



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

**EFEITOS DO ESTRADIOL MEDIADOS PELO GPER NA  
HIPERTROFIA DE CARDIOMIÓCITOS INDUZIDA POR  
ENDOTELINA-1**

**GLEISY KELLY NEVES GONÇALVES**

**Orientadora:** Profa. Dra. Adelina Martha dos Reis

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Silvia Carolina Guatimosim Fonseca

Belo Horizonte, MG

2016

**GLEISY KELLY NEVES GONÇALVES**

**EFEITOS DO ESTRADIOL MEDIADOS PELO GPER NA  
HIPERTROFIA DE CARDIOMIÓCITOS INDUZIDA POR  
ENDOTELINA-1**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito obrigatório para obtenção do título de doutor.

Belo Horizonte, MG

2016

*Dedico a minha família*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me mostrar que a vida é repleta de sentidos que não se explicam meramente pelo sucesso de um trabalho, mas também, pela beleza do trabalho humano e das relações que construímos nesse processo. Assim, concluo que o principal ganho que obtive no meu doutorado foi imaterial: as vivências e amizades!

A minha família, por todo apoio em todos os momentos da minha vida.

Ao meu marido, Thiago Henrique, pelo amor, apoio, companheirismo e incentivos em todos os momentos. Nosso caminho, juntos, me fez acreditar que existem inúmeras possibilidades de realização e que muitas vezes, somente o amor do outro nos faz enxergar esses caminhos.

A Professora Adelina Martha dos Reis, orientadora deste trabalho, pelo empenho e sabedoria que sempre me dedicou ao longo dos 4 anos e mesmo antes, quando nas disciplinas do mestrado, nem imaginávamos que estaria nessa condição de orientadora e orientanda. Obrigada por ter me acolhido em um período em que eu tive poucas oportunidades e sem muitas crenças de ingressar no doutorado. Obrigada por ter me incentivado a me inscrever no doutorado e ter aceito me orientar. Certamente, mudou para melhor o caminho percorrido em minha vida!

A Professora Silvia Guatimosim, co-orientadora tão presente e empenhada na pesquisa científica. Suas instruções contribuíram efetivamente para este trabalho. Seu exemplo de profissional ativa e participativa em nosso departamento me fizeram aprender tantas coisas! Sou imensamente grata pelo seu apoio!

Aos alunos do laboratório Eletrocel, pelo acolhimento e momentos tão divertidos que me proporcionaram durante a caminhada. Aos colegas representantes discentes, pelo companheirismo e aprendizado desenvolvidos durante nossa atuação no Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia (2015/2016).

Aos Professores Candido Coimbra, Raphael Szawka e Maristela Poletini, pelos aprendizados diretos e indiretos que me proporcionaram. Pelo apoio nas rotinas laboratoriais e pelos momentos em que também compartilhamos vitórias.

A Simone Pio, nossa técnica, que tanto nos apoia, tanto nos auxilia na nossa rotina e tanto contribui para a organização do laboratório de Endocrinologia e Metabolismo. Obrigada por tudo, saiba que te admiro muito e vejo em sua função um valor imenso!

Aos alunos da Professora Adelina – Cristina e Fernanda Machado, irmãs tão queridas que ganhei!! Fernandinha e Luis Felipe, pelo pouco tempo de convivência, mas, sobretudo pelo carinho que recebi de vocês. Obrigada pela convivência e pelo apoio que me deram nas minhas atividades e também, por terem permitido minha participação no trabalho de vocês.

Aos alunos do Raphael - Anita (Ana Clara), Dani, Laíza, Naiara Aquino, Juneo Freitas, Patrícia Costa e Roberta, agradeço pelos momentos de trocas e em que sorrimos juntos!

As alunas da Maristela - Nayara Horta, Paola, Flávia, Thaís Santana, pelo apoio e troca de experiências tão presentes em nosso dia a dia.

Aos alunos do Candido - Frederico Sander, Helton, Lucas, Mateus, Paulo Marcelo e Quézia. Obrigada pelo companheirismo e amizade que, certamente contribuíram para que eu me sentisse acolhida no laboratório.

## **AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO**

Este trabalho contou com o suporte financeiro das seguintes agências de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

**“Ser feliz é encontrar força no perdão,  
esperanças nas batalhas,  
segurança no palco do medo,  
amor nos desencontros.  
É agradecer a Deus a cada minuto pelo milagre da vida.”  
(Fernando Pessoa)**

## RESUMO

Estudos anteriores demonstraram que o 17 $\beta$ -estradiol (E2) previne a hipertrofia cardíaca em fêmeas. Estas ações cardioprotetoras exercidas pelo E2 têm sido principalmente relacionadas com a atividade dos receptores de estrógeno do tipo alfa (ER $\alpha$ ) e beta (ER $\beta$ ). Desde 2005, o *G protein-coupled estrogen receptor 1* (GPER1), o receptor de membrana do E2, tem sido estudado e identificado como mediador de diversas ações estrogênicas do E2 em modelos *in vivo* e *in vitro*. No entanto, os mecanismos através dos quais o GPER1 exerce suas ações estrogênicas em cardiomiócitos ainda são pouco conhecidos. Neste trabalho, nós investigamos a participação do GPER1 nas ações anti-hipertróficas exercidas pelo E2 em um modelo de indução de hipertrofia do cardiomiócito induzida pela endotelina-1 (ET-1). Para a realização deste estudo, utilizamos a metodologia do cultivo de cardiomiócitos de ratas neonatas fêmeas com 1-3 dias de vida. Os cardiomiócitos foram isolados e tratados com ET-1 (100 nmol/L) durante 48 h na presença ou ausência de E2 (10 nmol/L), antagonistas do GPER1 (G15 ou G36) ou agonista do GPER1 (G1) (10 nmol/L). Ao final do protocolo de tratamento, as células foram utilizadas para análise da frequência de contração, amplitude de mobilidade da membrana, Western blot, RT-PCR e imunofluorescência. O tratamento com ET-1 foi capaz de produzir um aumento significativo na área de superfície dos cardiomiócitos e esta resposta foi associada com o aumento dos níveis de expressão de mRNA para peptídeo natriurético atrial (ANP) e peptídeo natriurético do tipo B (BNP). O tratamento com o E2 a 10 nM preveniu o desenvolvimento de hipertrofia dos cardiomiócitos tratados com ET-1 e ainda, uma redução na expressão do ANP e BNP. Esses efeitos mediados pelo E2, foram bloqueados com o pré tratamento das células com o antagonista do GPER1 (G15). Efeito similar ao E2 na atividade anti-hipertrófica foi observada, quando os cardiomiócitos foram pré tratados com G1, o agonista do GPER1. Notavelmente, as análises dos dados apontaram para a participação do GPER1 na atividade anti-hipertrófica exercida pelo E2. Esse efeito foi comprovado com a técnica de silenciamento do GPER1 (siRNA), que mostrou um bloqueio parcial da atividade anti-hipertrófica do E2 quando o GPER1 foi silenciado em 65%. O tratamento dos cardiomiócitos com E2 foi capaz de reverter a redução da frequência de contração induzida pela ET-1, um efeito que foi independente do GPER1. Apesar disso, o GPER1 participou na redução da amplitude de contração da membrana induzida pelo E2. A ET-1 levou a um aumento na translocação nuclear da *G protein-coupled receptor kinase 5* (GRK5), uma quinase relacionada a ativação de genes hipertróficos. O pré tratamento com E2 O E2 foi capaz de prevenir esse aumento na translocação da GRK5, um efeito independente do GPER1. O tratamento com ET-1 resultou no aumento da fosforilação da *Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2* (ERK 1/2), um efeito que foi revertido pelo tratamento com E2 ou G1 e que foi abolido quando as células foram tratadas com G15. Da mesma forma, o pré tratamento com E2 reverteu a diminuição nos níveis de Akt fosforilada e da sua proteína ativadora a *Phosphoinositide-dependent kinase-1* (PDK1), induzida por ET-1, e esse efeito foi mediado pelo GPER1. Em conclusão, o GPER1 desempenha um papel importante na atividade anti-hipertrófica do E2 em cardiomiócitos, prevenindo a ativação de vias hipertróficas e estimulando vias de sobrevivência celular. Os dados sugerem que o GPER1 pode ser considerado como estratégia para a compreensão das ações cardioprotetoras não genômicas do E2 na condição de hipertrofia do cardiomiócito.

Palavras-chave: GPER1; Estradiol; Hipertrofia; Cardiomiócito.

## ABSTRACT

Previous studies have shown that 17 $\beta$ -estradiol (E2) prevents cardiac hypertrophy in females. These cardioprotective actions exerted by E2 have been mainly related to activity of estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) and beta (ER $\beta$ ). Since 2005, the G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER1), an E2 membrane receptor, has been studied and identified as a mediator of many estrogenic actions of E2 in vivo and in vitro models. However, the mechanisms by which the GPER1 exerts its estrogenic actions in cardiomyocytes are still poorly known. In this work, we investigated the participation of GPER1 on anti-hypertrophic actions performed by E2 in cardiomyocyte hypertrophy endothelin-1(ET-1)-induced. To perform this study, we used cardiomyocytes culture methodology of neonate female rats with 1-3 days life. Cardiomyocytes were isolated and treated with ET-1 (100 nmol/L) for 48 h in the presence or absence of E2 (10 nmol/L), GPER1 antagonists (G15 or G36) or agonist GPER1 (G1) (10 nmol/L). At the end of treatment protocol, the cells were used to analyze the frequency of contraction, mobility range of membrane, Western blot, RT-PCR and immunofluorescence. The treatment with ET-1 was able to produce a significant increase in surface area of cardiomyocytes and this response was associated with increased mRNA expression levels of atrial natriuretic peptide (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP). Treatment with 10 nM E2 prevented the development of cardiomyocytes hypertrophy of cells treated with ET-1 and also a reduction in the expression of ANP and BNP. These effects mediated by E2 were blocked with pretreatment of the cells with the antagonist GPER1 (G15). A similar effect of E2 in the anti-hypertrophic activity was observed when the cardiomyocytes were pretreated with G1, the GPER1 agonist. Notably, the analyzes of the data pointed to the participation of GPER1 in anti-hypertrophic activity exerted by E2. This effect was proven by the silencing technique GPER1 (siRNA), which showed a partial blockage of the anti-hypertrophic activity of E2 when GPER1 was silenced by 65%. Treatment of cardiomyocytes with E2 was able to reverse the reduction in the contraction frequency induced by ET-1, an effect that was independent of GPER1. Nevertheless, GPER1 participated in reducing membrane amplitude of contractions E2-induced. ET-1 led to an increase in the nuclear translocation of G protein-coupled receptor kinase 5 (GRK5), a kinase related to activation of hypertrophic genes. The pre-treatment with E2 was able to prevent the increase in GRK5 translocation, an independent effect of GPER1. The ET-1 treatment resulted in increased phosphorylation of Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 (ERK 1/2), an effect reversed by treatment with E2 and G1 and abolished when cells were treated with G15. Likewise, pretreatment with E2 reversed the decreased levels of phosphorylated Akt and its activating protein Phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) induced by ET-1, and this effect was mediated by GPER1. In conclusion, the GPER1 plays an important role in the anti-hypertrophic activity of E2 in cardiomyocytes, preventing activation of hypertrophic pathways and stimulating cell survival pathways. The data suggest that GPER1 can be considered as a strategy for understanding non-genomic cardioprotective actions of E2 in a cardiomyocyte hypertrophy condition.

