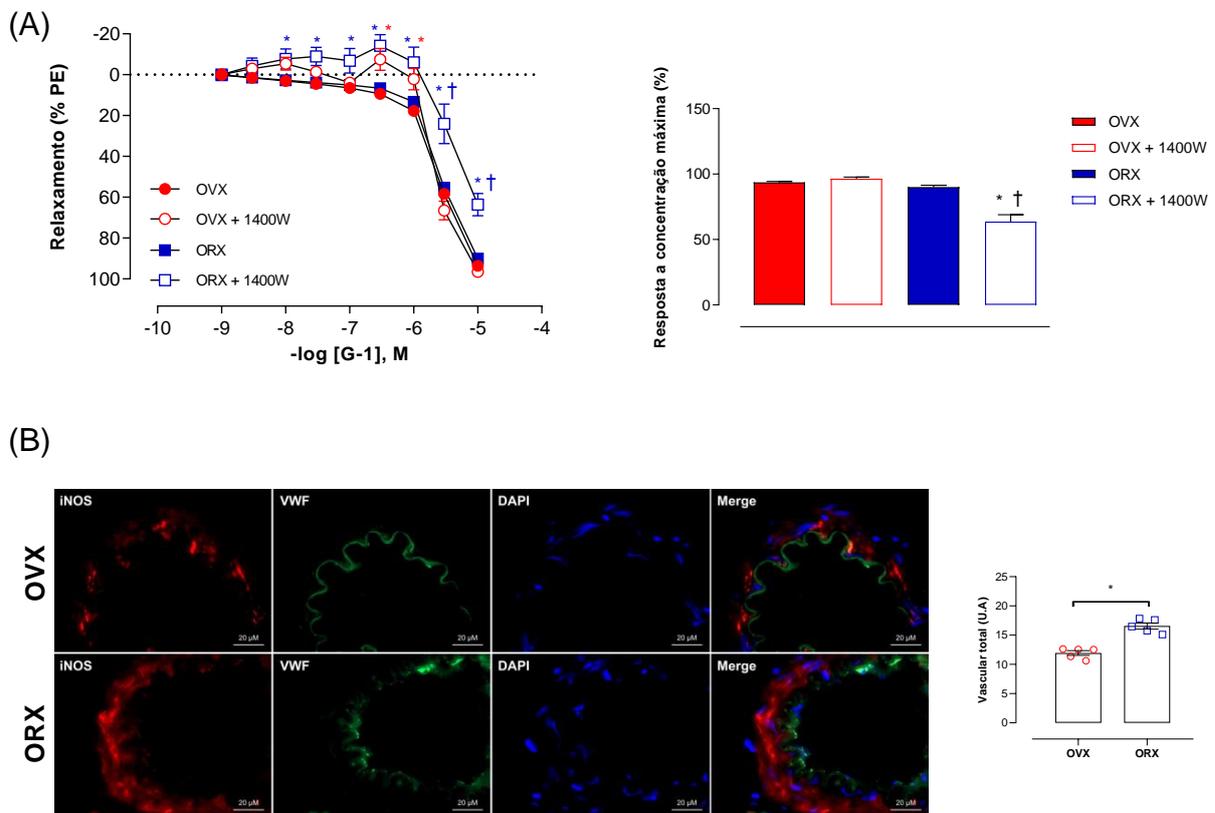


Figura 8: (A) Curva concentração-resposta ao agonista seletivo do GPER (G-1, 1 nM – 10 μ M) em artérias mesentéricas de resistência (OVX: n = 47; ORX: n = 42). Efeito da inibição seletiva da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) com 1400W [10 μ M, (OVX: n = 7; ORX: n = 7)]. O gráfico de barras mostra a resposta de relaxamento à concentração máxima. (B) Imunodeteção da iNOS em seções arteriais microscópicas (OVX: n = 5; ORX: n = 5), com a quantificação da fluorescência resultante na área vascular total. Barra de escala = 20 μ m. Os valores foram expressos como média \pm EPM. * p < 0,05 comparado com a curva obtida antes da inibição; † p < 0,05 vs OVX + 1400W; * p < 0,05 vs basal. ANOVA duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni ou Teste-t.

Por fim, foi investigada a participação da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) por meio da pré-incubação dos segmentos arteriais com L-NPA (2 μ M – inibidor seletivo da nNOS). L-NPA promoveu maior responsividade vasodilatadora ao agonista G-1, em ambos os sexos, deslocando a curva para a esquerda e para baixo sem alterar a resposta vasodilatadora à concentração máxima (OVX: 88.3 ± 2.3 % vs ORX: 84.8 ± 3.3 %) (Figura 9A). Por outro lado, a expressão proteica da nNOS total foi aumentada após o estímulo com agonista G-1 [10 μ M], entretanto, não houve diferença no conteúdo proteico entre os grupos experimentais (OVX: 126.5 ± 5.6 U.A vs ORX: 124.0 ± 17.9 U.A) (Figura 9B).

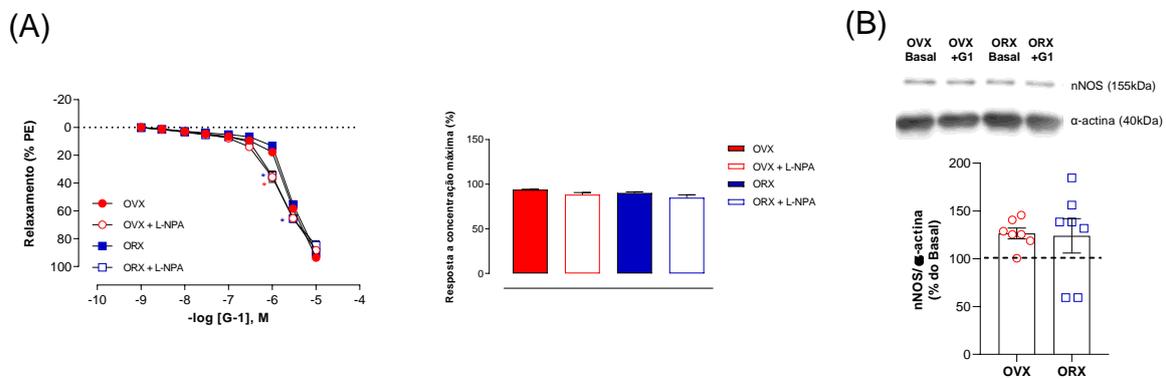


Figura 9: (A) Curva concentração-resposta ao agonista seletivo do GPER (G-1, 1 nM – 10 μ M) em artérias mesentéricas de resistência (OVX: n = 47; ORX: n = 42). Efeito da inibição seletiva da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) com N^w-propil-L-arginina [L-NPA - 2 μ M, (OVX: n = 7; ORX: n = 7)]. O gráfico de barras mostra a resposta de relaxamento à concentração máxima. (B) Análise densitométrica da quantificação dos níveis de expressão proteica relativa da enzima nNOS (155 kDa), normalizada por α -actina (40 kDa), em artérias de resistência mesentérica (OVX: n = 4-8; ORX: n = 4-8). Linha pontilhada representativo das artérias basais como 100%. Os valores foram expressos como média \pm EPM. * p < 0,05 comparado com a curva obtida antes da inibição. ANOVA duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni.

Diante desses resultados, foi investigado o possível envolvimento da participação do NO derivado da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Para isso, o conteúdo proteico da eNOS foi avaliado nos segmentos arteriais. A expressão proteica da Phospho-eNOS (Ser1177) (OVX: 99.6 ± 7.4 U.A vs ORX: 151.8 ± 5.5 U.A*) foi maior nos segmentos de mesentérica do grupo ORX, enquanto que na OVX a estimulação com o agonista G-1 [10 μ M] não alterou a expressão desta enzima no sítio de ativação estudado (Ser1177). Não foi observado diferença no

conteúdo proteico total da eNOS (OVX: 104.2 ± 12.6 U.A vs ORX: 117.1 ± 5.8 U.A) entre OVX e ORX (Figura 10).

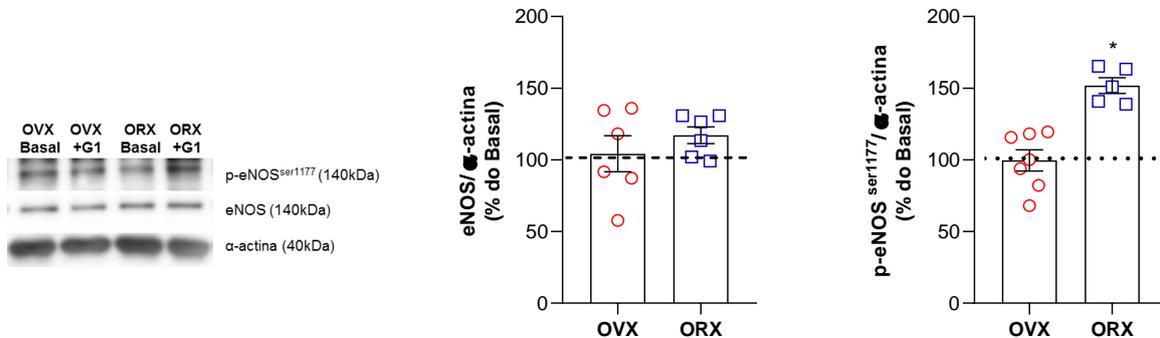


Figura 10: Análise densitométrica da quantificação dos níveis de expressão proteica relativa da enzima eNOS total (140 kDa) e p-eNOS (140 kDa), normalizada por α-actina (40 kDa) e eNOS total respectivamente, em artérias de resistência mesentérica (OVX: n = 4-8; ORX: n = 4-8). Linha pontilhada representativo das artérias basais como 100%. Os valores foram expressos como média ± EPM. * p < 0,05 vs OVX + G-1. ANOVA duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni.

4.1.2.2. Avaliação das vias de sinalização PI3k-Akt e MEK-ERK

Embora os resultados anteriores indiquem participação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) na resposta vasodilatadora mediada pelo GPER, o mecanismo envolvido permaneceu incerto. Visando identificar por qual via de sinalização estaria ocorrendo a fosforilação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), resultando na produção e liberação de óxido nítrico (NO), os segmentos arteriais foram incubados com LY-294,002 (2,5 μM – inibidor da via de sinalização rápida fosfatidilinositol-3-quinase (PI3k)-Akt que regula a ativação da eNOS). A inibição com LY-294,002 provocou menor responsividade relaxante ao agonista G-1 somente nos machos (OVX: 91.7 ± 2.1 % vs ORX: 75.6 ± 3.5 %*) (Figura 11A). Corroborando estes resultados, a estimulação com agonista G-1 [10 μM] aumentou a expressão proteica da p-Akt 1/2/3 (Ser 473) apenas nos segmentos arteriais dos animais orquidectomizados (OVX: 104.3 ± 7.9 U.A vs ORX: 134.5 ± 7.9 U.A*). Não foi detectada mudança significativa na expressão proteica total da Akt 1/2/3 nos animais gonadectomizados (OVX: 108.0 ± 6.6 U.A vs ORX: 107.9 ± 14.6 U.A) (Figura 11B).

Com a finalidade de verificar o possível mecanismo associado à liberação de NO proveniente da eNOS das artérias das fêmeas ovariectomizadas, foi testada a via de sinalização MEK-ERK por meio da técnica de western blotting. Mediante a realização do protocolo, observamos que os segmentos arteriais do grupo OVX apresentaram aumento da expressão da p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204) após o estímulo com agonista G-1 [10 μ M] (OVX: 146.2 \pm 2.2 U.A* vs ORX: 97.0 \pm 14.5 U.A), no entanto, não foi observada diferença no conteúdo proteico total da ERK 1/2 entre OVX e ORX (OVX: 91.1 \pm 2.2 U.A vs ORX: 96.4 \pm 1.7 U.A) (Figura 11C).

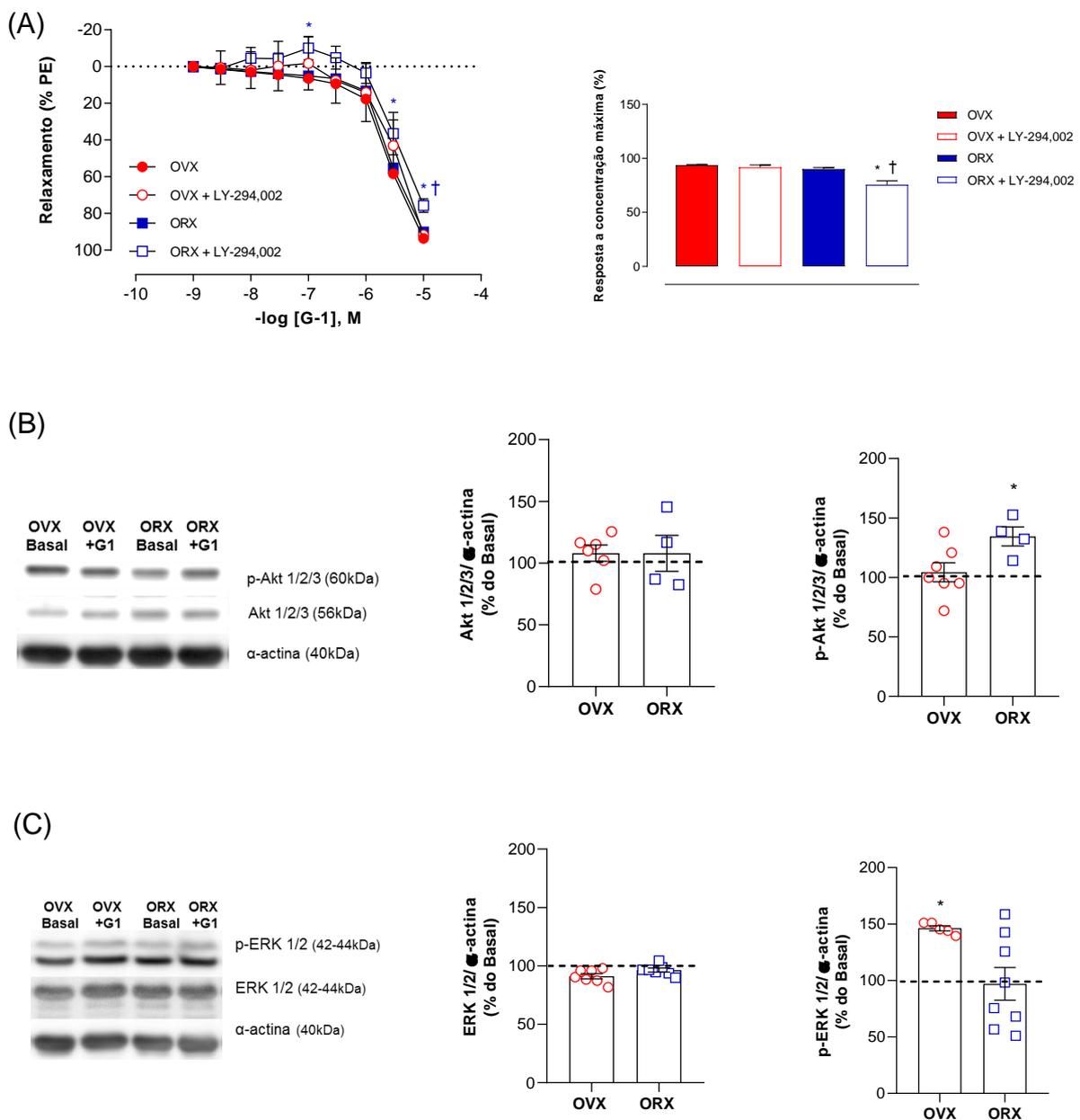


Figura 11: (A) Curva concentração-resposta ao agonista seletivo do GPER (G-1, 1 nM – 10 μ M) em

artérias mesentéricas de resistência (OVX: n = 47; ORX: n = 42). Efeito da inibição da via de sinalização rápida PI3k-Akt com LY-294,002 [2.5 μ M, (OVX: n = 7; ORX: n = 7)]. O gráfico de barras mostra a resposta de relaxamento à concentração máxima. Análise densitométrica da quantificação dos níveis de expressão proteica relativa da enzima (B) Akt 1/2/3 total (56 kDa) e p-Akt 1/2/3 (60 kDa), normalizada por α -actina (40 kDa) e Akt 1/2/3 total, respectivamente e (C) ERK 1/2 total (42-44 kDa) e p-ERK 1/2 (42-44 kDa), normalizada por α -actina (40 kDa) e ERK 1/2 total, respectivamente em artérias de resistência mesentérica (OVX: n = 4-8; ORX: n = 4-8). Linha pontilhada representativo das artérias basais como 100%. Os valores foram expressos como média \pm EPM. * p < 0,05 comparado com a curva obtida antes da inibição; † p < 0,05 vs OVX + 1400W; * p < 0,05 vs OVX + G-1 ou ORX + G-1. ANOVA duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni.

4.1.2.3. Avaliação da participação dos prostanóides

Para verificar o envolvimento dos prostanóides derivados da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase na resposta vasodilatadora ao agonista seletivo G-1, os segmentos arteriais foram incubados com indometacina [10 μ M], inibidor não seletivo da ciclooxigenase (COX). Na presença de indometacina nenhuma diferença foi observada em ambos os grupos estudados (OVX: 97.1 \pm 1.0 % vs ORX: 95.3 \pm 0.6 %) (Figura 12).

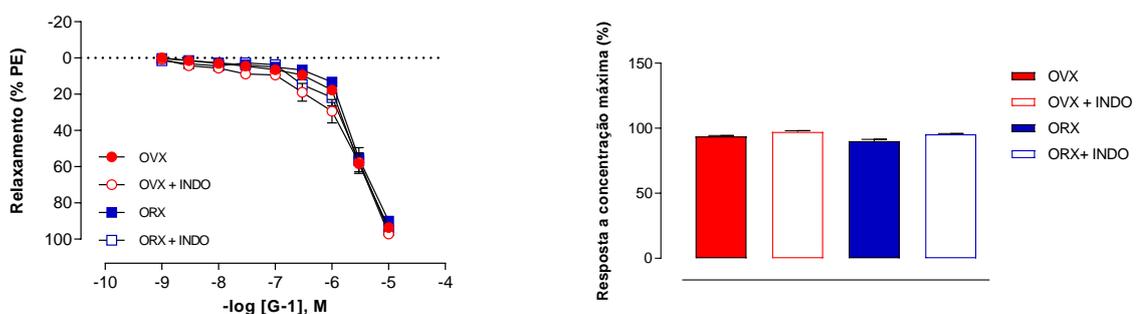


Figura 12: Curva concentração-resposta ao agonista seletivo do GPER (G-1, 1 nM – 10 μ M) em artérias mesentéricas de resistência (OVX: n = 47; ORX: n = 42). Efeito da inibição não seletiva da enzima ciclooxigenase (COX) com indometacina [INDO - 10 μ M, (OVX: n = 7; ORX: n = 7)]. O gráfico de barras mostra a resposta de relaxamento à concentração máxima. Os valores foram expressos como média \pm EPM. ANOVA duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni.

4.1.2.4. Avaliação da participação da hiperpolarização dependente do endotélio (EDH)

Inicialmente, foi investigada a participação dos ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs) derivados do ácido araquidônico pela via da enzima citocromo P450 (CYP). Para isso, os segmentos arteriais foram incubados com clotrimazol ($0,75 \mu\text{M}$ – inibidor da CYP). Clotrimazol não alterou a resposta vasodilatadora dos grupos estudados (OVX: $92.4 \pm 2.3 \%$ vs ORX: $92.2 \pm 2.1 \%$) (Figura 13).

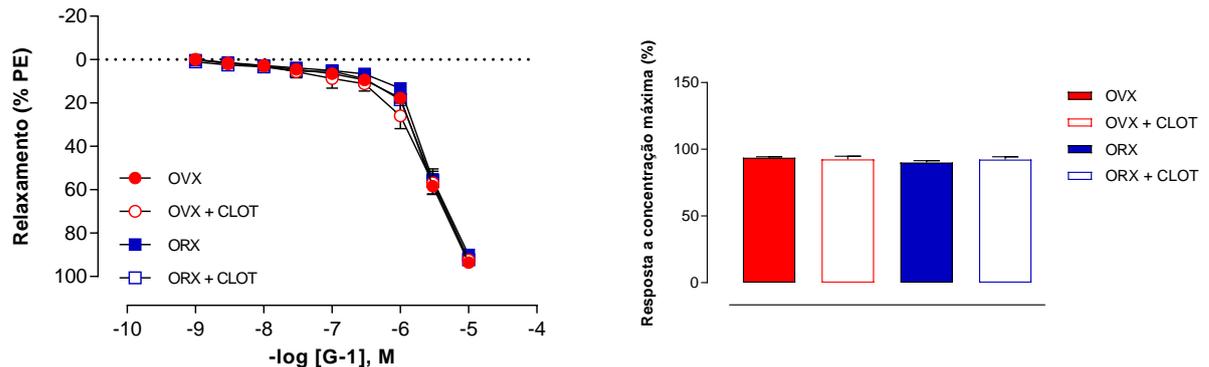


Figura 13: Curva concentração-resposta ao agonista seletivo do GPER (G-1, $1 \text{ nM} - 10 \mu\text{M}$) em artérias mesentéricas de resistência (OVX: $n = 47$; ORX: $n = 42$). Efeito da inibição inespecífica da enzima citocromo P450 (CYP) com clotrimazol [CLOT - $0,75 \mu\text{M}$, (OVX: $n = 7$; ORX: $n = 7$)]. O gráfico de barras mostra a resposta de relaxamento à concentração máxima. Os valores foram expressos como média \pm EPM. ANOVA duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni.

Em sequência, foi estudado o envolvimento do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Para isso, os segmentos arteriais foram incubados com catalase (1000 unt/ml – varredor enzimático de H_2O_2). Catalase alterou a responsividade vasodilatadora ao G-1, em ambos os sexos, atenuando a resposta vasodilatadora à concentração máxima apenas nas artérias mesentéricas do grupo ovariectomizado (OVX: $72.1 \pm 2.9 \%^*$ vs ORX: $90.7 \pm 2.8 \%$) (Figura 14A). Para confirmar o resultado funcional obtido, foi verificada a influência do agonista do GPER sobre a produção vascular local de H_2O_2 . Corroborando com o resultado funcional encontrado, a produção de H_2O_2 foi significativamente maior nas secções arteriais dos animais do grupo OVX quando comparado aos animais ORX (Figura 14B).