Key words: GPER1; Estradiol; Hypertrophy; Cardiomyocyte.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DA LITERATURA:

<b>Figura 1.</b> Mecanismos de ação do E2 iniciados por diferentes vias de sinalização dos receptores.....	22
<b>Figura 2.</b> Vias de sinalização genômicas e não genômicas ativadas pelo estradiol.....	25

### MATERIAL E MÉTODOS:

<b>Figura 3.</b> Protocolo Experimental 1.....	34
<b>Figura 4.</b> Protocolo Experimental 2.....	35
<b>Figura 5.</b> Protocolo Experimental 3.....	36

### RESULTADOS:

<b>Figura 6.</b> Antagonista do GPER1, G15, reverte o efeito anti-hipertrófico do E2 em cardiomiócitos.....	44
<b>Figura 7.</b> Participação dos peptídeos natriuréticos ANP e BNP na hipertrofia induzida por ET-1.....	45
<b>Figura 8.</b> Contribuição do E2 na reversão da sinalização de vias hipertróficas.....	48
<b>Figura 9.</b> E2 reverte o aumento da fosforilação da ERK1/2 induzida pela ET-1.....	49
<b>Figura 10.</b> Sinalização protetora do E2 aumenta a expressão da pAkt e é dependente do GPER1.....	50
<b>Figura 11.</b> Aumento da expressão da pPDK1 pelo tratamento com E2 é dependente do GPER1.....	51
<b>Figura 12.</b> E2 reverte a diminuição da frequência de contração induzida pela ET-1 em cardiomiócitos.....	53

<b>Figura 13.</b> G15 previne downregulation do GPER1 induzida pelo tratamento com E2 em cardiomiócitos tratados com ET-1.....	55
<b>Figura 14.</b> Agonista do GPER1, G1, reverte o efeito hipertrófico da ET-1 em cardiomiócitos.....	58
<b>Figura 15.</b> Agonista do GPER1 reverte o aumento da fosforilação da ERK1/2 induzida pela ET-1.....	60
<b>Figura 16.</b> Redução da expressão pAkt induzida pela ET-1 não foi alterada pelo tratamento com G1.....	61
<b>Figura 17.</b> Análise da expressão do mRNA para definição do melhor alvo para silenciamento do GPER1.....	63
<b>Figura 18.</b> O silenciamento do GPER1 reverte a ação anti-hipertrófica do E2.....	64
<b>Figura 19.</b> Esquema proposto para as vias envolvidas nas ações mediadas pelo eixo E2-GPER1.....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang-II	Angiotensin-II
AMPC	Cyclic Adenosin Monophosphate
ANP	Atrial Natriuretic Peptide
BNP	B type Natriuretic Peptide
E2	17 $\beta$ -estradiol
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ER $\alpha$	Estradiol Receptor Alpha
ER $\beta$	Estradiol Receptor Beta
ERE	DNA response elements
ERK 1/2	Extracellular signal–regulated kinases 1/2
ET <sub>A</sub>	ET-1 receptor type A
ET <sub>B</sub>	ET-1 receptor type B
ET-1	Endothelin-1
G1	GPER1 agonist
G15	GPER1 antagonist
G36	GPER1 antagonist
G <sub>i</sub>	Heterotrimeric G protein subunit that inhibits the production of cAMP
G <sub>q</sub>	Heterotrimeric G protein subunit that activates phospholipase C ( PLC)
GF	Growth factors
GRK	G protein-coupled receptor kinase
GPER1	G protein-coupled estrogen receptor 1
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HDAC	Histone deacetylase proteins
IGF-1	Insulin-like growth factor type 1
JNK	c-Jun N-terminal kinase
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase

$\alpha$ MHC	$\alpha$ -miosin heavy chain
$\beta$ MHC	$\beta$ -miosin heavy chain
NFAT	Nuclear factor of activated T-cell
NNT	Nanotube
NO	Nitric Oxyde
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase-1
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKA	Protein kinase A
PKB	Protein kinase B
PKC	Protein kinase C
siRNA	small interfering RNA

## SUMÁRIO

<b>1 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
1.1 HIPERTROFIA CARDÍACA PATOLÓGICA COMO CONDIÇÃO PRÉVIA PARA AS DOENÇAS CARDIOVASCULARES.....	15
1.2 VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA HIPERTROFIA CARDÍACA.....	17
1.3 ESTRADIOL E SUAS AÇÕES NO SISTEMA CARDIOVASCULAR.....	20
1.4 GPER1: ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR NO SISTEMA CARDIOVASCULAR...24	
<b>2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
3.1 CULTURA CELULAR DE CARDIOMIÓCITOS E TRATAMENTO DAS CÉLULAS.....	32
3.1.1 DIA 1 DE CULTIVO CELULAR.....	32
3.1.2 DIA 2 DE CULTIVO CELULAR.....	33
3.1.3 DIA 3 DE CULTIVO CELULAR.....	33
3.1.4 DIA 5 DE CULTIVO CELULAR.....	33
3.2 PREPARO DO RNA DE INTERFERÊNCIA (siRNA).....	35

3.3	IMUNOFLUORESCÊNCIA E MEDIDA DA ÁREA CELULAR.....	37
3.4	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RNA MENSAGEIRO POR <i>quantitative real-time PCR</i> (qPCR).....	37
3.4.1	EXTRAÇÃO DO RNAm.....	38
3.4.2	SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR (cDNA) – TRANSCRIÇÃO REVERSA.....	38
3.4.3	qPCR.....	39
3.5	ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA POR <i>Western Blot</i> .....	39
3.6	FREQUÊNCIA DE CONTRAÇÃO DOS CARDIOMIÓCITOS.....	40
3.7	AMPLITUDE DE CONTRAÇÃO DA MEMBRANA DO CARDIOMIÓCITO.....	41
3.8	DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
4.1	ANTAGONISTA DO GPER1 REVERTE O EFEITO DO ESTRADIOL NA HIPERTROFIA DE CARDIOMIÓCITOS INDUZIDA PELA ENDOTELINA 1 (ET-1).....	43
4.1.1	AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS E MARCADORES DE HIPERTROFIA.....	43
4.1.2	VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA HIPERTROFIA DE CARDIOMIÓCITOS: BLOQUEIO DO EFEITO DO ESTRADIOL POR G15.....	47
4.1.3	CONTRATILIDADE DOS CARDIOMIÓCITOS TRATADOS COM ET-1 E EFEITOS DO E2.....	53
4.1.4	IMUNOLocalização DO GPER1 EM CARDIOMIÓCITOS.....	56

4.2 ATIVAÇÃO DO GPER1 PELO AGONISTA G1 REVERTE A HIPERTROFIA DE CARDIOMIÓCITOS INDUZIDA PELA ENDOTELINA 1 (ET-1).....	58
4.2.1 PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS DE CARDIOMIÓCITOS ATIVADOS POR G1).....	58
4.2.2 VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA HIPERTROFIA DE CARDIOMIÓCITOS: EFEITO DO G1.....	60
4.3. SILENCIAMENTO DO GPER1 POR RNA DE INTERFERÊNCIA (siRNA) REVERTE O EFEITO DE E2 NA HIPERTROFIA DE CARDIOMIÓCITOS INDUZIDA PELA ENDOTELINA 1 (ET-1).....	63
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>79</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>80</b>

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

Há mais de uma década, as doenças cardiovasculares permanecem na liderança entre as dez principais causas de morte no mundo (WHO, 2014). Uma parcela importante dos pacientes com doenças cardiovasculares convive com fatores de risco como sobrepeso e níveis elevados de pressão arterial por um período longo de suas vidas (WHO, 2009). Estes fatores levam ao processo de remodelamento cardíaco, que se manifesta principalmente pelo aumento da massa ventricular. Esta condição clínica, denominada hipertrofia cardíaca, desencadeia adaptações morfofuncionais no miocárdio que, ao longo de anos, resultam em situações patológicas como a insuficiência cardíaca (SHIMIZU; MINAMINO, 2016).

Em uma abordagem mais específica, considerando os mecanismos ativados no cardiomiócito para o aumento de sua área, torna-se importante o estudo de vias que possam modular este processo. Apesar desse campo de pesquisa ser vasto, trabalhos recentes mostram novas vias de sinalização envolvidas na hipertrofia do cardiomiócito.

Os hormônios sexuais femininos, principalmente o  $17\beta$ -estradiol (E2) apresentam efeitos cardioprotetores (ALLEN; EVANS; SUTTON, 2016). A descoberta de receptores de E2 não considerados em estudos anteriores abre novas perspectivas de estudo. O *G protein-coupled estrogen receptor 1* (GPER1) é um receptor de membrana ativado pelo E2 e considerado atualmente como importante mediador de seus efeitos (MENZA; MURPHY, 2016; PROSSNITZ; BARTON, 2009). Para compreender o envolvimento desta via na hipertrofia do cardiomiócito, torna-se necessário contextualizar e relacionar o eixo E2-GPER1 com os mecanismos que levam a hipertrofia cardíaca, considerando suas ações no sistema cardiovascular.

### 1.1 HIPERTROFIA CARDÍACA PATOLÓGICA COMO CONDIÇÃO PRÉVIA PARA AS DOENÇAS CARDIOVASCULARES

A hipertrofia do miocárdio é definida como um aumento na massa ventricular que na prática clínica e em estudos com animais é mensurado pela espessura septal e parede posterior

do ventrículo esquerdo no final da diástole (HEINZEL et al., 2015). A hipertrofia cardíaca também se desenvolve no coração de atletas, no entanto, nesses casos não há prejuízo da função ventricular e não está associada ao aumento de fibrose (CASELLI et al., 2015; COLAN et al., 1985).

A transição da hipertrofia fisiológica para a patológica tem sido alvo das pesquisas mais recentes. Já foi demonstrado que na hipertrofia fisiológica ocorre aumento dos níveis do hormônio do crescimento e do *Insulin-like growth factor type 1* (IGF-1) (KOZIRIS et al., 1999) promovendo o crescimento do cardiomiócito, mas, também, sua sobrevivência através da ativação da via *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K) (PRETORIUS et al., 2008).

A hipertrofia cardíaca patológica é considerada no campo clínico como um fator de risco independente para as doenças cardiovasculares (HAIDER et al., 1998). Seu desenvolvimento leva, além do aumento no tamanho dos cardiomiócitos, também a ativação local do processo de fibrose e regulação de células do sistema imunológico (FRIELER; MORTENSEN, 2015; HEYMANS et al., 2013). Em conjunto, o aumento na deposição de matriz extracelular e na ativação de fatores de crescimento culminam com o aumento da massa ventricular, mais comumente do ventrículo esquerdo, e alterações na função cardíaca. Dentre as doenças cardiovasculares associadas com a hipertrofia cardíaca destacam-se a insuficiência cardíaca, as arritmias e a morte súbita (ARO et al., 2016; VOISIN; PRÖBSTL; NOURSHARGH, 2010).

O aumento da massa ventricular associada ou não a redução da fração de ejeção piora significativamente o prognóstico. Existe assim, forte associação entre o número de pacientes com disfunção cardíaca secundária ao remodelamento patológico e a presença de hipertrofia cardíaca nestes. Existem três categorias de classificação para a hipertrofia ventricular esquerda: remodelamento concêntrico (aumento da massa do miocárdio e espessura da parede ventricular normal), hipertrofia concêntrica (espessura da parede ventricular aumentada com diâmetro interno da câmara ventricular normal) e hipertrofia excêntrica (espessura da parede ventricular aumentada com aumento do diâmetro interno da câmara ventricular) (LANG et al., 2005).

Estudos experimentais e clínicos têm estabelecido diferenças no padrão da hipertrofia ventricular esquerda em relação ao gênero (LEINWAND, 2003). Em condições de sobrecarga pressórica (como na hipertensão ou estenose aórtica), foi observado que homens exibem dilatação ventricular esquerda ou hipertrofia excêntrica. Já os corações de mulheres tendem a manter o tamanho de suas câmaras normais, mas apresentaram aumento na espessura da parede consistente com hipertrofia concêntrica (HAYWARD; KELLY; COLLINS, 2000; KRUMHOLZ; LARSON; LEVY, 1993). O *Framingham Heart Study* demonstrou que, independente do padrão de hipertrofia desenvolvido, o aumento da massa ventricular foi considerado fator de risco para as doenças cardiovasculares (HAIDER et al., 1998; LEVY, 1991).

Em modelos animais, estudos que usaram como estratégia a interferência na cascata de sinalização da via hipertrófica resultaram em melhora da função ventricular esquerda e da sobrevivência (ESPOSITO et al., 2002; HILL et al., 2000). A perda ou alteração da função contrátil em cardiomiócitos contribui para a relação causa-efeito entre a hipertrofia cardíaca e a insuficiência cardíaca sintomática. Este fenótipo, associado com a fibrose e menor complacência cardíaca, têm sido considerado como responsável pela menor competência cronotrópica (LAM et al., 2010) na hipertrofia cardíaca.

Assim, fica claro que pesquisas envolvendo a condição hipertrófica do miocárdio (modelos *in vivo*) ou do cardiomiócito (*in vitro*) contribuem para a compreensão dos mecanismos etiológicos e patológicos da hipertrofia enquanto condição prévia para as doenças cardiovasculares.

## **1.2 VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA HIPERTROFIA CARDÍACA**

A hipertensão arterial, enquanto condição de sobrecarga pressórica para o miocárdio, está entre os principais estímulos para a hipertrofia cardíaca e sua incidência é alta em pacientes com insuficiência cardíaca sintomática. O citoesqueleto intracelular funciona como o ambiente mecânico que favorece a transdução de sinais extracelulares mediado pela integrinas. Essas integrinas, localizadas na membrana celular conectam-se a filamentos de actina através de proteínas intermediárias como a vinculina, talina e  $\alpha$ -actinina em sítios na

membrana celular chamados de complexo de adesão focal. Com a deformação da membrana celular, conseqüente ao estímulo mecânico (hipertensão arterial), a agregação das integrinas leva a um aumento na fosforilação em resíduos tirosina de enzimas (tais como a Src e Fak) e a ativação de vias ativadoras de proteínas celulares responsáveis pela sinalização na malha de actina (KORNBERG et al., 1992). Esses sítios podem ser responsáveis pela transdução de forças e iniciar a ativação de mecanismos intracelulares responsáveis pela hipertrofia celular.

Além da via de mecanotransdução para a ativação da hipertrofia, fatores circulantes tais como endotelina-1 (ET-1) (LI et al., 2016a, 2016b) e angiotensina-II (Ang-II) (GOMES et al., 2010) são capazes de estimular a hipertrofia de cardiomiócitos. A família das endotelinas, é constituída por peptídeos vasoativos e a ET-1 se destaca pela capacidade de promover hipertrofia de miócitos cardíacos através de sua ligação a receptores de ET-1 do tipo A (ET<sub>A</sub>) (BUPHA-INTR; HAIZLIP; JANSSEN, 2012; SHUBEITA et al., 1990). O aumento dos níveis de ET-1 durante condições de sobrecarga pressórica levou a uma série de estudos relacionando seus efeitos com a hipertrofia cardíaca descompensada.