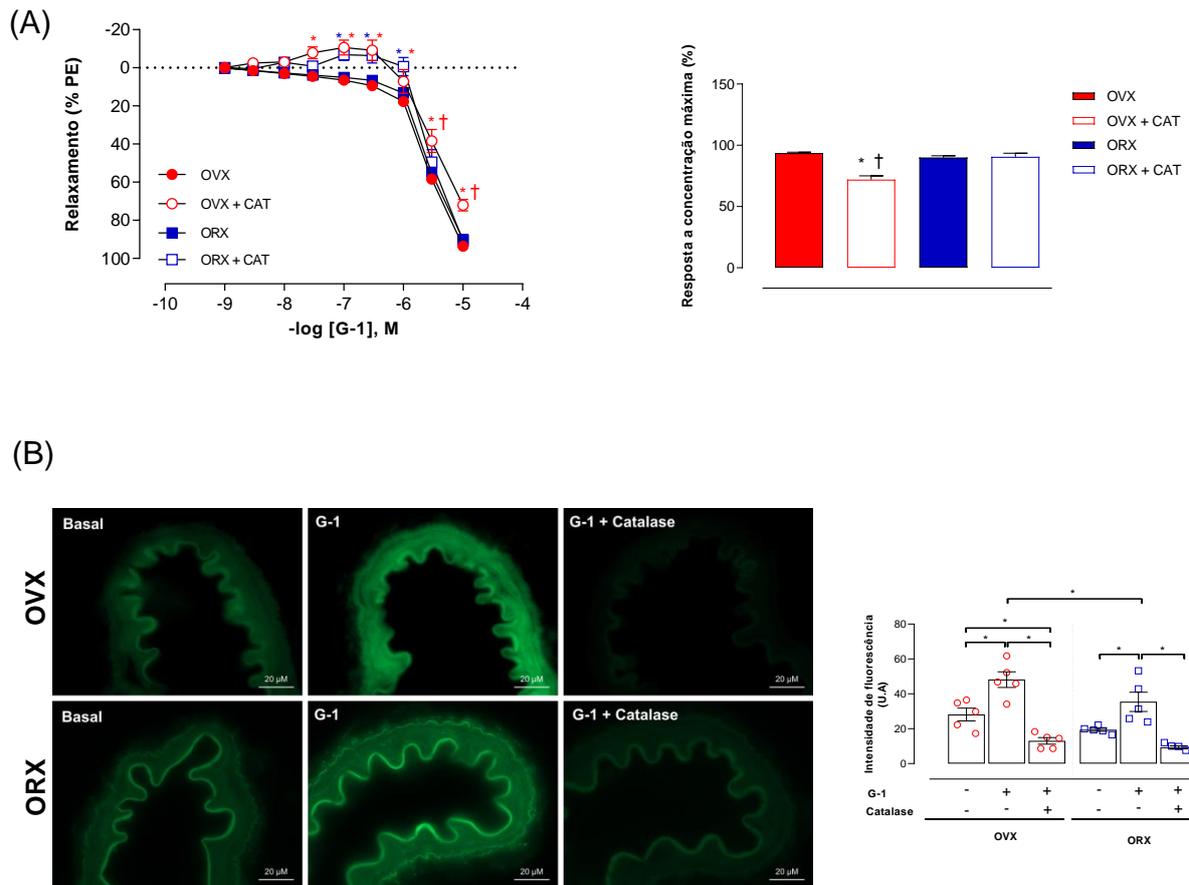


Figura 14: (A) Curva concentração-resposta ao agonista seletivo do GPER (G-1, 1 nM – 10 μ M) em artérias mesentéricas de resistência (OVX: n = 47; ORX: n = 42). Efeito da inibição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com catalase [CAT - 1000 u/mL, (OVX: n = 7; ORX: n = 7)]. O gráfico de barras mostra a resposta de relaxamento à concentração máxima. (B) Análise representativa de microscopia de fluorescência dos sinais emitidos pela oxidação do 2', 7'- diclorofluoresceína (DCF-DA) em seções arteriais microscópicas (OVX: n = 5; ORX: n = 5) na ausência ou presença de G-1 [10 μ M], com quantificação da fluorescência resultante. Barra de escala = 20 μ M. Os valores foram expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado com a curva obtida antes da inibição. † $p < 0,05$ vs ORX+ CAT; * $p < 0,05$ vs basal ou G-1 + CAT ou ORX + G-1. ANOVA uma ou duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni ou Newman-Keuls.

5. DISCUSSÃO

Os achados do presente estudo demonstraram que, (i) a ativação seletiva aguda do GPER é capaz de induzir relaxamento dos segmentos arteriais mesentéricos de resistência de ratos gonadectomizados, sem diferença sexual na ordem de magnitude da resposta vasodilatadora; além disso, (ii) o vasorelaxamento é parcialmente dependente do endotélio em ambos os sexos e essa resposta parece estar associada a similar presença do receptor nas diferentes camadas vasculares; e (iii) embora os mesmos mediadores endoteliais de relaxamento estejam participando da resposta ao agonista, o mecanismo envolvido em cada sexo é distinto.

É bem conhecido que o 17 β -estradiol pode promover relaxamento agudo independente do sexo em artéria femoral (KITAZAWA *et al.*, 1997), artéria aorta (NILSSON *et al.*, 2000) e no leito vascular coronariano de ratos espontaneamente hipertensos (SANTOS *et al.*, 2010) e normotensos gonadectomizados (SANTOS *et al.*, 2016) ou não (SANTOS *et al.*, 2004). Interessantemente, evidências reforçam que, a ativação seletiva aguda do GPER também é capaz de induzir dilatação em artérias mesentéricas de ratos normotensos (PEIXOTO *et al.*, 2017; PEIXOTO *et al.*, 2018) e espontaneamente hipertensos (DELGADO *et al.*, 2021), bem como em artéria carótida (BROUGHTON *et al.*, 2010) e arteríolas intracerebrais (MURATA *et al.*, 2013) de ratos *Sprague-Dawley*, de forma similar em ambos os sexos. Corroborando com esses dados, nosso estudo demonstrou que a ordem de magnitude da resposta vasodilatadora ao agonista seletivo do GPER não difere entre ratos gonadectomizados. Ao mesmo tempo, a resposta vasodilatadora foi máxima mesmo com a privação de hormônios sexuais gonadais, sugerindo mecanismos compensatórios como os que ocorrem com o declínio na produção de hormônios sexuais ovarianos (AREFIN *et al.*, 2014). Em contrapartida, outros autores observaram diferença sexual no relaxamento modulado pelo GPER em artérias mesentéricas de ratos Lewis (LINDSEY *et al.*, 2013) e no leito vascular coronariano de ratos Wistar (DEBORTOLI *et al.*, 2017). Em geral, esses dados sugerem que mecanismos não genômicos poderiam estar envolvidos no relaxamento desencadeado pelo E em ambos os sexos, no entanto esta resposta pode variar não apenas entre as espécies, mas também de acordo com o leito vascular analisado.

É importante ressaltar que o G-1 é um agonista seletivo para GPER, visto que o vasorelaxamento induzido por ele estava reduzido nos segmentos arteriais após o tratamento com G36, um antagonista seletivo de GPER (MEYER *et al.*, 2016; DEBORTOLI *et al.*, 2017). Além disso, G-1 se liga com afinidade semelhante ao estradiol, mas atua independentemente de RE α e RE β (LINDSEY *et al.*, 2009; PEIXOTO *et al.*, 2018). Portanto, o G-1 é uma ferramenta farmacológica altamente eficaz para elucidar os mecanismos de sinalização do GPER que contribuem para investigar os efeitos vasculares do E.

Considerando a importância da superfície endotelial na manutenção da homeostase e do tônus vascular (RUBANYI, 1993; DONATO *et al.*, 2009), a participação do endotélio na resposta vasodilatadora ao agonista G-1 foi investigada após remoção mecânica da camada íntima. De fato, os efeitos do agonista seletivo do GPER na responsividade vascular em ambos os sexos foram mostrados como resultado de um equilíbrio de suas ações nas células endoteliais e na camada muscular lisa (MURATA *et al.*, 2013), incluindo nas artérias mesentéricas (LINDSEY *et al.*, 2011; LINDSEY *et al.*, 2014; PEIXOTO *et al.*, 2017). Não obstante, a expressão do GPER se dá ao longo da parede do vaso de vários tecidos, humano (HAAS *et al.*, 2007) e animal em ambos os sexos (BROUGHTON *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2012). Isso sugere que o agonista GPER pode causar relaxamento por mecanismo dependente do endotélio e ação direta sobre camada de músculo liso da parede vascular (PEIXOTO *et al.*, 2017). Reforçando o descrito acima, nossos achados mostraram que a remoção endotelial atenuou parcialmente o relaxamento induzido por G-1 dos segmentos arteriais mesentéricos de ratos gonadectomizados. Além disso, as artérias mesentéricas desses animais não apresentaram diferença na imunolocalização do receptor independente da camada vascular arterial, corroborando com os dados funcionais obtidos com a remoção endotelial. Baseado nisso, autores sugerem que o GPER vascular não é sensível ao estado hormonal, pois ratas ovariectomizadas mantêm a expressão e função do receptor (ZIMMERMAN *et al.*, 2016).

A resposta de relaxamento remanescente nos vasos com desnudamento do endotélio pode ser parcialmente atribuída à ação inibitória direta do G-1 na mobilização do cálcio no MLV (MATA *et al.*, 2015), uma ação semelhante à do estrogênio (CREWS & KHALIL, 1999; MAZZUCA *et al.*, 2015). Os mecanismos pelos

quais o G-1 atua na mobilização do cálcio podem estar relacionados: (i) ao tipo de via ativada, como a que compreende o receptor do fator de crescimento epidérmico (REVANKAR *et al.*, 2005); (ii) o tipo de receptor envolvido, por exemplo, receptores de trifosfato de inositol ou receptores de rianodina (ARIAZI *et al.*, 2010) ou (iii) o tipo de canal para cálcio envolvido (DESCHAMPS *et al.*, 2010; TICA *et al.*, 2011). Além disso, o tempo de exposição (agudo ou crônico) ao G-1 (HAAS *et al.*, 2009) e as alterações na sensibilidade do miofilamento à $[Ca^{2+}]_i$ na camada de músculo liso vascular também podem estar envolvidos (MEYER *et al.*, 2012b). Apesar do conhecimento prévio em relação a resposta vasodilatadora direta do G-1 via inibição da mobilização do cálcio nas cMLV, mais estudos são necessários para ampliar a elucidação desses mecanismos.

Sabe-se que o E é capaz de induzir a liberação dos fatores vasoativos por meio do aumento da concentração intracelular de íons cálcio ($[Ca^{2+}]_i$) nas células endoteliais (RUSKO *et al.*, 1995; LE MELLAY *et al.*, 1997). Similarmente, ALTMANN *et al.* (2015) demonstraram que o G-1 pode promover rápido aumento na $[Ca^{2+}]_i$ em células endoteliais de microvasos cerebrais de ratos, através dos canais para cálcio do tipo L, bem como hiperpolarização induzida pela ativação de canais de K_{Ca} . Portanto, o GPER parece modular os efeitos do E relacionados à mobilização intracelular do cálcio no endotélio.

Dentre os componentes vasoativos do endotélio, o NO se destaca pelo seu potente efeito vasodilatador (CANNON, 1998). Sua síntese é estimulada por vários fatores, incluindo as forças de cisalhamento produzidas pelo fluxo sanguíneo no vaso (*shear stress*) (PALMER *et al.*, 1987; FLEMING, 2010). Ademais, é importante salientar que o GPER foi originalmente clonado após indução pelo estresse de cisalhamento em células endoteliais humanas (TAKADA *et al.*, 1997). Posto isso, a função do GPER parece estar ligada à via do NO (MEYER *et al.*, 2011). De fato, nosso estudo mostrou que a inibição não seletiva da NOS, atenuou a vasodilatação induzida pelo G-1 de forma semelhante em ambos os sexos. Oportunamente, as secções arteriais dos animais gonadectomizados apresentaram similar produção local de NO, corroborando com os dados obtidos com a inibição farmacológica. Diversos estudos apontaram participação do NO como mediador do relaxamento após estimulação do GPER (BROUGHTON *et al.*, 2010; MEYER *et al.*, 2010; MATA *et al.*, 2015; TROPEA *et al.*, 2015), inclusive em artérias mesentéricas (LINDSEY *et*

al., 2011; LINDSEY *et al.*, 2014; PEIXOTO *et al.*, 2017). Em contraposição aos nossos resultados, dados anteriores do nosso grupo demonstraram diferença sexual na dependência do NO modulada pelo GPER no leito vascular coronariano de ratos normotensos (DEBORTOLI *et al.*, 2017) e em artérias mesentéricas de ratos espontaneamente hipertensos (DELGADO *et al.*, 2021), não gonadectomizados. Independente disso, os dados desses estudos em conjunto com os nossos indicam claramente que, pelo menos em parte, a ação vasodilatadora do GPER está ligada a liberação de NO.

A literatura aponta que a privação de hormônios sexuais gonadais pode envolver a estimulação da atividade da iNOS ou sua maior expressão em ratos (LAMAS *et al.*, 2015), inclusive em segmentos arteriais mesentéricos (NAWATE *et al.*, 2005). De fato, neste estudo a inibição seletiva da iNOS alterou a responsividade vasodilatadora ao G-1 dos segmentos arteriais de ratos gonadectomizados, no entanto, a resposta vasodilatadora à concentração máxima foi reduzida apenas nas artérias mesentéricas dos animais orquidectomizados. Além disso, essa resposta ocorreu associada a maior marcação da iNOS nas secções arteriais dos animais orquidectomizados quando comparado aos animais ovariectomizados. Até onde sabemos, este estudo é o primeiro a demonstrar a contribuição da enzima iNOS em resposta à modulação do GPER. Dentro desse contexto, foi demonstrado que as diferenças relacionadas ao gênero na expressão de iNOS podem ser mediadas por influências hormonais na indução de citocinas inflamatórias (NEUGARTEN *et al.*, 1997). Outros autores observaram que a iNOS participa da resposta imune, liga-se à calmodulina em concentrações fisiologicamente relevantes e produz NO como um mecanismo de defesa imunológica contra o estresse oxidativo (KUMAR & CHANANA, 2017). Portanto, a iNOS provavelmente desempenha um papel significativo na produção de NO na privação de hormônios sexuais gonadais, no entanto, a participação desta isoforma na resposta vascular modulada pelo GPER não está totalmente elucidada.