Dentre os principais efeitos celulares da ET-1 estão aumento da área celular dos cardiomiócitos, miofibrinogênese, aumento na reexpressão de genes fetais como peptídeo natriurético atrial (ANP) / peptídeo natriurético do tipo B (BNP),  $\beta$ -myosin heavy chain ( $\beta$ -MHC) e  $\alpha$ -actina, dentre outros (SUGDEN, 2002).

As ações da ET-1 ocorrem principalmente através da via diacilglicerol-proteína quinase C (PKC) e a cascata de sinalização via 3 *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). A ativação da via MAPK pela ET-1 promove aumento significativo na expressão da cascata *extracellular signal-regulated kinase 1/2* (ERK1/2) mas, também, nas cascatas *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) e p38-MAPK. Os eventos necessários para ativação da ERK1/2 se iniciam quando uma MAPK *kinase kinase* (MKKK) fosforila e ativa a MAPK *kinase* (MKK), que na sequência fosforila e ativa a MAPK (BOGOYEVITCH et al., 1994; BOGOYEVITCH; MARSHALL; SUGDEN, 1995; SUGDEN; CLERK, 2005). Assim, a MAPK, tal como a ERK1/2 pode então fosforilar e ativar outras proteínas e fatores de transcrição responsáveis pela indução da hipertrofia no cardiomiócito.

O receptor  $ET_A$  tem papel fundamental na ativação da cascata descrita acima. Sua principal ação começa quando o receptor  $ET_A$ , um receptor heterotrimérico acoplado a proteína G via proteína  $G_{q/11}$  ativa a fosfolipase C na membrana plasmática (CLERK et al., 1994; NISHIZUKA, 1995). A fosfolipase C catalisa a hidrólise do fosfolípide de membrana fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( $PIP_2$ ), gerando o inositol 1,4,5-trisfosfato ( $IP_3$ ), que é liberado para o citoplasma, e o diacilglicerol (DAG), que permanece associado à membrana plasmática. Este último, é capaz de realizar o controle do transiente de cálcio em cardiomiócitos e ainda mais importante, ativar proteínas como Ras, responsável pela ativação de ERK1/2 e consequente ativação transcricional de genes promotores da hipertrofia no cardiomiócito.

Quinases de receptores acoplados à proteína G (GRKs) são importantes reguladores das funções dos GPCR (Receptores Acoplados à Proteína G), mediando a dessensibilização, internalização e sinalização dos receptores através da fosforilação agonista-dependente dos mesmos. A família das GRKs tem até agora sete membros identificados, sendo GRK2 e GRK5 as mais abundantes no coração. Kim e colaboradores (2005) mostraram que a inibição de GRK5 e 6 levava à inibição da ativação da ERK1/2, evidenciando o papel dessas quinases na ativação de vias hipertróficas (KIM et al., 2005). Existem três isoformas das GRK com funções diferentes na célula. Enquanto as isoformas GRK5 ligam-se a fosfolípídeos e induzem translocação membranar, GRK 2 e 3 são essencialmente citoplasmáticas (BELMONTE; BLAXALL, 2011). Essa família de quinases é uma evidência de que outras vias de sinalização se integram às vias hipertróficas clássicas, como da ERK1/2, para potencializar e/ou controlar o metabolismo celular.

Outras vias de sinalização no cardiomiócito são também ativadas com o estímulo hipertrófico. A própria ET-1 pode levar a ativação da via fosfatidil-inositol 3-quinase (PI3K)/proteína quinase B (PKB ou Akt); no entanto, a ativação dessa via depende da ligação da ET-1 ao receptor  $ET_B$  (SUGDEN, 2003). Esta via tem sido relacionada com a produção de óxido nítrico (NO), mas pouco se pode afirmar acerca de um possível efeito protetor da ET-1, visto que suas ações via  $ET_A$  são mais pronunciadas no cardiomiócito.

Tradicionalmente, a via PKB/Akt é ativada por agentes que contrabalançam as ações da ET-1. A via para ativação da Akt se inicia por fatores de crescimento ou receptores acoplados a proteína G na membrana celular. A ativação destes leva a conversão do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato a inositol 3,4,5-trifosfato, que recruta a proteína Akt do citosol para a membrana plasmática. A partir daí Akt será fosforilada no sítio Thr308 pela proteína quinase dependente de fosfoinositol (*phosphoinositide-dependent kinase* ou PDK1), tornando-se ativa. Outro sítio da Akt, Ser473, pode também ser fosforilado para completa ativação da proteína (AOYAGI; MATSUI, 2011; SAGARA et al., 2012). As vias cardioprotetoras, destacando-se a PKB/Akt, contribuem para impedir o remodelamento cardíaco patológico, pois regulam a deposição de matriz extracelular, arranjo miofibrilar, ativação de inflamação (GURUSAMY et al., 2009) e sobrevivência (YANG et al., 2013) do cardiomiócito. A discussão sobre as vias que controlam a hipertrofia patológica do cardiomiócito consideram que transição para o estado descompensado da hipertrofia pode envolver um balanço entre a sinalização hipertrófica, a exemplo a via ERK1/2, e a cardioprotetora como representada pela PKB/Akt.

### 1.3 ESTRADIOL E SUAS AÇÕES NA HIPERTROFIA CARDÍACA

Os hormônios sexuais femininos têm diversos efeitos no organismo. No sistema cardiovascular, o E2 se destaca por suas ações protetoras. No miocárdio, o E2 é capaz de impedir o remodelamento cardíaco patológico (PEDRAM et al., 2008, 2010, 2013) e alguns trabalhos relacionam seus efeitos com as ações dos peptídeos natriuréticos (ANP e BNP) (ABDULLAH et al., 2005; REDFIELD et al., 2002; WANG et al., 2002).

Apesar de alguns estudos sugerirem que os hormônios esteroides têm influência sobre o sistema de peptídeos natriuréticos, essa relação tem sido pouco investigada. Especificamente, existem poucos estudos sobre os efeitos do estrógeno na transcrição gênica e liberação de ANP e BNP.

Mulheres saudáveis apresentaram maiores níveis plasmáticos de BNP que homens saudáveis (REDFIELD et al., 2002). Somando-se a este, dois outros trabalhos também

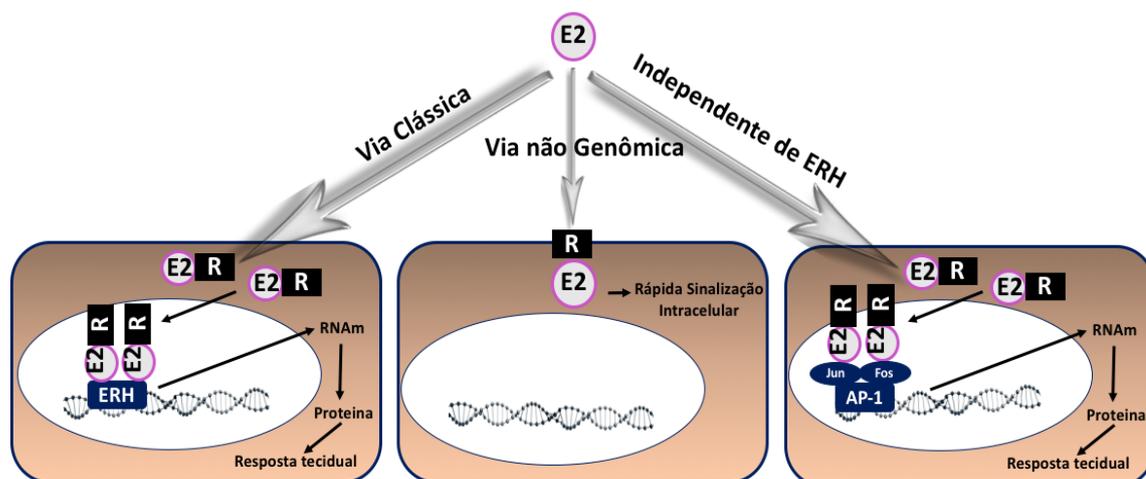
demonstraram que as concentrações circulantes do BNP e NT-proBNP são maiores em mulheres do que em homens (ABDULLAH et al., 2005; VASAN et al., 2002).

Para avaliar a influência do estado hormonal sobre os níveis de peptídeos natriuréticos, Maffei e colaboradores (2001) mensuraram os níveis plasmáticos de ANP e BNP em mulheres na pós-menopausa antes e após a terapia de reposição hormonal. O grupo de mulheres tratadas recebeu o estradiol transdérmico combinado com diidrogesterona oral. Como esperado, os níveis de estradiol aumentaram significativamente e os níveis de gonadotropinas diminuíram como um efeito da terapia de reposição hormonal. Os níveis de ANP e BNP aumentaram significativamente depois da terapia (34,1% e 57,1% respectivamente). Entretanto, os níveis do BNP aumentaram em um maior número de mulheres depois da reposição hormonal (21 de 22 mulheres; 95,5%) comparado com o ANP (14 de 22 mulheres; 63,6%). Este mesmo autor sugere, portanto, que o tecido miocárdico ventricular seja mais afetado pela terapêutica hormonal que os cardiomiócitos atriais (MAFFEI et al., 2001). Um outro trabalho demonstrou ainda que os níveis do NT-proBNP foram maiores em mulheres na pré menopausa recebendo contraceptivos orais e em mulheres na pós menopausa recebendo terapia de reposição hormonal quando comparadas com as que não faziam uso de contraceptivo ou terapia estrogênica (LAM et al., 2011). Estudo de nosso laboratório demonstrou que o tratamento com E2 reduz a pressão arterial de ratas espontaneamente hipertensas (SHR) e essa redução foi associada ao aumento da produção atrial e da concentração plasmática de ANP (BELO et al., 2004).

Como discutido anteriormente, existem diferenças no padrão da hipertrofia ventricular esquerda em relação ao gênero (LEINWAND, 2003). O coração de homens exibiu dilatação ventricular esquerda ou hipertrofia excêntrica em resposta a sobrecarga pressórica (hipertensão ou estenose aórtica). Já os corações de mulheres tenderam a manter o tamanho de suas câmaras normais, mas apresentaram um aumento na espessura da parede consistente com hipertrofia concêntrica (KRUMHOLZ; LARSON; LEVY, 1993). Outros, demonstraram que a reposição fisiológica com E2 em camundongos fêmeas foi capaz de limitar a espessura da parede ventricular esquerda induzida por sobrecarga pressórica (LI; JUBAIR; JANICKI, 2015; PEDRAM et al., 2013).

As ações cardiovasculares do E2 tem sido mais comumente relacionadas aos seus receptores do tipo alfa ( $ER\alpha$ ) e beta ( $ER\beta$ ) (ARNAL et al., 2012; KATZENELLENBOGEN; KORACH, 1997; PETTERSSON; GUSTAFSSON, 2001). Os receptores de estrógeno estão presentes em muitos tecidos alvo e amplamente expressos no miocárdio. A ação do E2 através destes receptores, pode alterar o balanço de genes responsáveis pela expressão de proteínas, estimular a síntese de fatores de crescimento e também pode interagir com vias de transdução de sinal. O estradiol ainda produz outros efeitos cardioprotetores como a diminuição plasmática da lipoproteína de baixa densidade (TERAUCHI et al., 2012).

Os receptores clássicos do E2 ( $ER\alpha$  e  $ER\beta$ ) produzem principalmente ações genômicas, mas, também, ações não genômicas no citoplasma. As ações genômicas requerem a ativação dos receptores pelo ligante E2 e sua dissociação do complexo inibitório, para formarem dímeros que irão, no núcleo, modificar a expressão de genes alvo através da sua ligação com regiões promotoras.



**Figura 1.** Mecanismos de ação do E2 iniciados por diferentes vias de sinalização dos receptores. E2: estradiol, R: receptores (*receptors*), ERH: elementos de resposta hormonal no DNA (*DNA response elements*), AP-1: proteína ativadora 1, Jun e Fos: fatores de transcrição.

Como mostrado na figura 1, podem ser iniciadas diferentes vias após a ativação dos ER. A via clássica é ativada quando o E2 se liga aos receptores nucleares ( $ER\alpha$  e  $ER\beta$ ),

fazendo com que eles se dimerizem e se liguem a regiões responsivas ao E2 alterando a expressão de genes. Na via independente de ligante, o complexo E2-receptor clássico altera a transcrição de genes de forma independente das regiões responsivas ao estrógeno, através de sua interação com elementos de resposta alternativos tais como AP-1 e fatores de transcrição com Jun e Fos. A via não genômica, representa a sinalização na qual o E2 ativa sítios de ligação associados a membrana levando a uma rápida sinalização tecidual (HALL; COUSE; KORACH, 2001; NILSSON et al., 2001). Este mecanismo pode ser exemplificado pelo receptor GPER1, que pode ser encontrado na membrana citoplasmática e, uma vez ativado, desencadear ações rápidas no espaço intracelular.

O ER $\beta$  tem sido considerado como o mais importante na ação anti-hipertrofica do E2 no coração. Em um estudo de Pedram e colaboradores (2008), o tratamento com E2 inibiu a hipertrofia cardíaca induzida pela Ang II. Esse efeito do estradiol parece ter sido mediado pelo ER $\beta$ , uma vez que o estradiol teve pouco efeito em camundongos knockout para ER $\beta$  (PEDRAM et al., 2008). Outro trabalho ainda sugeriu, que o estrógeno atenua a hipertrofia de cardiomiócitos por um receptor de estrógeno que provavelmente é dependente de uma via que aumenta a degradação da calcineurina (DONALDSON et al., 2009). Os autores discutem que o alvo da calcineurina seria o *nuclear factor of activated T-cell* (NFAT), uma família de fatores capazes de ativar no núcleo celular, a transcrição de genes do programa hipertrofico. Nesse mesmo estudo, camundongos fêmeas ovariectomizadas foram tratadas com placebo ou estradiol e em seguida foi realizada constrição aórtica transversa para induzir sobrecarga pressórica. A reposição com estradiol limitou a hipertrofia ventricular esquerda induzida pela constrição aórtica.

Apesar de a maioria dos trabalhos apontarem o ER $\beta$  como principal mediador das ações anti-hipertroficas do E2, o ER $\alpha$  também possui efeitos cardioprotetores. Com o intuito de diferenciar as ações cardioprotetoras do ER $\beta$  e ER $\alpha$ , Pelzer e colaboradores (2005) analisaram os efeitos de uma agonista seletivo do ER $\alpha$  (16 $\alpha$ -LE2) e do próprio E2. Foi observado que ambos agonistas foram capazes de atenuar a hipertrofia cardíaca e a expressão de  $\alpha$ -MHC em ratos espontaneamente hipertensos (*spontaneously hypertensive rats* - SHR). Estes estudos demonstram que o estradiol possui um efeito inibidor sobre o desenvolvimento

da hipertrofia cardíaca e que seus receptores clássicos – ER- $\alpha$  e ER- $\beta$  estão envolvidos neste processo.

Nas últimas décadas, o campo de estudo das ações do E2 no sistema cardiovascular foi ampliado com a descoberta de um novo alvo, o receptor de estrogênio acoplado à proteína G (*G protein-coupled estrogen receptor 1* ou GPER1). O estudo deste receptor pode ter grande importância para o esclarecimento das vias de sinalização intracelular no cardiomiócito.

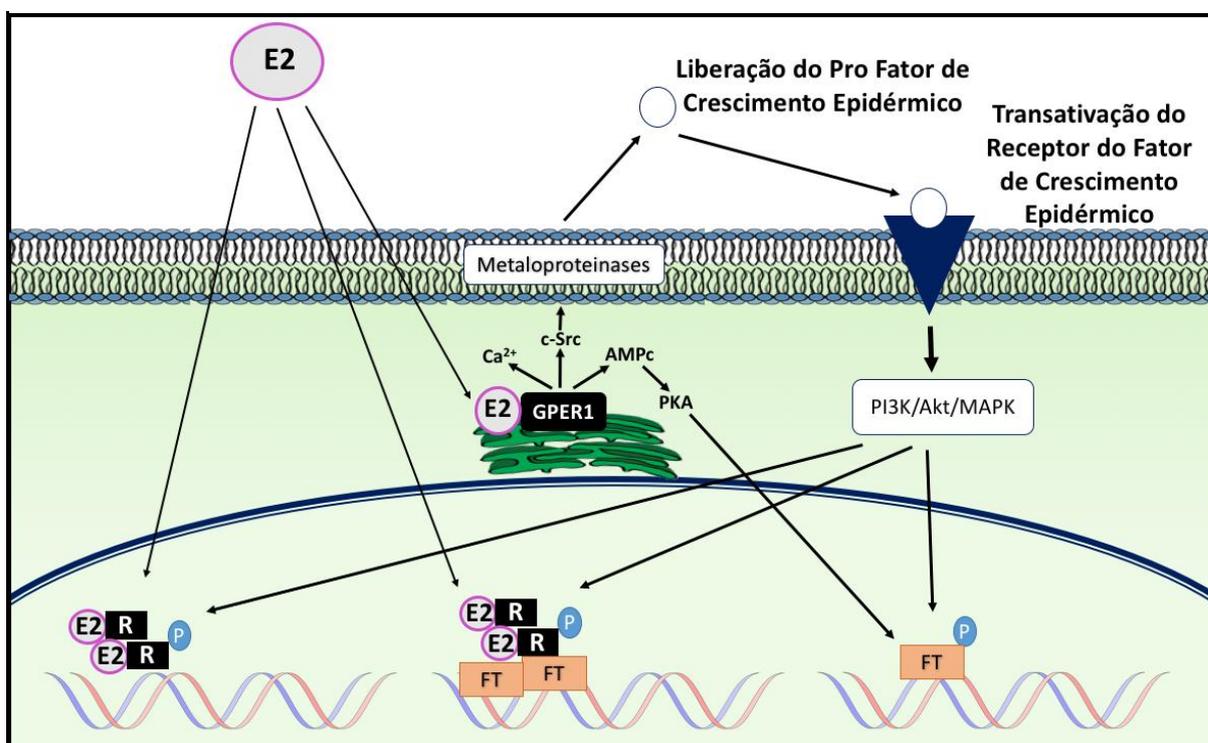
#### **1.4 GPER1: ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR NO SISTEMA CARDIOVASCULAR**

Na década de 90, surgiram estudos descrevendo o GPR30 como um receptor órfão acoplado a proteína G com 7 domínios transmembranares (CARMECI et al., 1997; KVINGEDAL; SMELAND, 1997; O'DOWD et al., 1998; OWMAN et al., 1996; TAKADA et al., 1997). Após sua descoberta e evidências de ativação do receptor pelo E2, os estudos mais recentes buscam descrever os efeitos da sinalização deste receptor nos diversos sistemas. Dentre as ações do GPR30 descritas, destacam-se sua capacidade de promover fosforilação da ERK1/2 (FILARDO et al., 2000), aumento na expressão de fatores de crescimento em macrófagos (KANDA; WATANABE, 2003) e de c-fos em células de câncer mamário (MAGGIOLINI et al., 2004).

Em 2005, foi demonstrado concomitantemente por dois diferentes grupos que o GPR30 é um receptor de estrogênio, sendo ativado pelo E2 (REVANKAR et al., 2005; THOMAS et al., 2005) e localizado tanto na superfície da célula quanto no seu interior. Este receptor foi renomeado GPER em 2007 e está incluído no guia oficial da International Union of Pharmacology (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2011). Devido à similaridade na ativação dos receptores de estrógeno, clássicos ou membranares, houve a necessidade de desenvolvimento de agonistas que fossem capazes de ativar GPER1 com baixa ação sobre os demais receptores de estrógeno. Usando a técnica de *screening* biomolecular, Bologna e colaboradores identificaram o agonista G-1, componente não esteroide capaz de ativar especificamente o GPER1 e sem ação nos receptores  $\alpha$  e  $\beta$  (BOLOGA et al., 2006), o que representou um grande avanço para as pesquisas sobre o GPER1.

Em 2009, Dennis e colaboradores desenvolveram um antagonista seletivo para o GPER1, denominado G15 (DENNIS et al., 2009), inicialmente mais usado nos sistemas nervoso e reprodutor e depois também no sistema cardiovascular.

A figura 2 representada abaixo, mostra as principais vias de sinalização iniciadas pela ativação do GPER1.



**Figura 2.** Vias de sinalização genômicas e não genômicas ativadas pelo estradiol. (Adaptado de PROSSNITZ; BARTON, 2011).

Na figura 2, o GPER1, que pode ser ativado tanto pelo E2 quanto pelo G1, promove a ativação de proteínas G estimulatórias ou inibitórias que irão realizar o controle da atividade da adenilato ciclase. Conseqüentemente, a produção da adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e a atividade da proteína quinase A (PKA) dependerão de uma regulação via GPER1 (FILARDO et al., 2002). A estimulação da proteína  $G_{i/o}$  também, promove a ativação da via PI3K com conseqüente ativação da proteína Akt/PKB relacionada ao crescimento e sobrevivência celular (DING et al., 2009; NILSSON et al., 2001).

As vias secundárias após ativação do GPER1, realizam a ativação da proteína quinase Src e o recrutamento da proteína adaptadora (SHC) com consequente ativação de metaloproteinases de matriz e transativação do receptor do fator de crescimento epidermal. Assim, essa transativação leva a ativação da ERK1/2 e da via PI3K/Akt. A fosforilação da Akt tem sido relacionado aos efeitos cardioprotetores mediados pelo GPER1 (NILSSON et al., 2001; WEIL et al., 2010).

Os efeitos do E2 aumentando a concentração intracelular do cálcio são os menos descritos e apresentam ainda resultados conflitantes. Enquanto estudos mostram que esse efeito pode ser mediado pela ativação do EGFR (REVANKAR et al., 2005a), outros apontam para um efeito dependente do receptor para inositol trifosfato (ARIAZI et al., 2010).

Em 2009, Martensson e colaboradores observaram um fenótipo hipertensivo natural de fêmeas *knockout* para GPER1. Com 9 meses de idade as fêmeas apresentaram aumento significativo da pressão arterial média (PAM) comparado com animais controle de mesma idade. É discutido que, o aumento da PAM possa estar relacionado com o aumento da resistência vascular total, visto que os animais *knockout* apresentaram aumento na espessura da camada média vascular (MÅRTENSSON et al., 2009). Apesar disso, não foi observado diferenças no peso cardíaco.

Ações vasodilatadoras do E2 tem sido reportadas e pelo fato de serem ações não genômicas, o GPER1 tem sido considerado como um possível mediador desses efeitos. Haas e colaboradores (2009), demonstraram que a ativação do GPER1 com G-1 é capaz de mediar a vasodilatação e redução da pressão arterial em animais com deficiência na expressão de GPER1 (HAAS et al., 2009). Demonstraram ainda, que em células musculares lisas de vasos que não expressam ER $\alpha$  nem ER $\beta$ , a ativação do GPER1 inibiu a proliferação celular. Um outro trabalho também demonstrou que o efeito vasodilatador do E2 é também mediado pelos receptores clássicos ER $\alpha$  e ER $\beta$  (TRAUPE et al., 2007).

O tratamento de células miocárdicas H9C2 com E2 ou G1 após a isquemia por 20 min e em seguida a reperfusão por 120 minutos, levou a uma diminuição da apoptose celular, aumento da superóxido dismutase (SOD) associado com a diminuição dos níveis do fator de

necrose tumoral tipo alfa (TNF- $\alpha$ ) (LI; XIANG; PING, 2015). Corroborando este dado, um outro estudo mostrou que há um aumento na expressão do GPER1 em condições de hipóxia em cardiomiócitos e em células de câncer mamário (RECCHIA et al., 2011). Estes dados mostram que em certas condições, a ação cardioprotetora do GPER1 pode se desenvolver para compensar a ativação de mecanismos patológicos.

Atualmente, o número de pesquisas avaliando os efeitos do GPER1 na hipertrofia de cardiomiócitos tem crescido, no entanto, as vias envolvidas na suposta cardioproteção através deste receptor, ainda são pouco conhecidas.

## 2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

As doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de morte no mundo (ZHAO et al., 2015). As últimas pesquisas indicaram que as doenças do aparelho circulatório representaram cerca de 31,3% das mortes em todo o Brasil e que a hipertrofia cardíaca assume um papel importante no desenvolvimento dessas patologias, pois é um fator de risco independente para muitas delas (VOISIN; PRÖBSTL; NOURSHARGH, 2010). A hipertrofia cardíaca constitui um mecanismo adaptativo do coração em resposta ao aumento de sua atividade ou de sobrecarga funcional. Essa adaptação pode ser em resposta a necessidade metabólica que impõe um aumento do débito cardíaco ou em resposta a agentes hipertróficos que se encontram elevados em condições patológicas, a exemplo da ET-1. O resultado do aumento do trabalho do coração traduz-se em aumento da massa cardíaca devido ao crescimento dos miócitos e/ou do estroma conjuntivo (LEASK, 2015).

A prevalência de doenças cardiovasculares varia entre homens e mulheres, sendo que estas apresentam menor risco de desenvolver doenças cardiovasculares comparadas com homens na mesma faixa etária. Essa diferença entre os sexos desaparece quando as mulheres atingem a menopausa (CAVASIN et al., 2003). Alguns trabalhos já demonstraram que o E2 confere cardioproteção para as mulheres, especialmente em resposta a sobrecarga cardíaca. Essa evidência aponta para as influências do estado hormonal sobre o padrão de remodelamento cardíaco, mas ainda existem poucos trabalhos que abordam essa temática.

Atualmente, o estudo dos efeitos do E2 na saúde das mulheres ganha cada vez mais relevância devido à descoberta de diferentes receptores. Os estudos desenvolvidos até o momento, apontam para o envolvimento do ER $\alpha$  promovendo efeitos protetores em vasos, incluindo a proliferação de células endoteliais, a produção de óxido nítrico (NO) endotelial, atenuação da inflamação vascular e redução da proliferação de células musculares lisas (BROUCHET et al., 2001; PARE et al., 2002; VEGETO et al., 2003). Já as informações a respeito do papel do ER $\beta$  ainda são escassas, mas é frequentemente discutida a possibilidade de ter ações opostas ao ER $\alpha$  (SUGIYAMA et al., 2010; TOUFEXIS et al., 2007).