Sugere-se que o GPER também possa recrutar outras enzimas sintetizadoras de NO, como a nNOS (AREFIN *et al.*, 2014), semelhante ao descrito para o estrogênio (MOLERO *et al.*, 2002; VERA-ARZAVE *et al.*, 2019) inclusive no estado de privação de hormônios sexuais gonadais (BAI *et al.*, 2019). De fato, a expressão

proteica total da nNOS foi aumentada nos segmentos arteriais dos animais gonadectomizados após o estímulo com agonista G-1. Por outro lado, a inibição seletiva da nNOS promoveu maior responsividade vasodilatadora ao agonista G-1, em ambos os sexos, deslocando a curva para a esquerda e para baixo sem alterar a resposta vasodilatadora à concentração máxima. Contudo, o papel na nNOS na resposta dilatadora ao agonista G-1 em artérias mesentéricas ainda não foi totalmente elucidado e, além disso, a contribuição desta isoforma para regulação do tônus vascular em resposta à modulação do GPER tem sido pouco descrita.

Tem sido demonstrado que a produção do NO induzida pelo G-1 desencadeia cascatas de sinalização que incluem a ativação das quinases ERK (PETRIE *et al.*, 2013; SCALING *et al.*, 2014), PI3K (REVANKAR *et al.*, 2005) e Akt (SHARMA & PROSSNITZ, 2011), induzindo a fosforilação de resíduos de ativação da eNOS, semelhante ao que acontece com a ligação do E aos RE (FREDETTE *et al.*, 2018). Neste estudo, observamos que a vasodilatação induzida pelo agonista seletivo do GPER é parcialmente dependente da ativação das quinases ERK e PI3K/Akt. Interessantemente, a inibição da via de sinalização rápida PI3k-Akt provocou menor resposta relaxante ao agonista G-1 somente no grupo ORX. Simultaneamente, a estimulação com agonista seletivo do GPER aumentou a expressão proteica da Phospho-eNOS (Ser1177) e da p-Akt 1/2/3 (Ser 473) apenas nos segmentos arteriais dos animais deste grupo. Estes resultados são indicativos da participação da via de sinalização rápida PI3k-Akt-eNOS na resposta de relaxamento mediada pelo GPER em animais orquidectomizados. De fato, a ativação da via PI3k-Akt por ação não-genômica tem sido relacionada a fosforilação da eNOS, resultando na produção e liberação de NO (LEE *et al.*, 2014; DE FRANCESCO *et al.*, 2013; MEYER *et al.*, 2014; PEIXOTO *et al.*, 2017). Por outro lado, a via de sinalização MEK-ERK parece ser responsável pela fosforilação da eNOS nas ratas ovariectomizadas, uma vez que a estimulação com agonista seletivo G-1 aumentou a expressão proteica da p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204) apenas nos segmentos arteriais dos animais deste grupo. No entanto, acreditamos que o resíduo de Ser635 seja o possível alvo da fosforilação desta via, uma vez que este resíduo é um dos locais de fosforilação excitatória bem conhecido localizado no domínio autoinibitório CaM da eNOS e associado como alvo de interação da via de sinalização MEK-ERK modulada pelo estrogênio (RAMADOSS *et al.*, 2013). Coletivamente, esses

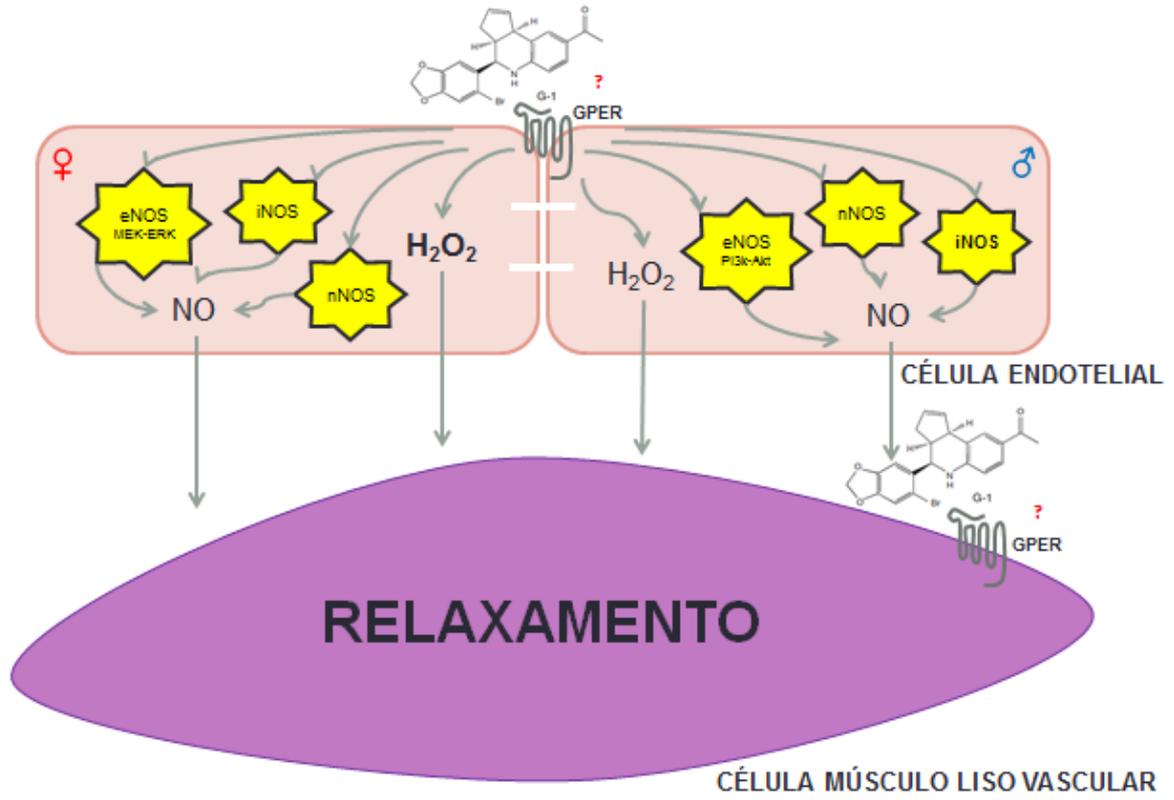
resultados indicam que diferentes isoformas da NOS podem participar da produção e liberação de NO em resposta a modulação do GPER em estado de privação de hormônios sexuais gonadais e o mecanismo responsável pela ativação da eNOS observado em artérias mesentéricas de ratos gonadectomizados difere entre os sexos.

Os PNs, derivados da via da COX, também são importantes substâncias liberadas pelo endotélio com poder vasomotor e embora a contribuição dos metabólitos da COX sobre a função vascular em resposta ao estrogênio seja bem descrita em uma variedade de estudos experimentais e também epidemiológico, tais como artérias coronárias epicardiais de humanos (CHESTER *et al.*, 1995), artérias coronárias de suínos (TEOH *et al.*, 2000), artérias carótidas de coelhos (SALOM *et al.*, 2002), aorta de ratos (TEP-AREENAN *et al.*, 2003), bem como em células endoteliais de artérias pulmonares de ovinos (SHERMAN *et al.*, 2002), neste estudo a inibição individual não seletiva da COX não foi capaz de atenuar a resposta mediada pelo GPER dos segmentos arteriais de ratos gonadectomizados, sugerindo que o agonista seletivo do GPER pode promover relaxamento independente de PNs, em particular a PGI₂, como previamente relatado (MURATA *et al.*, 2013; LINDSEY *et al.*, 2014; PEIXOTO *et al.*, 2017). Por outro lado, a deficiência crônica do GPER parece estar associada ao aumento da vasoconstrição mediada por prostanóides de origem endotelial (MEYER *et al.*, 2012a). E ainda, GPER parece ser capaz de modular a inibição da produção e atividade de prostanóides vasoconstritores em condições pró-inflamatórias (MEYER *et al.*, 2015).

Finalmente, a EDH destaca-se por ser um notório conjunto de diferentes componentes vasoativos endoteliais com poderosa influência vasodilatadora, principalmente em pequenas artérias de resistência (GARLAND & DORA, 2017). Além disso, evidências sugerem que a vasodilatação modulada pelo E tem sido atribuída também aos metabólitos derivados de CYP, bem como ao aumento da sua atividade e da produção de EETs em diferentes preparações, tais como leito vascular coronariano de ratos normotensos (SANTOS *et al.*, 2004), espontaneamente hipertensos (SANTOS *et al.*, 2010) e arteríolas musculares esqueléticas de ratos (HUANG *et al.*, 2004). Todavia, neste estudo a inibição da CYP revelou que os EETs parecem não participar do efeito vasodilatador pela

ativação do GPER, sugerindo que esta via não parece ser importante mediadora da vasodilatação induzida pelo agonista seletivo G-1. De fato, outros autores também mostraram que a vasodilatação induzida pelo agonista seletivo do GPER não foi afetada na presença da inibição da citocromo P450 (MURATA *et al.*, 2013). Não obstante, o H₂O₂ parece atuar como mediador do relaxamento induzido pelo G-1, uma vez que na presença do varredor enzimático para este fator vasorelaxante a responsividade vasodilatadora em resposta ao agonista seletivo do GPER dos segmentos arteriais de ratos gonadectomizados foi alterada. No entanto, a resposta vasodilatadora à concentração máxima na presença de catalase foi reduzida apenas nas artérias mesentéricas dos animais ovariectomizados. Reforçando este achado, a produção local de H₂O₂ foi significativamente maior nas secções arteriais dos animais do grupo OVX quando comparado aos animais ORX. Por outro lado, um estudo realizado em artérias mesentéricas de ratos espontaneamente hipertensos, mostrou que o H₂O₂ é capaz de modular o relaxamento em resposta ao G-1 em machos (DELGADO *et al.*, 2021). Posto isso, é importante considerar que o E parece modular os níveis de H₂O₂, principalmente na privação de hormônios sexuais gonadais, onde a biodisponibilidade do NO parece estar afetada (KANG *et al.*, 2011; SCHENKEL *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2014). E ainda, autores mostraram que o H₂O₂ pode causar liberação endotelial de NO mediada por efeitos cooperativos entre a fosforilação da eNOS dependente de PI3k-Akt e a ativação de MEK-ERK. Isso pode representar uma adaptação celular aguda a um cenário de estresse oxidativo (CAI *et al.*, 2003).

6. SUMARIZAÇÃO DOS RESULTADOS



7. CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados apresentados neste estudo mostram que a ativação seletiva aguda do GPER é capaz de promover relaxamento dos segmentos arteriais mesentéricos de resistência de ratos gonadectomizados, sem diferença sexual na ordem de magnitude da resposta vasodilatadora. Esse vasorelaxamento é parcialmente dependente do endotélio em ambos os sexos, com participação do NO e do H₂O₂ como mediadores dessa resposta. As três isoformas da NOS contribuem na produção e liberação de NO em ambos os grupos, no entanto o papel da iNOS é mais expressivo nos animais orquidectomizados. E ainda, o mecanismo pelo qual a eNOS é fosforilada difere entre os sexos, sendo a via de sinalização rápida PI3k-Akt-eNOS identificada para os ratos orquidectomizados e MEK-ERK-eNOS para as ratas ovariectomizadas. Ademais, a contribuição do H₂O₂ na vasodilatação induzida pelo G-1 parece ser maior nas ratas ovariectomizadas.