A descoberta do GPER1 e sua alta afinidade de ligação com o E2 foi determinante para o campo de pesquisa das ações não genômicas do E2 no cardiomiócito. Este receptor é uma

proteína com sete domínios transmembrânicos acoplados a uma proteína G (REVANKAR et al., 2005a; THOMAS et al., 2005). A ausência do gene GPER1 (GPER1 *knock-out*) foi estudada na última década e, através deste modelo, foi possível analisar o papel patofisiológico deste receptor (FILARDO; THOMAS, 2012; THOMAS et al., 2005). No sistema cardiovascular, camundongos fêmeas GPER1 KO apresentam aumento da pressão arterial média aos nove meses de idade (MÅRTENSSON et al., 2009). Associado a isso, foi demonstrado que o remodelamento cardíaco em ratas pode ser influenciado pelas ações mediadas pelo GPER1 (JESSUP et al., 2010). O tratamento com G1, agonista do GPER1, preveniu hipertrofia cardíaca e fibrose perivascular em animais cardiopatas (LENHART et al., 2013). Este trabalho sugeriu ainda que o GPER1 interage com uma proteína transmembranar, RAMP3, para ser direcionado a localização específica em células HEK293. Um outro trabalho demonstrou que o G1 (50 µg/kg/day), preveniu a disfunção diastólica observada em fêmeas ovariectomizadas e com hipertrofia induzida por Ang-II (WANG et al., 2012), bem como reduziu a pressão sistólica em fêmeas mRen2.Lewis (LINDSEY et al., 2009).

A ativação do GPER1 também se mostrou benéfica no miocárdio de animais infartados. O tratamento com G1 a 110nM foi capaz de reduzir a área infartada em animais tratados quando comparados aos controles não tratados (DESCHAMPS; MURPHY, 2009). Outro trabalho em modelo de isquemia e reperfusão mostrou que o GPER1 reduz o dano isquêmico miocárdico (KABIR et al., 2015) por influenciar a abertura de poros na mitocôndria (BOPASSA et al., 2010). Os receptores clássicos do E2, ER $\alpha$  e ER $\beta$ , já foram relacionados ao efeitos cardioprotetor do E2, junto com o GPER1 (FILICE et al., 2009). No entanto, as vias ativadas pelo GPER1 precisam de maiores investigações.

Estudos como estes indicam o papel essencial das vias ativadas pelo E2 na modulação hipertrófica. Apesar das pesquisas terem voltado mais a atenção para o receptor GPER1, ainda existem poucos dados demonstrando o papel deste na hipertrofia cardíaca. Além disso, a elucidação dos mecanismos moleculares regidos pela ação do E2 tem avançado, mas o estímulo iniciador deste processo, incluindo os mecanismos dos receptores envolvidos e a complexidade das vias de sinalização precisam ser melhor estudados.

Neste trabalho, nós investigamos os efeitos do E2 mediados pelo GPER1 em cardiomiócitos de ratas neonatas. O principal objetivo foi avaliar a participação do GPER1 no

efeito anti-hipertrófico do E2 e os mecanismos possíveis envolvidos. Para tanto, os objetivos do trabalho e seu desenho experimental foram divididos em três partes:

1. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MEDIADOS PELO ESTRADIOL VIA GPER1 ATRAVÉS DO BLOQUEIO FARMACOLÓGICO DESTE RECEPTOR EM CARDIOMIÓCITOS HIPERTROFIADOS

- a) Confirmar a atividade anti-hipertrófica do E2 em cardiomiócitos com hipertrofia induzida pela ET-1;
- b) Avaliar o efeito do bloqueio do receptor GPER1 na atividade anti-hipertrófica do E2 em cardiomiócitos com hipertrofia induzida pela ET-1;
- c) Avaliar o efeito do E2 e do bloqueio do GPER1 nos níveis dos peptídeos natriuréticos (ANP e BNP) como marcadores hipertróficos em cardiomiócitos com hipertrofia induzida pela ET-1;
- d) Analisar o padrão de expressão de mecanismos ativadores da hipertrofia em cardiomiócitos tratados com ET-1 e os efeitos do E2 mediados pelo GPER1;
- e) Avaliar o envolvimento de vias cardioprotetoras ativadas pelo E2 via GPER1 em cardiomiócitos com hipertrofia induzida pela ET-1.
- f) Avaliar os efeitos cronotrópicos e inotrópicos do E2 via GPER1 na frequência e força de contração dos cardiomiócitos com hipertrofia induzida pela ET-1;
- g) Caracterizar a imunolocalização do receptor GPER1 em cardiomiócitos com hipertrofia induzida pela ET-1;

2. ANÁLISE DOS EFEITOS MEDIADOS PELA ATIVAÇÃO DO GPER1 COM G1 NA HIPERTROFIA DE CARDIOMIÓCITOS INDUZIDA POR ET-1

- a) Avaliar o efeito da ativação do receptor GPER1 em cardiomiócitos com hipertrofia induzida pela ET-1;

- b) Confirmar o efeito anti-hipertrofico do GPER1 através da ativação do receptor, avaliando suas ações na expressão de proteínas envolvidas nos mecanismos hipertroficos e cardioprotetores avaliados no estudo.

### 3. SILENCIAMENTO DO GPER1 COM RNA DE INTERFERÊNCIA (siRNA)

- a) Silenciar o receptor GPER1 em cardiomiócitos com hipertrofia induzida pela ET-1;
- b) Avaliar o efeito do silenciamento do GPER1 na área dos cardiomiócitos tratados com ET-1.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais sob o número 121/2014, aprovado em 26/08/2014.

#### 3.1 CULTURA CELULAR DE CARDIOMIÓCITOS E TRATAMENTO DAS CÉLULAS

A cultura celular é uma ferramenta importante para o estudo da fisiologia celular e na área da cardiologia, permitindo compreender características morfológicas, bioquímicas e eletrofisiológicas do coração. Nesse contexto, culturas primárias são as mais relevantes do ponto de vista estrutural e funcional. O protocolo de cultivo celular realizado é descrito abaixo.

##### 3.1.1 Primeiro dia de cultivo celular:

Todos os instrumentos utilizados foram esterilizados pelo método de alta temperatura em autoclave e os passos para extração do tecido cardíaco foram realizados em um fluxo laminar para cultivo celular. Para cada experimento, aproximadamente 14 neonatos com 1-3 dias de vida foram utilizados para extração do tecido cardíaco.

Os ratos neonatos foram imersos rapidamente numa solução de álcool a 75% para descontaminação superficial. Em seguida, os mesmos foram decapitados com tesoura estéril (EHLER; MOORE-MORRIS; LANGE, 2013) e o coração foi extraído com uma pinça curva através do espaço intercostal na linha clavicular e transferidos imediatamente para uma solução de sais balanceados de *Hank* (meio HBSS) no gelo.

Os corações foram cortados em pedaços menores e transferidos para novo meio até que estivessem em pedaços muito pequenos (aproximadamente 0,5-1 mm<sup>3</sup> ou menor) e com solução livre de sangue. Em seguida, foram transferidos para um tubo falcon contendo tripsina (100 µg/mL) em meio HBSS e mantidos sob agitação *overnight* a 4°C.

### 3.1.2 Segundo dia de cultivo celular:

Colagenase e meio L-15 foram adicionados a solução de células. Em seguida, as células foram mantidas sob agitação leve a 37°C para solubilização no meio, seguido de dissociação mecânica lenta com pipeta de 10 mL.

Essa solução foi filtrada em filtro *cell-strainer* estéril e transferida para novo tubo falcon de 50 mL, seguido de centrifugação a 1400 rpm por 5 min e o pellet ressuspenso em meio *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM, Gibco) suplementado com 5% de soro bovino fetal (SBF) inativado, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL). Em seguida, a solução foi plaqueada em garrafas T75 por 2 horas e após isso, o sobrenadante (cardiomiócitos) foi colocado em placas de 6 poços ou garrafas com área de superfície de 25 cm<sup>2</sup> (T25). As garrafas ou poços foram pré adsorvidos com solução de fibronectina e incubadas a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade relativa. Nesse passo, as células foram contadas utilizando uma câmara de Neubauer. Os cardiomiócitos foram colocados em uma densidade de  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> (GUATIMOSIM et al., 2008).

Para os experimentos de imunofluorescência, as células foram colocadas em placas de 6 poços com lamínulas.

### 3.1.3 Terceiro dia de cultivo celular:

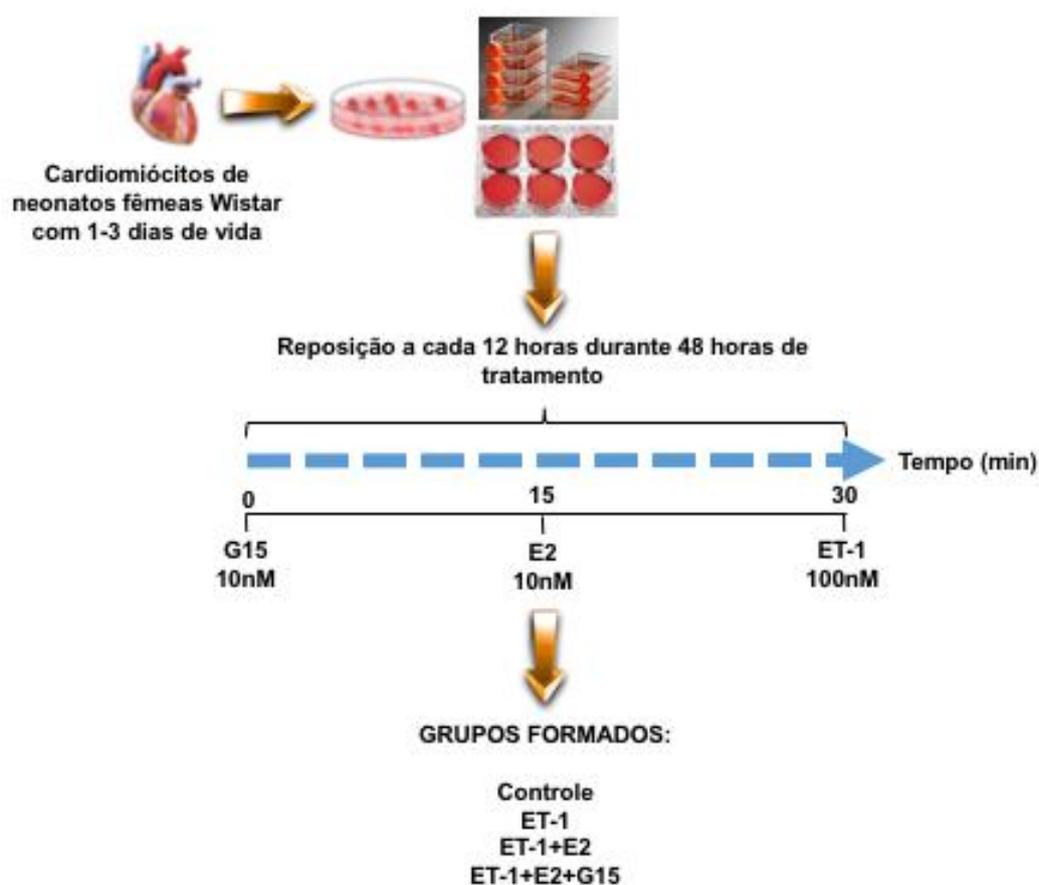
O meio de cultivo foi trocado por um novo com adição do inibidor de proliferação (ARA-C) e mantido até o dia do início do tratamento (48 horas). Em nosso protocolo, o tratamento foi iniciado no quinto dia de cultivo. Antes do início do tratamento, o meio foi trocado por meio DMEM com SBF a 5% sem inibidor de proliferação de fibroblasto.

### 3.1.4 Quinto dia de cultivo celular:

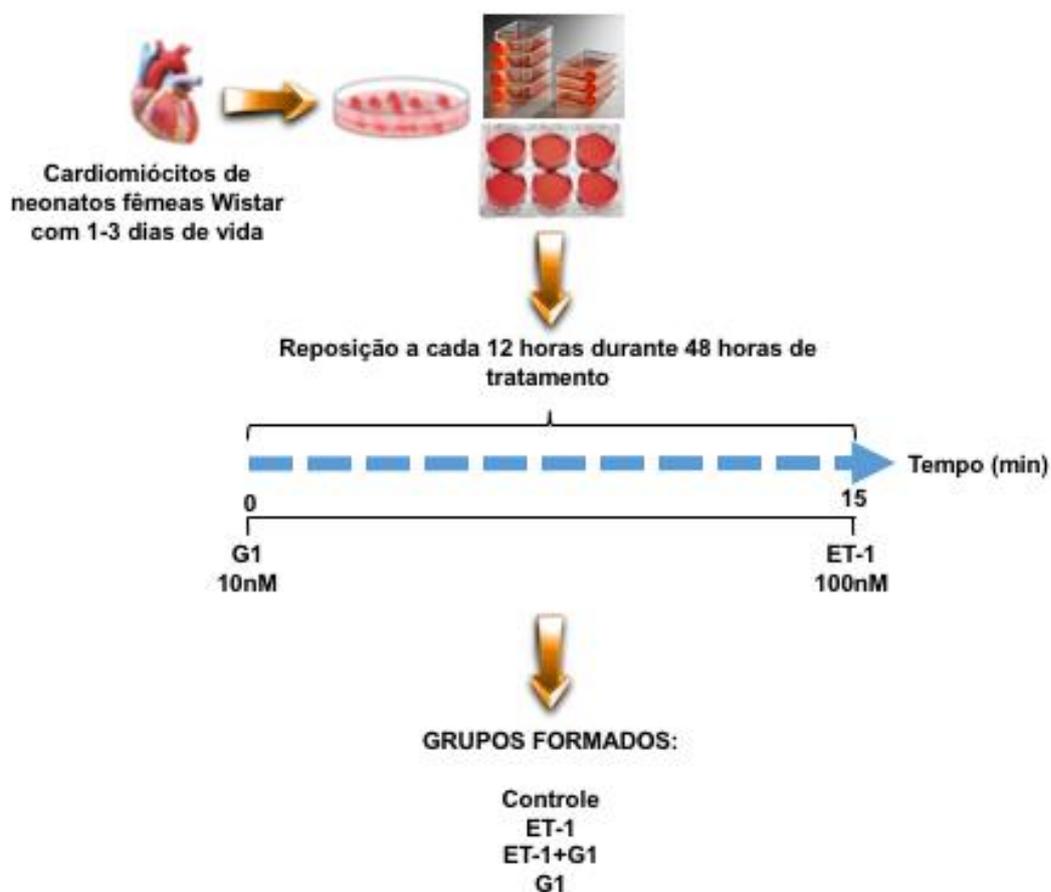
Após a adesão celular (72 horas após o plaqueamento) foi iniciado o tratamento das células. Para indução da hipertrofia, as células foram tratadas durante 48 horas com ET-1 na concentração de 100 nM (LI et al., 2014; MENAOUAR et al., 2014). Para análise do efeito do E2 realizamos o pré tratamento das células (15 minutos antes da ET-1) com o 17β-estradiol na concentração fisiológica de 10 nM (Sigma Aldrich, MO, USA). Os efeitos do bloqueio do GPER1 foram avaliados com o tratamento das células, utilizando o antagonista G15 na

concentração de 10 nM e para alguns experimentos, outro antagonista do GPER1, o G36, também na concentração de 10 nM (Phoenix Pharmaceuticals, California, USA). Para a ativação do GPER1, o G1 foi utilizado na concentração de 10 nM (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA). Nos grupos de ativação ou bloqueio do GPER1, as drogas foram aplicadas 15 minutos antes do E2 e este, 15 minutos antes da ET-1. A reposição das drogas ocorreu a cada 12 horas durante as 48 horas totais de tratamento. A dose e concentração escolhidas foram baseadas em trabalhos prévios.

Abaixo, a síntese dos protocolos experimentais 1 e 2 para os experimentos.



**Figura 3.** Protocolo Experimental 1.



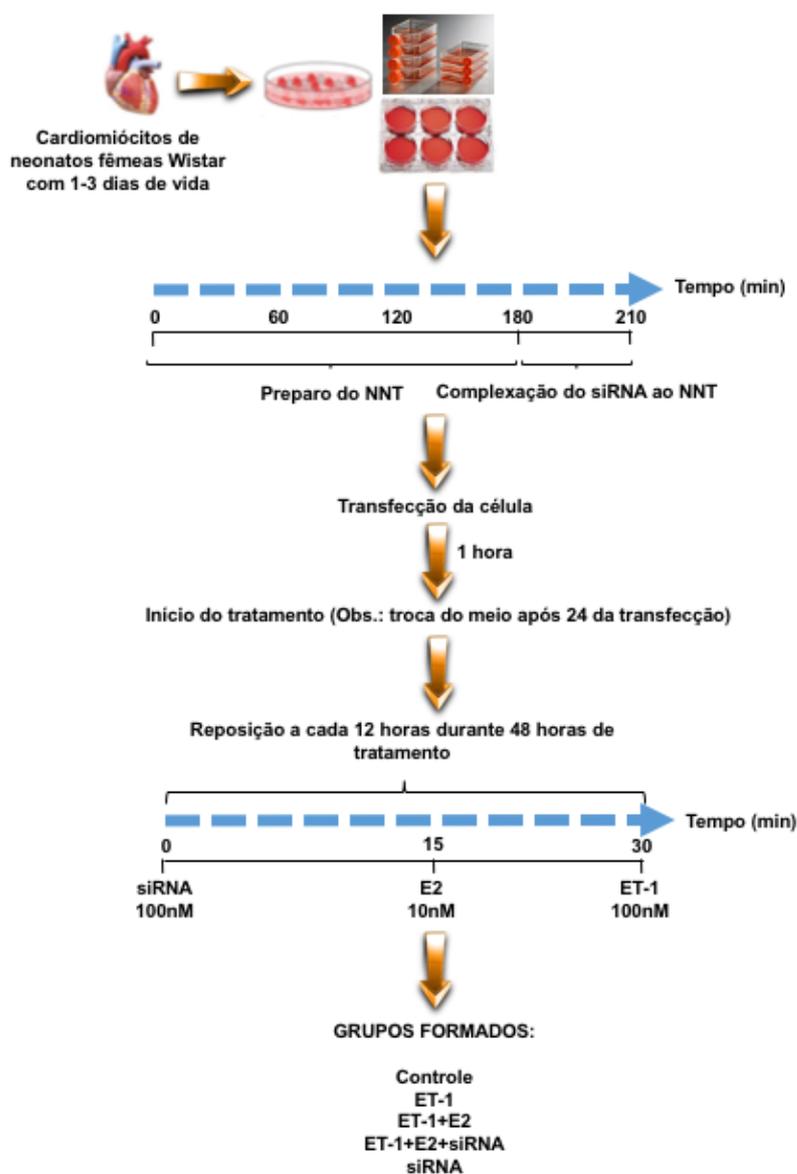
**Figura 4.** Protocolo Experimental 2.

### 3.2 PREPARO DO RNA DE INTERFERÊNCIA (siRNA)

Para a realização da terceira parte de experimentos, que incluiu o silenciamento do GPER1 através de RNA de interferência (siRNA), foram adicionados alguns passos no protocolo experimental.

Sequências gênicas alvos para o GPER1 foram selecionadas através de busca na base de dados NCBI Blast para confirmar a especificidade para o receptor. O siRNA foi preparado com sequências específicas de oligonucleotídeos pelo método transcricional através do *kit* de silenciamento Silencer® da Ambion, seguindo as instruções do fabricante.

Para os experimentos com siRNA, as células foram transfectadas/tratadas com 100 nM do siRNA. A transfecção dos cardiomiócitos com o RNA de interferência, foi feita através da utilização de nanotubos de carbono (NNT) do tipo *multiwall* (MW). Estes nanotubos foram sonicados por um período mínimo de 3 horas para abertura do complexo e inclusão do siRNA. Após a inclusão, a solução nanotubo e siRNA foi sonicada por mais 30 minutos. Esta etapa precedeu o tratamento das células, sendo este iniciada pelo menos uma hora após a transfecção. O protocolo experimental 3 é apresentado a seguir (Figura 5).



**Figura 5.** Protocolo Experimental 3.

### 3.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA E MEDIDA DA ÁREA CELULAR

Após a incubação e tratamento de 48 horas, as células foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas com paraformaldeído a 4% e permeabilizadas em solução de PBS contendo 0,5% de triton X-100 durante 30 minutos. Os poços foram então lavados com solução de PBS contendo 1% de BSA e 0,5% de triton X-100, por 1 hora, para bloqueio dos sítios inespecíficos.

As células foram então marcadas com os anticorpos primários anti- $\alpha$ -actinina (1:100), anti-GPER1 (1:150) ou anti-GRK5 (1:150), diluídos em solução de PBS contendo 1% de BSA e 0,5% de triton X-100 por pelo menos 16 horas (*overnight*), sob agitação, a 4°C. Após 6 lavagens de 5 minutos cada com PBS contendo 0,5% de triton X-100, as células foram incubadas com os anticorpos secundários conjugados com Alexa-Fluo 488 ou 633 (1:500) e com DAPI na concentração de 1:1000 por 1 hora e 30 minutos, em temperatura ambiente.

Em seguida, as lamínulas foram lavadas 8 vezes por 5 minutos cada lavagem com PBS contendo 0,5% de triton X-100, montadas em lâminas utilizando o meio *ProLong® Gold Antifade Mountant* (Life Technologies) e protegidas da luz, até o momento da análise no microscópio confocal a laser LSM 510 META (Zeiss).

A superfície da área celular dos cardiomiócitos foi determinada a partir de imagens adquiridas por microscopia confocal, através da coloração do DNA por DAPI e da marcação da superfície total dos cardiomiócitos por  $\alpha$ -actinina. As análises da área dos cardiomiócitos foram feitas utilizando ferramentas dos programas LSM Image Browser e Zen 2012 Lite (Carl Zeiss). A superfície da área foi mensurada em pelo menos 30 células individuais em cada grupo. A área medida foi delimitada manualmente através de ferramenta que permitiu marcar os limites das células, permitindo que o software calculasse a área. A partir destes valores, a média e o desvio padrão foram calculados para cada grupo (PEDRAM et al., 2005).

### 3.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RNA MENSAGEIRO POR *quantitative real-time PCR* (qPCR)

### 3.4.1 Extração do RNAm

Após a incubação e tratamento de 48 horas, as células foram lavadas duas vezes com PBS e foram lisadas com TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para realização do qPCR. Foram adicionados 1000 µl do reagente TRIzol para cada poço contendo  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>, lavadas durante 3 minutos, em temperatura ambiente. A separação trifásica das amostras foi feita a partir da adição de 200 µl de clorofórmio, seguida da agitação vigorosa dos tubos por 30 segundos e centrifugação por 15 minutos, a  $12.000 \times g$ , a 4 °C. O RNA foi extraído da fase aquosa formada após a centrifugação.

Após a precipitação do RNA com 600 µl de isopropanol, por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugação por 15 minutos, a  $12.000 \times g$ , a 4°C, as amostras foram lavadas com 1000 µl de etanol a 75% por 5 minutos a 4°C, centrifugadas a  $12.000 \times g$ , 4°C por 15 minutos, lavadas novamente com etanol a 75% e mantidas em freezer -20°C por 1 hora. Na sequência, foi feita nova centrifugação por 15 minutos, a  $12.000 \times g$ , 4°C e ao final do processo, o RNA foi ressuspensão em 50 µl de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC).

A dosagem de RNA foi realizada através da leitura da amostra em *Nanodrop* com comprimento de ondas de 260 e 280 nm. As amostras foram incubadas com a Turbo DNase (Ambion) por 30 minutos a 37°C, e na sequência, foi adicionado EDTA aos tubos numa concentração final de 15 mM. Em seguida, a enzima DNase foi inativada aquecendo-se os tubos a 75°C por 10 minutos. A presença de contaminantes foi verificada por espectrofotometria, através da medição dos comprimentos de onda 260 nm (ácidos nucleicos) e 280 nm (proteínas).

### 3.4.2 Síntese do DNA complementar (cDNA) – transcrição reversa

A síntese de cDNA foi iniciada preparando-se uma solução contendo 0,733 µg de RNA, oligonucleotídeos hexâmeros randômicos a 0,5 µg/µl e uma mistura de dNTPs a 10mM (Invitrogen). Os tubos foram aquecidos em termociclador a 65°C por 5 minutos, seguido de incubação no gelo por 5 minutos. A transcrição reversa foi realizada adicionando à solução anterior uma mistura contendo 200 U da enzima transcriptase reversa Superscript® III (Invitrogen), DTT 0,1M e tampão First Strand 5X, seguida de aquecimento dos tubos em termociclador em três etapas consecutivas: 25°C por 5 minutos, 50°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos. As amostras foram armazenadas a -80°C até a realização dos procedimentos experimentais.

### 3.4.3 qPCR

As reações de qPCR foram realizadas utilizando o kit *SYBR Green® PCR Master Mix* (BioRad), de acordo com as recomendações do fabricante, e o sistema de PCR em tempo real “ABI Prism® 7500 Fast” (Applied Biosystems).

Foi utilizado um volume final de 25 µL por reação. Os ensaios de qPCR foram realizados em duplicata para cada amostra. O gene de 18S foi usado como normalizador endógeno do cDNA. Os resultados foram analisados no programa 7500 Software v2.0.6 (Applied Biosystems). A quantificação da expressão gênica foi realizada pelo método da quantificação relativa ( $\Delta\Delta Ct$ ) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

As sequências dos primers (Integrated DNA Technologies) foram as seguintes:

- ANP: *forward primer*, 5'GGATTTCAAGAACCTGCTAGACCA3' e *reverse primer*, 5'CTGCTTCCTCAGTCTGCTCACTCA3';
- BNP: *forward primer*, 5'GGTCACTCCTATCCTCTGGGAAGT3' e *reverse primer*, 5'TTCTCTTATCAGCTCCAGCAGCTT3';
- GPER1: *forward primer*, 5'TCCTGCCTCTACACCATCTT3' e *reverse primer*, 5'ACAGGTCTGGGATAGTCATCTT3'.

### 3.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA POR *Western Blot*

Amostras contendo 20-30 µg de proteínas foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos com tampão contendo 5% de *2-mercaptoethanol* (Invitrogen). As amostras foram corridas em gel 10% SDS-PAGE a 120V e transferidas por 25 minutos a 20V no sistema de transferência Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad) para membranas de fluoreto de polivinilidene (PVDF). Após a transferência, as membranas foram coradas com o corante *Ponceau*, para a conferência da uniformidade da transferência. Os sítios inespecíficos de ligação nas membranas foram bloqueados com solução de 5% de leite desnatado ou 5% BSA diluído em TBS/Tween 0,05% por 1 hora, a temperatura ambiente ou *overnight*, a 4°C.

Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo para: GPER1 (1:1000, Abcam, UK, cat. no. ab57602), *phosphoERK* 1/2 (1:1000, Abcam, UK, ab124773), *phosphoAkt* Ser473 (1:1000, Abcam, UK, ab90857) ou *phosphoPDK1* (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1; 1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA; #3438). A normalização da densidade de pixels foi feita pela correção dos valores da banda pela expressão de sua proteína total, usando os seguintes anticorpos: anti-ERK (1:1000; Abcam; ab196883), anti-Akt (1:1000; Abcam; ab126811) e anti-PDK1 antibody (1:1000; Cell Signaling; #3062). Para a normalização do GPER1, a densidade de expressão do GAPDH foi utilizada. A imunodeteção foi feita através do ganho de quimioluminescência através da solução ECL conjugada a peroxidase (Amersham ECL HRP Conjugated Antibodies) aplicada diretamente sobre a membrana. As imagens foram capturadas e analisadas através do *Software Image Quant* LAS 4000.

### 3.6 FREQUÊNCIA DE CONTRAÇÃO DOS CARDIOMIÓCITOS

A análise da contração dos cardiomiócitos foi determinada a partir da observação de três diferentes áreas do mesmo grupo. Esta análise foi realizada em vídeo feito ao final das 48 horas de tratamento das células. Os cardiomiócitos foram filmados durante um minuto, com uma taxa de 15 imagens por segundo. Os dados apresentados mostram a média do número de contrações por minuto em cada grupo.

Para a captura das imagens e formação do vídeo, foi utilizada a técnica de microscopia de desfocalização. Esta técnica baseia-se no fato de que as membranas celulares aderidas ao substrato se comportam como objetos de fase, ou seja, são transparentes quando observadas no microscópio. Os objetos de fase introduzem uma fase na luz incidente que ao ser conjugada no plano imagem torna o objeto invisível e, ao variar o foco levemente observa-se um contraste que pode ser positivo ou negativo de acordo com o valor da desfocalização (AGERO et al., 2004). A membrana de um cardiomiócito aderida em uma superfície pode ser considerada um objeto de fase. Através da microscopia de desfocalização foi possível acompanhar as flutuações na membrana celular em tempo real.

Os filmes foram capturados por um microscópio invertido Nikon Eclipse *Ti-e* em que está acoplado uma objetiva Nikon Japan de 40X (com abertura numérica de 0.55 e distância de trabalho de 2.1mm) e uma câmera de CO<sub>2</sub> (modelo ChamlideIC-CU:109, Live Cell Instrument, Nowan-gu, Korea) que mantém o ambiente a 37<sup>0</sup>C, 5% de CO<sub>2</sub> e com 60% de umidade. As imagens dos cardiomiócitos em cultura foram capturadas usando uma câmera CCD de 12 bits (Uniq modelo 1800CL com 4096 níveis de cinza). Os cardiomiócitos foram filmados durante um minuto com uma taxa de 15 imagens por segundo.

### **3.7 AMPLITUDE DE MOBILIDADE DA MEMBRANA DO CARDIOMIÓCITO**

Para obter a fração da área contraída dos cardiomiócitos, usamos o plugin *StackDifference*. Este plugin faz a diferença entre duas imagens subsequentes e este resultado é transformado em uma sequência binária usando o *ImageJ>Adjust>BrightnessContrast* aplicados no programa *Kaleidagraph*®. A partir da figura binária usamos *ImageJ>AnalyseParticles* para identificar a fração da área contraída e obtermos um gráfico desta área em função do tempo.

### **3.8 DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os experimentos foram realizados nas mesmas condições de temperatura e concentração de CO<sub>2</sub> para evitar as variações indesejáveis, permitindo que obtivéssemos apenas as variações decorrentes do tratamento com as drogas. Os dados apresentados foram de células obtidas de pelo menos três experimentos realizados em momentos diferentes e

foram expressos como média±EPM. Os dados foram analisados através da análise de variância ANOVA *one-way* seguido do pós teste de *Newman-Keuls* (GraphPad Prism, San Diego, CA, USA). Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ANTAGONISTA DO GPER1 REVERTE O EFEITO DO ESTRADIOL NA HIPERTROFIA DE CARDIOMIÓCITOS INDUZIDA PELA ENDOTELINA 1 (ET-1)

#### 4.1.1 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS E MARCADORES DE HIPERTROFIA

O objetivo central do trabalho foi investigar a participação do GPER1 na atividade do E2 em modelo de hipertrofia induzida por ET-1 em cardiomiócitos.

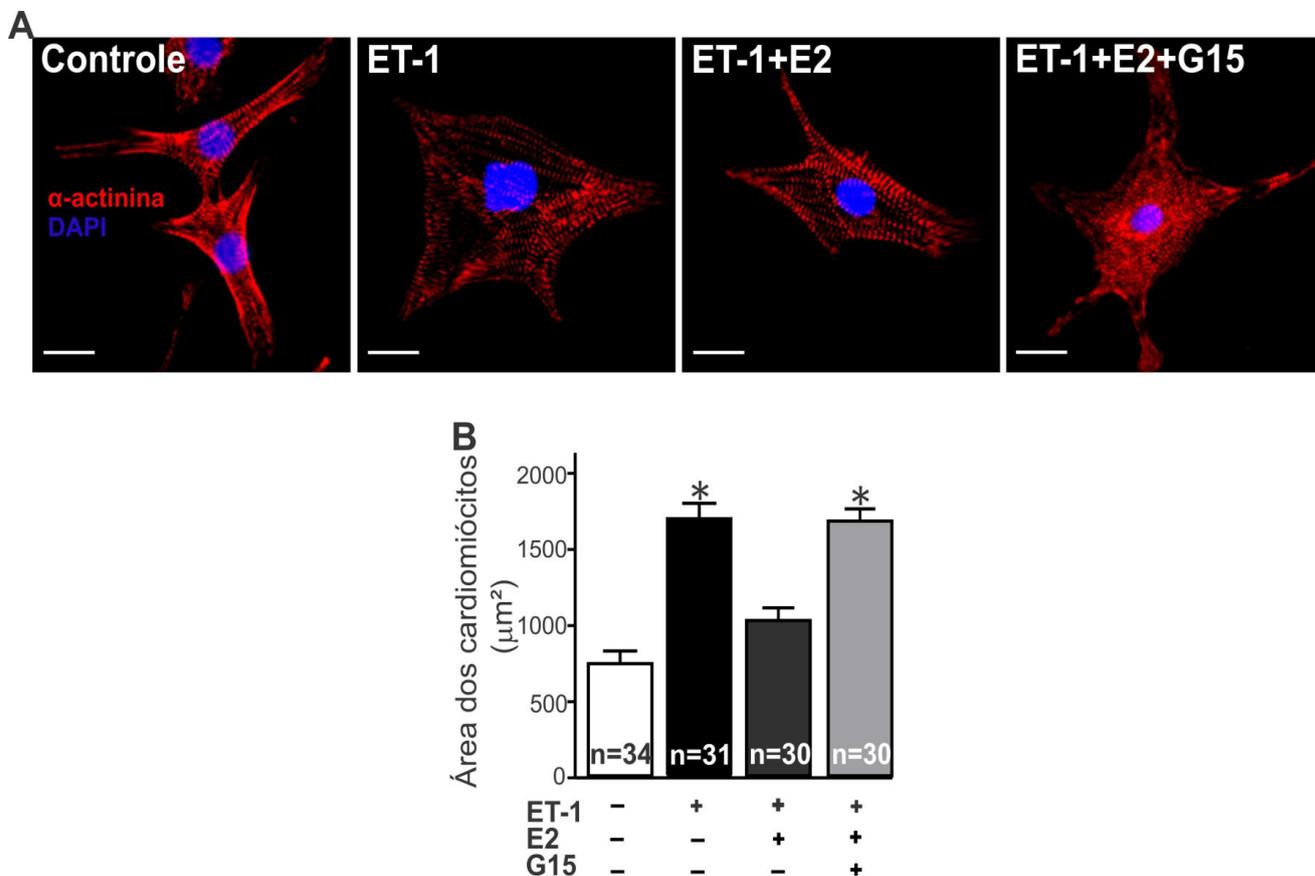
A ET-1 foi escolhida como droga indutora de hipertrofia, após testes para escolha da concentração e tempo de tratamento das células. O protocolo que conferiu maior eficácia preservando a viabilidade das células foi o tratamento por 48 horas a uma concentração final de 100 nM. Como pode ser observado na figura 6A-B, este tratamento induziu aumento significativo na área das células quando comparado ao grupo controle (Figura 6A-B).

O tratamento prévio com E2 preveniu o aumento da área dos cardiomiócitos, como pode ser observado na figura 6A-B. Na figura 6A, está representada a imunofluorescência delimitando a área celular (através da marcação por  $\alpha$ -actinina), onde observa-se que a hipertrofia induzida pela ET-1 foi prevenida pelo tratamento com E2.

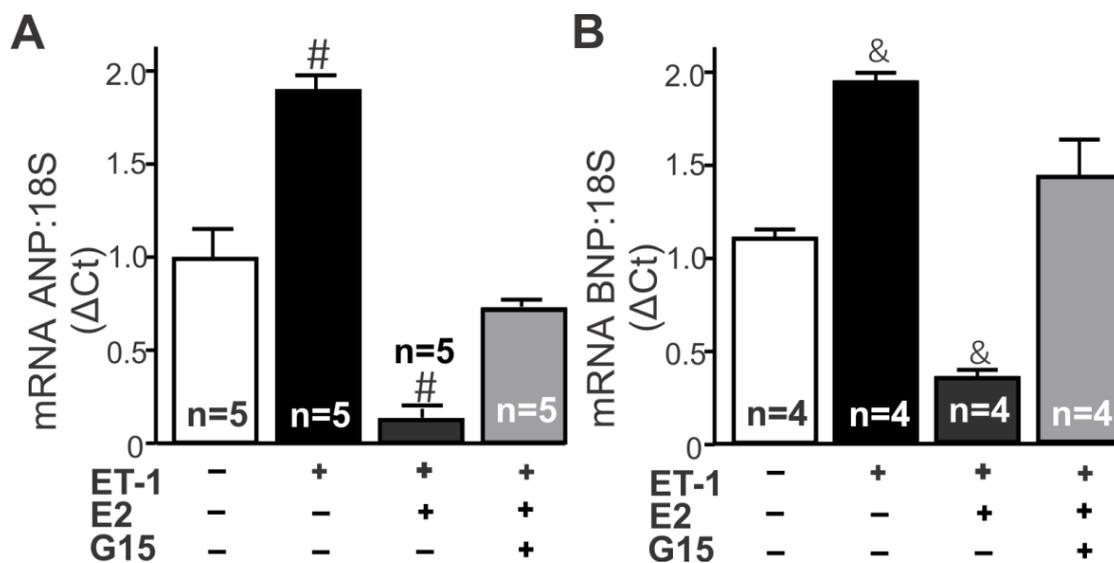
Na Figura 6B, a medida quantitativa da área destas células é mostrada. O efeito do E2 prevenindo o aumento da área dos cardiomiócitos pela ET-1 foi significativo, normalizando para valores iguais ao grupo controle. Como este tratamento prévio com E2 foi capaz de reduzir o efeito hipertrófico da ET-1, iniciamos então, a investigação do GPER1 como possível mediador destes efeitos. Mesmo na presença do E2, o grupo tratado com o antagonista do GPER1 apresentou aumento na área dos cardiomiócitos para valores similares ao grupo ET-1. O bloqueio do GPER1 via G15 promoveu a perda dos efeitos anti-hipertróficos do E2.

Os peptídeos natriuréticos ANP e BNP são amplamente usados como marcadores para caracterizar o perfil hipertrófico em miócitos cardíacos (YANG et al., 2015). Neste trabalho, a

análise da expressão de RNA mensageiro indicou que o tratamento com ET-1 foi capaz de aumentar a expressão de mRNA de ambos, ANP e BNP, como pode ser observado na figura 7A-B. Estes dados confirmam o perfil hipertrófico observado em nosso experimento. O pré tratamento com E2 preveniu o aumento na expressão de mRNA desses peptídeos para níveis ainda menores que o controle. Observamos ainda, que o GPER1 parece estar envolvido nesse efeito visto que, com o seu bloqueio, os níveis de mRNA do ANP e BNP foram maiores comparados com o grupo pré tratado com E2.



**Figura 6. Antagonista do GPER1, G15, reverte o efeito anti-hipertrófico do E2 em cardiomiócitos.** **A.** Imagens representativas do confocal mostrando a marcação para  $\alpha$ -actinina e DAPI (núcleo) em cardiomiócitos de fêmeas neonatas com 1-3 dias de vida. Barra = 10  $\mu$ m. **B.** Gráfico de barra representando o aumento significativo na área de superfície celular após o tratamento dos cardiomiócitos com ET-1, o qual foi prevenido pela co-incubação com E2. O tratamento com G15, antagonista do GPER1, resultou em atenuação dos efeitos anti-hipertróficos do E2. n indica o número de cardiomiócitos analisados. Os dados apresentados são resultantes de pelo menos três experimentos independentes. \* $p < 0.05$  comparado aos grupos controle e ET-1+E2.