Em conjunto, esses resultados fornecem uma nova perspectiva para a compreensão dos mecanismos vasculares envolvidos nas respostas mediadas pelo estrogênio via GPER, tanto em mulheres quanto em homens. Finalmente, nossas descobertas podem ajudar a promover o desenvolvimento de métodos terapêuticos para neutralizar as alterações cardiovasculares observadas quando a produção de hormônios sexuais gonadais é modificada.

8. REFERÊNCIAS

ADEAGBO, A S & TRIGGLE, C R. Varying extracellular [K⁺]: a functional approach to separating EDHF- and EDNO-related mechanisms in perfused rat mesenteric arterial bed. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 21, n. 3, p. 423–9, 1993.

AIRES, R D; CAPETTINI, L S; SILVA, J F; RODRIGUES-MACHADO, M G; PINHO, V; TEIXEIRA, M M; CORTES, S F; LEMOS, V S. Paraquat poisoning induces TNF- α -dependent iNOS/NO mediated hyporesponsiveness of the aorta to vasoconstrictors in rats. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. 1-13, 2013.

ALDERTON, W K; COOPER, C E; KNOWLES, R G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, v. 357(Pt 3), p. 593-615, 2001.

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

ALJADA, A & DANDONA, P. Nitric oxide synthase. **Methods in Molecular Biology**, v. 108, p. 191-198, 1998.

ALTMANN, J B; YAN, G; MEEKS, J F; ABOOD, M E; BRAILOIU, E; BRAILOIU, G C. G protein-coupled estrogen receptor-mediated effects on cytosolic calcium and nanomechanics in brain microvascular endothelial cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 133, n. 5, p. 629-639, 2015.

ÁLVAREZ, A; HERMENEGILDO, C; ISSEKUTZ, A C; ESPLUGUES, J V; SANZ, M J. Estrogens inhibit angiotensin II-induced leukocyte-endothelial cell interactions in vivo via rapid endothelial nitric oxide synthase and cyclooxygenase activation. **Circulation Research**, v. 91, n. 12, p. 1142-1150, 2002.

ALVAREZ, Y; BRIONES, A M; BALFAGÓN, G; ALONSO, M J; SALAICES, M. Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. **Journal of Hypertension**, v. 23, n. 4, p. 767–777, 2005.

ALVAREZ, Y; PÉREZ-GIRÓN, J V; HERNANZ, R; BRIONES, A M; GARCÍA-REDONDO, A; BELTRÁN, A; ALONSO, M J; SALAICES, M. Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 321, n. 1, p. 381–388, 2007.

AREFIN, S; SIMONCINI, T; WIELAND, R; HAMMARQVIST, F; SPINA, S; GOGLIA, L; KUBLICKIENE, K. 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.

ARIAZI, E A; BRAILOIU, E; YERRUM, S; SHUPP, H A; SLIFKER, M J; CUNLIFFE, H E; BLACK, M A; DONATO, A L; ARTERBURN, J B; OPREA, T I; PROSSNITZ, E R; DUN, N J; JORDAN, V C. The G protein-coupled receptor GPR30 inhibits

proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells. **Cancer Research**, v. 70, n. 3, p. 1184-94, 2010.

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

BAI, M F & WANG, X. Risk factors associated with coronary heart disease in women: a systematic review. **Herz**, v. 45, n. 1, p. 52-57, 2020.

BAI, Y; QIN, L H; ZHANG, Y; JIANG, H; WANG, K; JIA, J. [Effects of estrogen and remifemin on neuronal nitric oxide synthase and transient receptor potential vanilloid 1 in submandibular gland of ovariectomized rats]. **Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. Chinese Journal of Stomatology**, v. 54, n. 3, p. 188-193, 2019.

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

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

BLUMENTHAL, R S; HELDMAN, A W; BRINKER, J A; RESAR, J R; COOMBS, V J; GLOTH, S T; GERSTENBLITH, G; REIS, S E. Acute effects of conjugated estrogens on coronary blood flow response to acetylcholine in men. **The American Journal of Cardiology**, v. 80, p.1021–1024, 1997.

BOLOGA, C G; REVANKAR, C M; YOUNG, S M; EDWARDS, B S; ARTERBURN, J B; KISELYOV, A S; PARKER, M A; TKACHENKO, S E; SAVCHUCK, N P; SKLAR, L A; OPREA, T I; PROSSNITZ, E R. Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. **Nature Chemical Biology**, v. 2, n. 4, p. 207-212, 2006.

BOLOTINA, V M; NAJIBI, S; PALACINO, J J; PAGANO, P J; COHEN, R A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, p. 850-853, 1994.

BORGO, M V; LOPES, A B; GOUVÊA, S A; ROMERO, W G; MOYSES, M R; BISSOLI, N S; ABREU, G R. Effect of tamoxifen on the coronary vascular reactivity of spontaneously hypertensive female rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 8, p. 786-792, 2011.

BOS, C L; RICHEL, D J; RITSEMA, T; PEPPELENBOSCH, M P; VERSTEEG, H H. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 7, p. 1187–205, 2004.

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

BURTON, A C. Relation of structure to function of the tissues of the wall of blood vessels. **Physiological Reviews**, v. 34, n. 4, p. 619-42, 1954.

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

CAI, H; LI, Z; DAVIS, M E; KANNER, W; HARRISON, D G; DUDLEY, S C JR. Akt-dependent phosphorylation of serine 1179 and mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 cooperatively mediate activation of the endothelial nitric-oxide synthase by hydrogen peroxide. **Molecular Pharmacology**, v. 63, n. 2, p. 325-31, 2003.

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

CANNON, R O. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 8 Pt 2, p. 1809–1819, 1998.

CARMECI, C; THOMPSON, D A; RING, H Z; FRANCKE, U; WEIGEL, R J. Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. **Genomics**, v. 45, n. 3, p. 607-617, 1997.

CARVAJAL, J A; GERMAIN, A M; HUIDOBRO-TORO, J P; WEINER, C P. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 184, n. 3, p. 409–420, 2000.

CEREDA, V; FALBO, P T; MANNA, G; IANNACE, A; MENGHI, A; CORONA, M; SEMENOVA, D; CALÒ, L; CARNEVALE, R; FRATI, G; LANZETTA, G. Hormonal prostate cancer therapies and cardiovascular disease: a systematic review. **Heart Failure Reviews**, v. 27, n. 1, p. 119-134, 2022.

CHAKRABARTI, S; MORTON, J S; DAVIDGE, S T. Mechanisms of Estrogen Effects on the Endothelium: An Overview. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 30, n. 7, p. 705–712, 2014.

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

CHATAIGNEAU, T; FÉLÉTOU, M; DUHAULT, J; VANHOUTTE, P M. Epoxyeicosatrienoic acids, potassium channel blockers and endothelium-dependent hyperpolarization in the guinea-pig carotid artery. **British Journal of Pharmacology**, v. 123, n. 3, p. 574-580, 1998.

CHAUHAN, S D; NILSSON, H; AHLUWALIA, A; HOBBS, A J. 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, 2003.

CHEN, Y; FU, L; HAN, Y; TENG, Y; SUN, J; XIE, R; CAO, J. Testosterone replacement therapy promotes angiogenesis after acute myocardial infarction by

enhancing expression of cytokines HIF-1a, SDF- 1a and VEGF. **European Journal of Pharmacology**, v. 684, n. 1, p. 116-124, 2012.

CHENG, S B; GRAEBER, C T; QUINN, J A; FILARDO, E J. Retrograde transport of the transmembrane estrogen receptor, G-protein-coupled-receptor-30 (GPR30/GPER) from the plasma membrane towards the nucleus. **Steroids**, v. 76, n. 9, p. 892-896, 2011.

CHESTER, A H; JIANG, C; BORLAND, J A; YACOUB, M H; COLLINS, P. Oestrogen relaxes human epicardial coronary arteries through non endothelium-dependent mechanisms. **Coronary Artery Disease**, v. 6, p. 417-422, 1995.

CONCEA-MCT. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação-Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica – DBCA. **In Brazilian Government**, p. 1–50, 2016.

COSTA, E D; SILVA, J F; AIRES, R D; GARCIA, D C; KANSAON, M J; WAINSTEIN, A J; REZENDE, B A; TEIXEIRA, M M; SILVA, R F; CORTES, S F; LEMOS, V S. Neuronal nitric oxide synthase contributes to the normalization of blood pressure in medicated hypertensive patients. **Nitric Oxide**, v. 80, p. 98-107, 2018.

CREWS, J K & KHALIL, R A. Antagonistic effects of 17 β -estradiol, progesterone, and testosterone on Ca²⁺ entry mechanisms of coronary vasoconstriction. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 19, n. 4, p. 1034-1040, 1999.

DANTAS, A P; SCIVOLETTO, R; FORTES, Z B; NIGRO, D; CARVALHO, M H. Influence of female sex hormones on endothelium-derived vasoconstrictor prostanoid generation in microvessels of spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 34, n. 4, p. 914-919, 1999.

DANTAS, A P; TOSTES, R C; FORTES, Z B; COSTA, S G; NIGRO, D; CARVALHO, M H. In vivo evidence for antioxidant potential of estrogen in microvessels of female spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 39, p. 405–411, 2002.

DEBORTOLI, A R; ROUVER, W D N; DELGADO, N T B; MENGAL, V; CLAUDIO, E R G; PERNOMIAN, L; BENDHACK, L M; MOYSÉS, M R; SANTOS, R L D. GPER modulates tone and coronary vascular reactivity in male and female rats. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 59, n. 2, p. 171–180, 2017.

DECHERING, K; BOERSMA, C; MOSSSELMAN, S. Estrogen receptors alpha and beta: two receptors of a kind? **Current Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 5, p. 561-76, 2000.

DE FRANCESCO, E M; ANGELONE, T; PASQUA, T; PUPO, M; CERRA, M C; MAGGIOLINI, M. GPER mediates cardiotropic effects in spontaneously hypertensive rat hearts. **PloS One**, v. 8, n. 8, p. 1-12, 2013.

DELGADO, N T B; ROUVER, W D N; FREITAS-LIMA, L C; VIEIRA-ALVES, I; LEMOS, V S; DOS SANTOS, R L. Sex Differences in the Vasodilation Mediated by G

Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER) in Hypertensive Rats. **Frontiers in Physiology**, v. 12, p. 659291, 2021.

DELL'ALBANI, P; SANTANGELO, R; TORRISI, L; NICOLETTI, V G; DE VELLIS, J; GIUFFRIDA STELLA, A M. JAK/STAT signaling pathway mediates cytokine-induced iNOS expression in primary astroglial cell cultures. **Journal of Neuroscience Research**, v. 65, n. 5, p. 417-24, 2001.

DE MEDEIROS, A R; LAMAS, A Z; CALIMAN, I F; DALPIAZ, P L; FIRMES, L B; DE ABREU, G R; MOYSÉS, M R; LEMOS, E M; DOS REIS, A M; BISSOLI, N S. Tibolone has anti-inflammatory effects in estrogen-deficient female rats on the natriuretic peptide system and TNF-alpha. **Regulatory Peptides**, v. 179, n. 1, p. 55-60, 2012.

DENNIS, M K; FIELD, A S; BURAI, R; RAMESH, C; PETRIE, W K; BOLOGA, C G; OPREA, T I; YAMAGUCHI, Y; HAYASHI, S; SKLAR, L A; HATHAWAY, H J; ARTERBURN, J B; PROSSNITZ, E R. 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. H1806-H1813, 2009.

DESCHAMPS, A M; MURPHY, E; SUN, J. Estrogen receptor activation and cardioprotection in ischemia reperfusion injury. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 20, n. 3, p. 73-8, 2010.

DONATO, A J; PIERCE, G L; LESNIEWSKI, L A; SEALS, D R. Role of NFκB in age-related vascular endothelial dysfunction in humans. **Ageing (Albany NY)**, v. 1, n. 8, p. 678-680, 2009.

DOS SANTOS, R L; DA SILVA, F B; RIBEIRO, R F JR; STEFANON, I. Sex hormones in the cardiovascular system. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 18, n. 2, p. 89-103, 2014.

DOS SANTOS, R L; DELLACQUA, L O; DELGADO, N T; ROUVER, W N; PODRATZ, P L; LIMA, L C; PICCIN, M P; MEYRELLES, S S; MAUAD, H; GRACELI, J B; MOYSES, M R. Pomegranate peel extract attenuates oxidative stress by decreasing coronary angiotensin-converting enzyme (ACE) activity in hypertensive female rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 79, n. 21, p. 998-1007, 2016.

EDWARDS, G; DORA, K A; GARDENER, M J; GARLAND, C J; WESTON, A H. K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. **Nature**, v. 396, n. 6708, p. 269-272, 1998.

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

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

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

FILARDO, E J; QUINN, J A; BLAND, K I; FRACKELTON, A R JR. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. **Molecular Endocrinology**, v. 14, n. 10, p. 1649-1660, 2000.

FILARDO, E J; QUINN, J A; FRACKELTON, A R JR; BLAND, K I. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. **Molecular Endocrinology**, v. 16, n. 1, p. 70-84, 2002.

FILARDO, E; QUINN, J; PANG, Y; GRAEBER, C; SHAW, S; DONG, J; THOMAS, P. Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. **Endocrinology**, v. 148, p. 3236-3245, 2007.

FILICE, E; RECCHIA, A G; PELLEGRINO, D; ANGELONE, T; MAGGIOLINI, M; CERRA, M C. A new membrane G protein-coupled receptor (GPR30) is involved in the cardiac effects of 17beta-estradiol in the male rat. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 60, n. 4, p. 3-10, 2009.

FILIPPINI, A; D'AMORE, A; D'ALESSIO, A. Calcium Mobilization in Endothelial Cell Functions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4525, 2019.

FLEMING, I. Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. **Pflugers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 459, n. 6, p. 793-806, 2010.

FÖRSTERMANN, U & MÜNDEL, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: From marvel to menace. **Circulation**, v. 113, n. 13, p. 1708–1714, 2006.

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

FÖRSTERMANN, U & SESSA, W C. Nitric oxide synthases: Regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, n. 7, 2012.

FREDETTE, N C; MEYER, M R; PROSSNITZ, E R. Role of GPER in estrogen-dependent nitric oxide formation and vasodilation. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 176, p. 65-72, 2018.

FUNAKOSHI, T; YANAI, A; SHINODA, K; KAWANO, M M; MIZUKAMI, Y. G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 346, n. 3, p. 904-910, 2006.

GARLAND, C J & DORA, K A. EDH: endothelium-dependent hyperpolarization and microvascular signalling. **Acta Physiologica (Oxf)**, v. 219, n. 1, p. 152-161, 2017.

GHEORGHE, G S; HODOROGEA, A S; CIOBANU, A; NANEA, I T; GHEORGHE, A C D. Androgen Deprivation Therapy, Hypogonadism and Cardiovascular Toxicity in Men with Advanced Prostate Cancer. **Current Oncology**, v. 28, n. 5, p. 3331-3346, 2021.

GILDE, A J; VAN DER LEE, K A; WILLEMSSEN, P H; CHINETTI, G; VAN DER LEIJ, F R; VAN DER VUSSE, G J; STAELS, B; VAN BILSEN, M. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α and PPAR β/δ , but not PPAR γ , modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism. **Circulation Research**, v. 92, n. 5, p. 518-524, 2003.

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

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

GROVES, J T & WANG, C C. Nitric oxide synthase: models and mechanisms. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 4, n. 6, p. 687-95, 2000.

GRYGLEWSKI, R J. Prostacyclin among prostanoids. **Pharmacological Reports**, v. 60, n. 1, p., 3-11, 2008.

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

HAAS, E; MEYER, M R; SCHURR, U; BHATTACHARYA, I; MINOTTI, R; NGUYEN, H H; HEIGL, A; LCHAT, M; GENONI, M; BARTON, M. Differential effects of 17 β -estradiol on function and expression of estrogen receptor α , estrogen receptor β and GPR30 in arteries and veins of patients with atherosclerosis. **Hypertension**, v. 49, n. 6, p. 1358-1363, 2007.

HAAS, E; BHATTACHARYA, I; BRAILOIU, E; DAMJANOVIĆ, M; BRAILOIU, G C; GAO, X; MUELLER-GUERRE, L; MARJON, N A; GUT, A; MINOTTI, R; MEYER, M R; AMANN, K; AMMANN, E; PEREZ-DOMINGUEZ, A; GENONI, M; CLEGG, D J; DUN, N J; RESTA, T C; PROSSNITZ, E R; BARTON, M. Regulatory role of G protein-coupled estrogen receptor for vascular function and obesity. **Circulation Research**, v. 104, n. 3, p. 288-291, 2009.

HALL, J M; COUSE, J F; KORACH, K S. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 36869-36872, 2001.

HAMILTON, K J; HEWITT, S C; ARAO, Y; KORACH, K S. Estrogen Hormone Biology. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 125, p. 109-146, 2017.

HATANO, Y; NAKAMURA, K; MORIYAMA, S; MORI, K; TODA, N. The contractile responses of isolated dog cerebral and extracerebral arteries to oxybarbiturates and thiobarbiturates. **Anesthesiology**, v. 71, n. 1, p. 80-86, 1989.

HAYNES, M P; SINHA, D; RUSSELL, K S; COLLINGE, M; FULTON, D; MORALES-RUIZ, M; SESSA, W C; BENDER, J R. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase–Akt pathway in human endothelial cells. **Circulation Research**, v. 87, n. 8, p. 677-682, 2000.

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

HORIKAMI, D; KOBAYASHI, K; MURATA, T. Prostanoids regulate vascular permeability. **Nihon Yakurigaku zasshi. Folia Pharmacologica Japonica**, v. 155, n. 6, p. 395-400, 2020.

HSU, B; CUMMING, R G; NAGANATHAN, V; BLYTH, F M; LE COUTEUR, D G; HIRANI, V; WAITE, L M; SEIBEL, M J; HANDELSMAN, D J. Temporal Changes in Androgens and Estrogens Are Associated With All-Cause and Cause-Specific Mortality in Older Men. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 101, n. 5, p. 2201-2210, 2016.

HU, J R; DUNCAN, M S; MORGANS, A K; BROWN, J D; MEIJERS, W C; FREIBERG, M S; SALEM, J E; BECKMAN, J A; MOSLEHI, J J. Cardiovascular Effects of Androgen Deprivation Therapy in Prostate Cancer: Contemporary Meta-Analyses. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 40, n. 3, p. e55-e64, 2020.

HUANG, A; SUN, D; WU, Z; YAN, C; CARROLL, M A; JIANG, H; FALCK, J R; KALEY, G. Estrogen Elicits Cytochrome P450—Mediated Flow-Induced Dilation of Arterioles in NO Deficiency Role of PI3K-Akt Phosphorylation in Genomic Regulation. **Circulation Research**, v. 94, n. 2, p. 245-252, 2004.

IGNATOV, T; MODL, S; THULIG, M; WEIßENBORN, C; TREECK, O; ORTMANN, O; ZENCLUSSEN, A; COSTA, S D; KALINSKI, T; IGNATOV, A. GPER-1 acts as a tumor suppressor in ovarian cancer. **Journal of Ovarian Research**, v. 6, n. 1, p. 51, 2013.

IORGA, A; CUNNINGHAM, C M; MOAZENI, S; RUFFENACH, G; UMAR, S; EGHBALI, M. The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy. **Biology of Sex Differences**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2017.

JESSUP, J A; LINDSEY, S H; WANG, H; CHAPPELL, M C; GROBAN, L. Attenuation of salt-induced cardiac remodeling and diastolic dysfunction by the GPER agonist G-1 in female mRen2. Lewis rats. **PLoS One**, v. 5, n. 11, p. 1-9, 2010.

KANG, L S; CHEN, B; REYES, R A; LEBLANC, A J; TENG, B; MUSTAFA, S J; MULLER-DELP, J M. Aging and estrogen alter endothelial reactivity to reactive oxygen species in coronary arterioles. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 300, n. 6, p. H2105-15, 2011.

KANG, S; LIU, Y; SUN, D; ZHOU, C; LIU, A; XU, C; HAO, Y; LI, D; YAN, C; SUN, H. Chronic activation of the G protein-coupled receptor 30 with agonist G-1 attenuates heart failure. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. 1-9, 2012.

KANG, W B; DENG, Y T; WANG, D S; FENG, D; LIU, Q; WANG, X S; RU, J Y; CONG, Y; ZHAO, J N; ZHAO, M G; LIU, G. Osteoprotective effects of estrogen membrane receptor GPR30 in ovariectomized rats. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 154, p. 237-44, 2015.

KANNEL, W B; HJORTLAND, M C; MCNAMARA, P M; GORDON, T. Menopause and risk of cardiovascular disease: the Framingham study. **Annals of Internal Medicine**, v. 85, n. 4, p. 447-452, 1976.

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

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

KUIPER, G G; ENMARK, E; PELTO-HUIKKO, M; NILSSON, S; GUSTAFSSON, J A. 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.

KUMAR, A & CHANANA, P. Role of Nitric Oxide in Stress-Induced Anxiety: From Pathophysiology to Therapeutic Target. **Vitamins and Hormones**, v. 103, p. 147–67, 2017.

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

LAMAS, A Z; CALIMAN, I F; DALPIAZ, P L; DE MELO, A F JR; ABREU, G R; LEMOS, E M; GOUVEA, S A; BISSOLI, N S. Comparative effects of estrogen, raloxifene and tamoxifen on endothelial dysfunction, inflammatory markers and oxidative stress in ovariectomized rats. **Life Sciences**, v. 124, p. 101-109, 2015.

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

LEE, A F; MCFARLANE, L C; STRUTHERS, A D. Ovarian hormones in man: their effects on resting vascular tone, angiotensin converting enzyme activity and angiotensin II-induced vasoconstriction. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 50, p. 73–76, 2000.

LEE, T M; LIN, S Z; CHANG, N C. Both GPER and membrane oestrogen receptor- α activation protect ventricular remodelling in 17 β oestradiol-treated ovariectomized infarcted rats. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 18, n. 12, p. 2454-2465, 2014.

LEKONTSEVA, O; JIANG, Y; DAVIDGE, S T. Estrogen replacement increases matrix metalloproteinase contribution to vasoconstriction in a rat model of menopause. **Journal of Hypertension**, v. 27, n. 8, p. 1602-1608, 2009.

LI, J; LOBUE, A; HEUSER, S K; LEO, F; CORTESE-KROTT, M M. Using diaminofluoresceins (DAFs) in nitric oxide research. **Nitric Oxide**, v. 115, p. 44–54, 2021.

LI, Z L; LIU, J C; LIU, S B; LI, X Q; YI, D H; ZHAO, M G. Improvement of vascular function by acute and chronic treatment with the GPR30 agonist G1 in experimental diabetes mellitus. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e38787, 2012.

LINDSEY, S H; COHEN, J A; BROSNIHAN, K B; GALLAGHER, P E; CHAPPELL, M C. Chronic treatment with the G protein-coupled receptor 30 agonist G-1 decreases blood pressure in ovariectomized mRen2. Lewis rats. **Endocrinology**, v. 150, n. 8, p. 3753-3758, 2009.

LINDSEY, S H; CARVER, K A; PROSSNITZ, E R; CHAPPELL, M C. Vasodilation in response to the GPR30 agonist G-1 is not different from estradiol in the mRen2. Lewis female rat. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 57, n. 5, p. 598-603, 2011.

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

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

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

LUKSHA, L; NISELL, H; KUBLICKIENE, K. The mechanism of EDHF-mediated responses in subcutaneous small arteries from healthy pregnant women. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 286, n. 6, p. R1102-9, 2004.

LUO, W; LIU, B; ZHOU, Y. The endothelial cyclooxygenase pathway: Insights from mouse arteries. **European Journal of Pharmacology**, v. 780, p. 148–158, 2016.

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

MARÍN, J & RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, M A. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 75, n. 2, p. 111–34, 1997.

MARK, C J; TATCHUM-TALOM, R; MARTIN, D S; EYSTER, K M. Effects of estrogens and selective estrogen receptor modulators on vascular reactivity in the perfused mesenteric vascular bed. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 293, n. 5, p. R1969-R1975, 2007.

MÅRTENSSON, U E; SALEHI, S A; WINDAHL, S; GOMEZ, M F; SWÄRD, K; DASZKIEWICZ-NILSSON, J; WENDT, A; ANDERSSON, N; HELLSTRAND, P; GRÄNDE, P O; OWMAN, C; ROSEN, C J; ADAMO, M L; LUNDQUIST, I; RORSMAN, P; NILSSON, B O; OHLSSON, C; OLDE, B; LEEB-LUNDBERG, L M. Deletion of the G protein-coupled receptor 30 impairs glucose tolerance, reduces bone growth, increases blood pressure, and eliminates estradiol-stimulated insulin release in female mice. **Endocrinology**, v. 150, n. 2, p. 687-698, 2009.

MARTIN, D S & EYSTER, K M. Assessing Direct Vascular Actions of Estrogens. **Methods in Molecular Biology**, v. 1366, p. 533-548, 2016.

MARTINEZ-LEMUS, L A; HILL, M A; MEININGER, G A. The plastic nature of the vascular wall: a continuum of remodeling events contributing to control of arteriolar diameter and structure. **Physiology (Bethesda)**, v. 24, p. 45-57, 2009.

MARTINEZ-LEMUS, L A. The dynamic structure of arterioles. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, n. 1, p. 5-11, 2012.

MATA, K M; LI, W; RESLAN, O M; SIDDIQUI, W T; OPSASNICK, L A; KHALIL, R A. 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. H1679-96, 2015.

MATOBA, T; SHIMOKAWA, H; NAKASHIMA, M; HIRAKAWA, Y; MUKAI, Y; HIRANO, K; KANAIDE, H; TAKESHITA, A. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 12, p. 1521-1530, 2000.

MATTHEWS, J & GUSTAFSSON, J A. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. **Molecular Interventions**, v. 3, n. 5, p. 281-92, 2003.

MAZZUCA, M Q; MATA, K M; LI, W; RANGAN, S S; KHALIL, R A. Estrogen receptor subtypes mediate distinct microvascular dilation and reduction in [Ca²⁺]_i in mesenteric microvessels of female rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 352, n. 2, p. 291-304, 2015.

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

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

MEYER, M R & BARTON, M. ER α , ER β , and gpER: novel aspects of oestrogen receptor signalling in atherosclerosis. **Cardiovascular Research**, v.83, n. 4, p. 605-610, 2009.

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

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

MEYER, M R; AMANN, K; FIELD, A S; HU, C; HATHAWAY, H J; KANAGY, N L; WALKER, M K; BARTON, M; PROSSNITZ, E R. Deletion of G protein-coupled estrogen receptor increases endothelial vasoconstriction. **Hypertension**, v. 59, n. 2, p. 507-12, 2012a.

MEYER, M R; FIELD, A S; KANAGY, N L; BARTON, M; PROSSNITZ, E R. GPER regulates endothelin-dependent vascular tone and intracellular calcium. **Life Sciences**, v. 91, n. (13-14), p. 623-7, 2012b.

MEYER, M R; FREDETTE, N C; HOWARD, T A; HU, C; RAMESH, C; DANIEL, C; AMANN, K; ARTERBURN, J B; BARTON, M; PROSSNITZ, E R. G protein-coupled estrogen receptor protects from atherosclerosis. **Scientific Reports**, v. 4, n. 7564, p. 1-9, 2014.

MEYER, M R; FREDETTE, N C; BARTON, M; PROSSNITZ, E R. G protein-coupled estrogen receptor inhibits vascular prostanoid production and activity. **Journal of Endocrinology**, v. 227, n. 1, p. 61-9, 2015.

MEYER, M R; FREDETTE, N C; DANIEL, C; SHARMA, G; AMANN, K; ARTERBURN, J B; BARTON, M; PROSSNITZ, E R. Obligatory role for GPER in cardiovascular aging and disease. **Science Signaling**, v. 9, n. 452, p. ra105, 2016.

MEYER, M R; ROSEMANN, T; BARTON, M; PROSSNITZ, E R. GPER mediates functional endothelial aging in renal arteries. **Pharmacology**, v. 100, n. 3-4, p. 188-193, 2017.

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

MOLERO, L; GARCÍA-DURÁN, M; DIAZ-RECASENS, J; RICO, L; CASADO, S; LÓPEZ-FARRÉ, A. Expression of estrogen receptor subtypes and neuronal nitric oxide synthase in neutrophils from women and men: regulation by estrogen. **Cardiovascular Research**, v. 56, n. 1, p. 43-51, 2002.

MONCADA, S; PALMER, R M; HIGGS, E A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, n. 2, p. 109-42, 1991.

MONCADA, S; HIGGS, A; FURCHGOTT, R. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. **Pharmacological Reviews**, v. 49, n. 2, p. 137-42, 1997.

MOREAU, K L; DEANE, K D; MEDITZ, A L; KOHR, T W M. Tumor necrosis factor- α inhibition improves endothelial function and decreases arterial stiffness in estrogen-deficient postmenopausal women. **Atherosclerosis**, v. 230, p. 390–396, 2013a.

MOREAU, K L; STAUFFER, B L; KOHRT, W M; SEALS, D R. Essential role of estrogen for improvements in vascular endothelial function with endurance exercise in postmenopausal women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 98, p. 4507–4515, 2013b.

MORITA, I. Distinct functions of COX-1 and COX-2. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 68, n. 69, p. 165-75, 2002.

MOZAFFARIAN, D; BENJAMIN, E J; GO, A S; ARNETT, D K; BLAHA, M J; CUSHMAN, M; DAS, S R; FERRANTI, S; DESPRÉS, JEAN-PIERRE; FULLERTON, H J; HOWARD, V J; HUFFMAN, M D; ISASI, C R; JIMÉNEZ, M C; JUDD, S E; KISSELA, B M; LICHTMAN, J H; LISABETH, L D; LIU, S; MACKKEY, R H; MAGID, D J; MCGUIRE, D K; MOHLERIII, E R; MOY, C S; MUNTNER, P; MUSSOLINO, M E; NASIR, K; NEUMAR, R W; NICHOL, G; PALANIAPPAN, L; PANDEY, D K; REEVES, M J; RODRIGUEZ, C J; ROSAMOND, W; SORLIE, P D; STEIN, J; TOWFIGHI, A; TURAN, T N; VIRANI, S S; WOO, D; YEH, R W; TURNER, M B. Heart disease and stroke statistics—2016 update. **Circulation**, v. 133, n. 4, p. e38-e360, 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.

MUNGRUE, I N; HUSAIN, M; STEWART, D J. The role of NOS in heart failure: lessons from murine genetic models. **Heart Failure Reviews**, v. 7, n. 4, p. 407-22, 2002.

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

MURATA, T; DIETRICH, H H; XIANG, C; DACEY, R G JR. G Protein–Coupled Estrogen Receptor Agonist Improves Cerebral Microvascular Function After Hypoxia/Reoxygenation Injury in Male and Female Rats. **Stroke**, v. 44, n. 3, p. 779-785, 2013.

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

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

NAGAO, T & VANHOUTTE, P M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor and endothelium-dependent relaxations. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 8, n. 1, p. 1-6, 1993.

NAWATE, S; FUKAO, M; SAKUMA, I; SOMA, T; NAGAI, K; TAKIKAWA, O; MIWA, S; KITABATAKE, A. Reciprocal changes in endothelium-derived hyperpolarizing factor- and nitric oxide-system in the mesenteric artery of adult female rats following ovariectomy. **British Journal of Pharmacology**, v. 144, n. 2, p. 178-89, 2005.

NELSON, M T & QUAYLE, J M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 268, n. 4, p. C799–C822, 1995.

NEUGARTEN, J; DING, Q; FRIEDMAN, A; LEI, J; SILBIGER, S. Sex hormones and renal nitric oxide synthases. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 8, n. 8, p. 1240-6, 1997.

NILSSON, B O; EKBLAD, E; HEINE, T; GUSTAFSSON, J. Increased magnitude of relaxation to oestrogen in aorta from oestrogen receptor beta knock-out mice. **Journal of Endocrinology**, v. 166, n. 2, p. R5-R9, 2000.

OCARINO, N M; BOELONI, J N; GOES, A M; SILVA, J F; MARUBAYASHI, U; SERAKIDES, R. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from osteopenic rats subjected to physical activity with and without nitric oxide synthase inhibition. **Nitric Oxide**, v. 19, n. 4, p. 320-325, 2008.

OLDE, B & LEEB-LUNDBERG, L M. GPR30/GPER1: searching for a role in estrogen physiology. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 20, n. 8, p. 409–16, 2009.

OLIVEIRA, P W; DE SOUSA, G J; CALIMAN, I F; LAMAS, A Z; SANTOS DE MEDEIROS, A R; DE ANDRADE, T U; DE ABREU, G R; DE FIGUEIREDO, S G; BISSOLI, N S. Metformin ameliorates ovariectomy-induced vascular dysfunction in non-diabetic Wistar rats. **Clinical Science (Lond)**, v. 127, n. 4, p. 265-75, 2014.

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

OWMAN, C; BLAY, P; NILSSON, C; LOLAIT, S J. 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.

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

PACIFICI, R. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 11, p. 1043-51, 1996.

PALMER, R M; FERRIGE, A G; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 524–526, 1987.

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.

PATRONO, C. Cardiovascular effects of cyclooxygenase-2 inhibitors: a mechanistic and clinical perspective. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 82, n. 4, p. 957–964, 2016.

PEARSON, P J & VANHOUTTE, P M. Vasodilator and vasoconstrictor substances produced by the endothelium. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 122, p. 1-67, 1993.

PEIXOTO, P; AIRES, R D; LEMOS, V S; BISSOLI, N S; SANTOS, R L D. 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; DA SILVA, J F; AIRES, R D; COSTA, E D; LEMOS, V S; BISSOLI, N S; DOS SANTOS, R L. 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.

PETRIE, W K; DENNIS, M K; HU, C; DAI, D; ARTERBURN, J B; SMITH, H O; HATHAWAY, H J; PROSSNITZ, E R. G protein-coupled estrogen receptor-selective ligands modulate endometrial tumor growth. **Obstetrics and Gynecology International**, v. 2013, p. 472720, 2013.

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, 2011.

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

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

PROSSNITZ, E R. GPER modulators: Opportunity Nox on the heels of a class Akt. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 176, p. 73-81, 2018.

RAMADOSS, J; PASTORE, M B; MAGNESS, R R. Endothelial caveolar subcellular domain regulation of endothelial nitric oxide synthase. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 40, n. 11, p. 753-64, 2013.

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

REVANKAR, C M; CIMINO, D F; SKLAR, L A; ARTERBURN, J B; PROSSNITZ, E R. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. **Science**, v. 307, n. 5715, p. 1625-1630, 2005.

ROMERO, W G; DA SILVA, F B; BORGIO, M V; BISSOLI, N S; GOUVÊA, S A; ABREU, G R. Tamoxifen alters the plasma concentration of molecules associated with cardiovascular risk in women with breast cancer undergoing chemotherapy. **The Oncologist**, v. 17, n. 4, p. 499-507, 2012.

ROSENFELD, C R; WHITE, R E; ROY, T; COX, B E. Calcium-activated potassium channels and nitric oxide coregulate estrogen-induced vasodilation. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 279, n. 1, p. H319-H328, 2000.

ROSENTHAL, T & OPARIL, S. Hypertension in women. **Journal of Human Hypertension**, v. 14, p. 691–704, 2000.

RUBANYI, G M. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 22, n. 4, p. S1-14, 1993.

RUEHLMANN, D O; STEINERT, J R; VALVERDE, M A; JACOB, R; MANN, G E. Environmental estrogenic pollutants induce acute vascular relaxation by inhibiting L-type Ca²⁺ channels in smooth muscle cells. **The FASEB Journal**, v. 12, n. 7, p. 613-619, 1998.

RUSKO, J; LI, L; VANBREEMEN, C. 17- β -Estradiol stimulation of endothelial K⁺ channels. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 214, n. 2, p. 367-372, 1995.

RUSSELL, N & GROSSMANN, M. Mechanisms in endocrinology: Estradiol as a male hormone. **European Journal of Endocrinology**, v. 181, n. 1, p. R23-R43, 2019.

SAKAMOTO, H; MATSUDA, K; HOSOKAWA, K; NISHI, M; MORRIS, J F; PROSSNITZ, E R; KAWATA, M. Expression of G protein-coupled receptor-30, a G protein-coupled membrane estrogen receptor, in oxytocin neurons of the rat paraventricular and supraoptic nuclei. **Endocrinology**, v. 148, n. 12, p. 5842-5850, 2007.

SALOM, J B; BURGUETE, M C; PEREZ-ASENSIO, F J; CENTENO, J M; TORREGROSA, G; ALBORCH, E. Acute relaxant effects of 17-beta estradiol through non-genomic mechanisms in rabbit carotid artery. **Steroids**, v. 67, p. 339-346, 2002.

SANDOO, A; VAN ZANTEN, J J; METSIOS, G S; CARROLL, D; KITAS, G D. The endothelium and its role in regulating vascular tone. **The Open Cardiovascular Medicine Journal**, v. 4, n. 1, p. 302-312, 2010.

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

SANTOS, R L; ABREU, G R; BISSOLI, N S; MOYSÉS, M R. Endothelial mediators of 17 β -estradiol-induced coronary vasodilation in the isolated rat heart. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 4, p. 569-575, 2004.

SANTOS, R L; MARIN, E B; GONÇALVES, W L; BISSOLI, N S; ABREU, G R; MOYSÉS, M R. Sex differences in the coronary vasodilation induced by 17 β -oestradiol in the isolated perfused heart from spontaneously hypertensive rats. **Acta Physiologica**, v. 200, n. 3, p. 203-210, 2010.

SANTOS, R L; LIMA, J T; ROUVER, W N; MOYSÉS, M R. Deficiency of sex hormones does not affect 17- β -estradiol-induced coronary vasodilation in the isolated rat heart. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 5, p. 1-9, 2016.

SCALING, A L; PROSSNITZ, E R; HATHAWAY, H J. GPER mediates estrogen-induced signaling and proliferation in human breast epithelial cells and normal and malignant breast. **Hormones and Cancer**, v. 5, n. 3, p. 146-160, 2014.

SCHENKEL, P C; FERNANDES, R O; VIEGAS, V U; CAMPOS, C; FERNANDES, T R; ARAUJO, A S; BELLÓ-KLEIN, A. Catalase influence in the regulation of coronary resistance by estrogen: joint action of nitric oxide and hydrogen peroxide. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 159852, 2014.

SHARMA, G & PROSSNITZ, E R. Mechanisms of estradiol-induced insulin secretion by the G protein-coupled estrogen receptor GPR30/GPER in pancreatic beta-cells. **Endocrinology**, v. 152, n. 8, p. 3030-9, 2011.

SHERMAN, T S; CHAMBLISS, K L; GIBSON, L L; PACE, M C; MENDELSON, M E; PFISTER, S L; SHAUL, P W. Estrogen acutely activates prostacyclin synthesis in ovine fetal pulmonary artery endothelium. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 26, n. 5, p. 610-616, 2002.

SHIMOKAWA, H & MATOBA, T. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. **Pharmacological Research**, v. 49, n. 6, p. 543-549, 2004.

SHUFELT, C L; PACHECO, C; TWEET, M S; MILLER, V M. Sex-specific physiology and cardiovascular disease. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1065, p. 433-454, 2018.

SILVA, F B; ROMERO, W G; CARVALHO, A L; BORGIO, M V; AMORIM, M H; GOUVEA, S A; ABREU, G R. Hormone therapy with tamoxifen reduces plasma levels of NT-B-type natriuretic peptide but does not change ventricular ejection fraction after chemotherapy in women with breast cancer. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 2, p. 154-160, 2015.

SIMONCINI, T; HAFEZI-MOGHADAM, A; BRAZIL, D P; LEY, K; CHIN, W W; LIAO, J K. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. **Nature**, v. 407, n. 6803, p. 538-541, 2000.

SIMSEKYILMAZ, S; LIEHN, E A; MILITARU, C; VOGT, F. Progress in interventional cardiology: challenges for the future. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 113, n. 3, p. 464-472, 2015.

SMITH, W L; GARAVITO, R M; DEWITT, D L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 52, p. 33157-60, 1996.

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 Communication**, v. 34, p. 141-7, 1969.

STORK, S; VAN DER SCHOUW, Y T; GROBBEE, D E; BOTS, M L. Estrogen, inflammation and cardiovascular risk in women: a critical appraisal. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 15, p. 66–72, 2004.

STREHLOW, K; ROTTER, S; WASSMANN, S; ADAM, O; GROHE, C; LAUFS, K; BOHM, M; NICKENIG, G. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. **Circulation Research**, v. 93, p. 170–177, 2003.

SUDHIR, K; CHOU, T M; MULLEN, W L; HAUSMANN, D; COLLINS, P; YOCK, P G; CHATTERJEE, K. Mechanisms of estrogen-induced vasodilation: in vivo studies in canine coronary conductance and resistance arteries. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 26, n. 3, p. 807-814, 1995.

TAKADA, Y; KATO, C; KONDO, S; KORENAGA, R; ANDO, J. Cloning of cDNAs encoding G protein-coupled receptor expressed in human endothelial cells exposed to fluid shear stress. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 240, n. 3, p. 737-741, 1997.

TALWAR, G P; SEGAL, S J; EVANS A; DAVIDSON, O W. The binding of estradiol in the uterus: a mechanism for depression of RNA synthesis. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 52, p. 1059–1066, 1964.

TEOH, H; QUAN, A; LEUNG, S W; MAN, R Y. Differential effects of 17 beta-estradiol and testosterone on the contractile responses of porcine coronary arteries. **British Journal of Pharmacology**, v. 129, p. 1301-1308, 2000.

TEP-AREENAN, P; KENDALL, D A; RANDALL, M D. Mechanisms of vasorelaxation to 17 β -oestradiol in rat arteries. **European Journal of Pharmacology**, v. 476, n. 1, p. 139-149, 2003.

THOMAS, D D; RIDNOUR, L A; ISENBERG, J S; FLORES-SANTANA, W; SWITZER, C H; DONZELLI, S; HUSSAIN, P; VECOLI, C; PAOLOCCI, N; AMBS, S; COLTON, C A; HARRIS, C C; ROBERTS, D D; WINK, D A. The chemical biology of nitric oxide: Implications in cellular signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, n. 1, p. 18–31, 2008.

THOMAS, P; PANG, Y; FILARDO, E J; DONG, J. Identity of an Estrogen Membrane Receptor Coupled to a G Protein in Human Breast Cancer Cells. **Endocrinology**, v. 146, n. 2, p. 624–632, 2005.

TICA, A A; DUN, E C; TICA, O S; GAO, X; ARTERBURN, J B; BRAILOIU, G C; OPREA, T I; BRAILOIU, E. G protein-coupled estrogen receptor 1-mediated effects in the rat myometrium. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 301, n. 5, p. C1262-9, 2011.

TOUYZ, R M; ALVES-LOPES, R; RIOS, F J; CAMARGO, L L; ANAGNOSTOPOULOU, A; ARNER, A; MONTEZANO, A C. Vascular smooth muscle contraction in hypertension. **Cardiovascular Research**, v. 114, n. 4, p. 529-539, 2018.

TROPEA, T; DE FRANCESCO, E M; RIGIRACCILO, D; MAGGIOLINI, M; WAREING, M; OSOL, G; MANDALÀ, M. Pregnancy Augments G Protein Estrogen Receptor (GPER) Induced Vasodilation in Rat Uterine Arteries via the Nitric Oxide-cGMP Signaling Pathway. **PloS One**, v. 10, n. 11, p. 1-9, 2015.

TUNSTALL-PEDOE, H; KUULASMAA, K; AMOUYEL, P; ARVEILER, D; RAJAKANGAS, A M; PAJAK, A. Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization MONICA Project. Registration procedures, event rates, and case-fatality rates in 38 populations from 21 countries in four continents. **Circulation**, v. 90, p. 583–612, 1994.

URAKAMI-HARASAWA, L; SHIMOKAWA, H; NAKASHIMA, M; EGASHIRA, K; TAKESHITA, A. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 11, p. 2793–2799, 1997.

USSELMAN, C W; STACHENFELD, N S; BENDER, J R. The molecular actions of oestrogen in the regulation of vascular health. **Experimental Physiology**, v. 101, n. 3, p. 356-61, 2016.

VALVERDE, M A; ROJAS, P; AMIGO, J; COSMELLI, D; ORIO, P; BAHAMONDE, M I; MANN, G E; VERGARA, C; LATORRE, R. Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the β subunit. **Science**, v. 285, n. 5435, p. 1929-1931, 1999.

VANHOUTTE, P M; SHIMOKAWA, H; FELETOU, M; TANG, E H. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. **Acta Physiologica (Oxf)**, v. 219, n. 1, p. 22-96, 2017.

VERA-ARZAVE, C; PACHECO-YEPEZ, J; MEJÍA-BARRADAS, C M; CÁRDENAS-JARAMILLO, L M; CAMPOS-RODRÍGUEZ, R; ABARCA-ROJANO, E. 17β -estradiol replacement therapy induces eNOS, nNOS and estrogen receptor β in hypophysectomized rats with inflamed footpads. **Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents**, v. 33, n. 5, p. 1395-1403, 2019.

VOGEL, B; ACEVEDO, M; APPELMAN, Y; BAIREY MERZ, C N; CHIEFFO, A; FIGTREE, G A; GUERRERO, M; KUNADIAN, V; LAM, C S P; MAAS, A H E M; MIHAILIDOU, A S; OLSZANECKA, A; POOLE, J E; SALDARRIAGA, C; SAW, J; ZÜHLKE, L; MEHRAN, R. The Lancet women and cardiovascular disease Commission: reducing the global burden by 2030. **Lancet**, v. 397, n. 10292, p. 2385-2438, 2021.

VURAL, P; CANBAZ, M; AKGUL, C. Effects of menopause and postmenopausal tibolone treatment on plasma TNF- α , IL-4, IL-10, IL-12 cytokine pattern and some bone turnover markers. **Pharmacological Research**, v. 53, p. 367-71, 2006.

WEINER, C P; LIZASOAIN, I; BAYLIS, S A; KNOWLES, R G; CHARLES, I G; MONCADA, S. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 11, p. 5212-5216, 1994.

WOOLFSON, R G & POSTON, L. Effect of NG-monomethyl-L-arginine on endothelium-dependent relaxation of human subcutaneous resistance arteries. **Clinical Science (London, England: 1979)**, v. 79, n. 3, p. 273–8, 1990.

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

YU, X; MA, H; BARMAN, S A; LIU, A T; SELLERS, M; STALLONE, J N; PROSSNITZ, E R; WHITE, R E; HAN, G. 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, 2011.

ZHANG, X P & HINTZE, T H. cAMP signal transduction induces eNOS activation by promoting PKB phosphorylation. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 290, n. 6, p. H2376-84, 2006.

ZHAO, W; ZHANG, J; LU, Y; WANG, R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 21, p. 6008–6016, 2001.

ZHOU, L & ZHU, D Y. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. **Nitric Oxide**, v. 20, n. 4, p. 223-30, 2009.

ZIMMERMAN, M A; BUDISH, R A; KASHYAP, S; LINDSEY, S H. GPER-novel membrane oestrogen receptor. **Clinical Science (London, England: 1979)**, v. 130, n. 12, p. 1005-16, 2016.

ZYGMUNT, P M; EDWARDS, G; WESTON, A H; LARSSON, B; HÖGESTÄTT, E D. Involvement of voltage-dependent potassium channels in the EDHF-mediated relaxation of rat hepatic artery. **British Journal of Pharmacology**, v. 121, n. 1, p. 141-149, 1997.

WALFORD, G & LOSCALZO, J. Nitric oxide in vascular biology. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 1, n. 10, p. 2112-8, 2003.

WANG, Q; YANG, M; XU, H; YU, J. Tetrahydrobiopterin improves endothelial function in cardiovascular disease: a systematic review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1-7, 2014.

WEIßENBORN, C; IGNATOV, T; OCHEL, H J; COSTA, S D; ZENCLUSSEN, A C; IGNATOVA, Z; IGNATOV, A. GPER functions as a tumor suppressor in triple-negative breast cancer cells. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 140, n. 5, p. 713-23, 2014.

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