**Figura 7. Participação dos peptídeos natriuréticos ANP e BNP na hipertrofia induzida por ET-1.** **A e B.** Expressão aumentada do mRNA para o peptídeo natriurético atrial e do tipo B (ANP and BNP) foi induzida pelo tratamento com ET-1 e inibida pelo tratamento com E2. Os efeitos do E2 foram atenuados na presença do G15. Os dados apresentados são resultantes de pelo menos três experimentos independentes. n representa o número de amostras analisadas pela técnica de qPCR. #  $p < 0.05$  comparado aos demais grupos.

#### 4.1.2 VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA HIPERTROFIA DE CARDIOMIÓCITOS: BLOQUEIO DO EFEITO DO ESTRADIOL POR G15

Nós seguimos investigando as vias envolvidas no efeito hipertrófico da ET-1 e que seriam provavelmente alvo de inibição pelo E2. Nossos resultados indicaram a participação efetiva do GRK5 neste efeito, como pode ser observado na figura 8A-B.

Através da análise da densidade de marcação da GRK5 no núcleo e citoplasma, foi possível avaliar a razão núcleo citoplasma, que indica a translocação nuclear da GRK5. Nossos resultados sugerem que a translocação da GRK5 para o núcleo no grupo tratado com ET-1 pode estar mediando seus efeitos hipertróficos (Figura 8A-B). Além disso, essa translocação foi revertida no grupo tratado com E2. O tratamento com G15 não alterou este padrão, apresentando apenas uma tendência de ser maior que o grupo pré-tratado com E2.

Para testar se as isoformas de MAPK participam na hipertrofia induzida por ET-1, a expressão de ERK1/2 foi analisada por *Western blot*.

Como observado na figura 9, o tratamento com ET-1 produziu aumento significativo na expressão de ERK1/2 e o mesmo foi abolido pelo pré-tratamento com o E2. Nossos dados revelaram ainda que no grupo tratado com G15, a expressão de ERK1/2 é maior que o grupo pré-tratado com E2. Em conjunto, nossos resultados revelaram que a ativação da ERK induzida por ET-1 foi suprimida por E2, podendo este efeito ser parcialmente mediado pelo GPER1. Nós ainda testamos neste experimento, um antagonista para GPER1 desenvolvido mais recentemente que o G15, o G36. Este antagonista, assim como o G15 apresentou efeito sobre a expressão da ERK1/2, impedindo a redução da expressão desta pelo E2.

A proteína serina/treonina quinase Akt é um importante mediador da sinalização da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e regula uma grande variedade de funções celulares em diferentes tecidos. Nossos resultados (Figura 10) mostram uma participação importante da proteína Akt nos efeitos do E2.

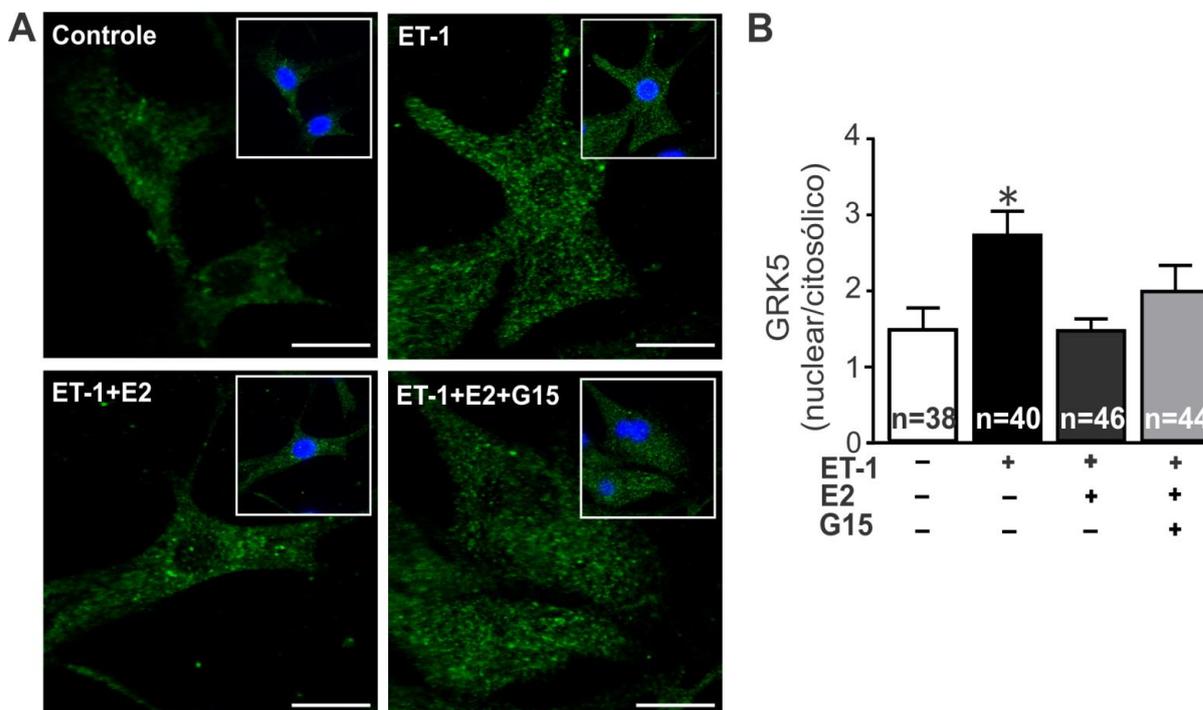
A expressão da Akt diminuída no grupo ET-1 foi revertida pelo pré-tratamento com E2. Este efeito do E2 pode contribuir para o entendimento de como sua sinalização contribuiu para reversão da hipertrofia ativada pela ET-1. Além disso, o E2 perdeu parcialmente seu

efeito no aumento da expressão de Akt quando o GPER1 foi bloqueado. Quanto ao G36, este antagonista apresentou efeito mais pronunciado que o G15 na redução da expressão da Akt fosforilada, o que corrobora dados indicando maior afinidade desta droga ao GPER1. Mais uma vez, este receptor parece estar envolvido nas ações do E2 em cardiomiócitos hipertrofiados.

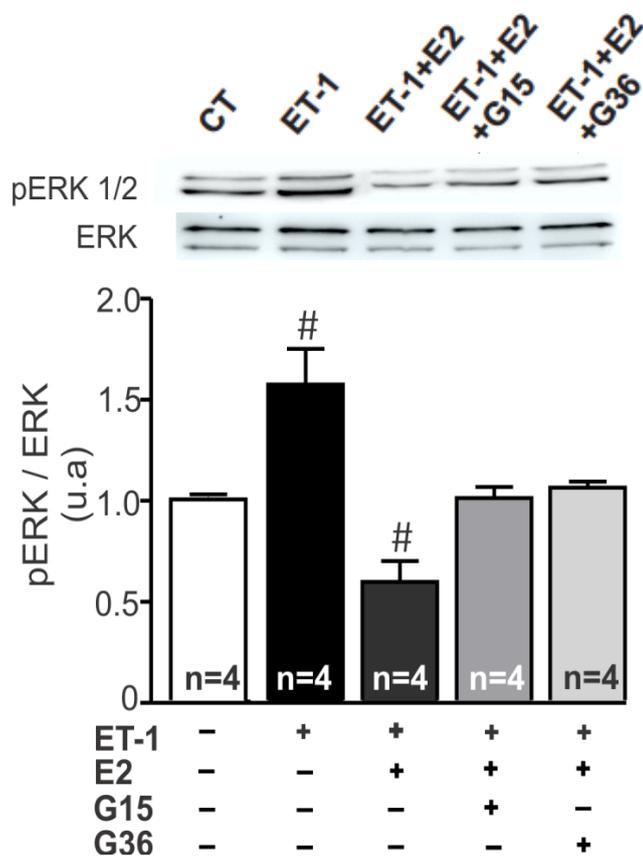
A proteína PDK1 que é efetora na cascata de ativação da Akt, foi também avaliada por *Western blot* como pode ser observado na figura 11.

A participação da PDK1 fosforilada confirma a via de ativação da Akt participando nos efeitos protetores exercidos pelo E2. Na figura 11, observa-se que a redução da expressão da PDK1 fosforilada no grupo tratado com ET-1, coincidiu com a redução da Akt no mesmo grupo. Da mesma forma, o aumento na expressão da Akt fosforilada coincidiu com o aumento da expressão da PDK1 fosforilada no grupo pré-tratado com E2.

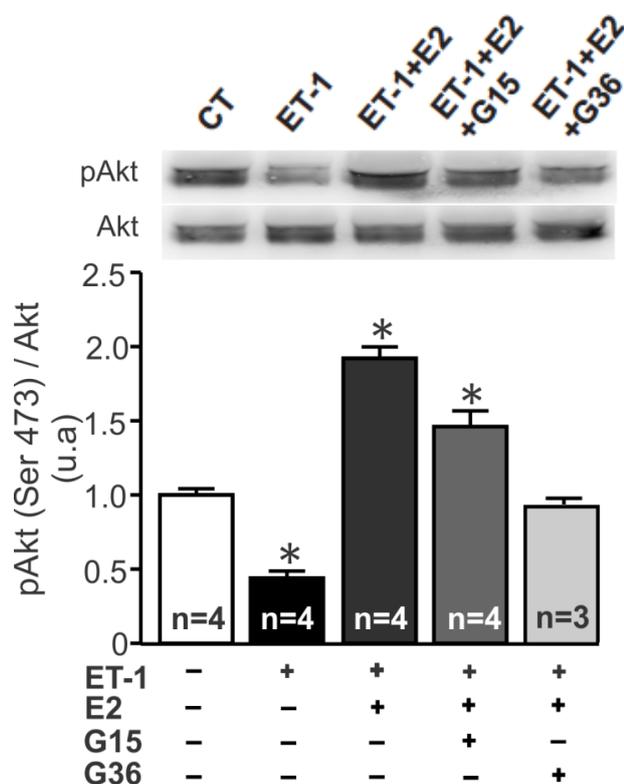
Tanto para a expressão da Akt quanto para PDK1, a participação do GPER1 foi importante, pois, com o bloqueio deste, houve uma redução na expressão destas proteínas mesmo na presença do E2. A redução da Akt fosforilada foi parcialmente reduzida quando as células foram tratadas com G15, indicando a participação de outros receptores de E2 nesse processo. Apesar disso, a redução na expressão da PDK1 fosforilada foi totalmente dependente do GPER1, como observado nos grupos tratados com G15 ou G36.



**Figura 8. Contribuição do E2 na reversão da sinalização de vias hipertróficas. A.** Imagens representativas de microscopia confocal marcando o GRK5 (verde) e DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole*; azul). **B.** Gráfico de barra representando a localização nuclear do GRK5. O aumento da razão de GRK5 nuclear observado no grupo tratado com ET-1, foi completamente abolido pelo co-tratamento com E2, e esta supressão da translocação nuclear de GRK5 mediada pelo E2 não foi afetada pelo tratamento com G15. Barra = 10  $\mu$ m. Cada grupo representa dados de pelo menos 3 experimentos independentes. \* $p < 0.05$  comparado aos demais grupos.

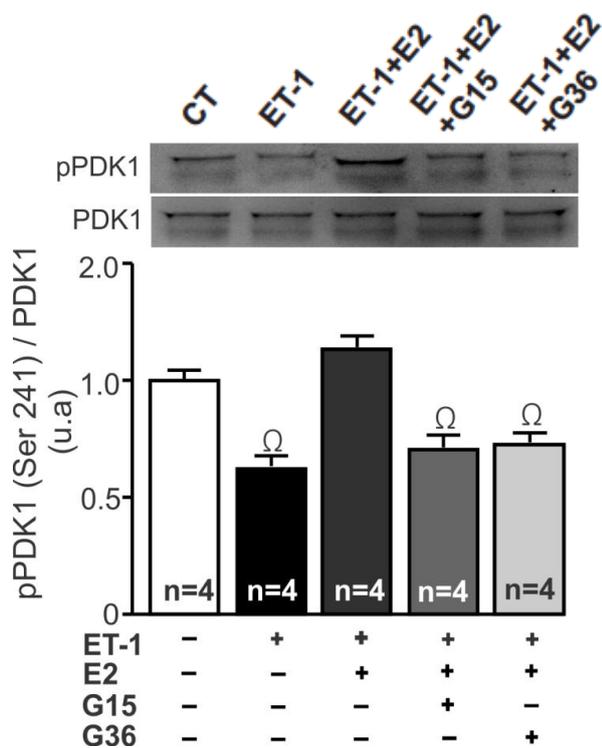


**Figura 9. E2 reverte o aumento da fosforilação da ERK1/2 induzida pela ET-1.** O tratamento com ET-1 induziu aumento significativo na expressão da ERK1/2 fosforilada e a co-incubação com E2 reduziu esta expressão para níveis menores que o controle. O tratamento com G15 ou G36, ambos inibidores do GPER1, reduziram o efeito do E2. Na parte superior, está a imagem representativa de *Western blot*. Na parte inferior, a quantificação da fosforilação da ERK1/2 em unidades arbitrárias. #  $p < 0.05$  comparado aos demais grupos.



**Figura 10. Sinalização protetora do E2 aumenta a expressão da pAkt e é dependente do GPER1.**

Na parte superior da figura está a imagem representativa de *Western blot*. Na parte inferior, estão os valores de densitometria em unidades arbitrárias. O tratamento com ET-1 reduziu a fosforilação da Akt e o efeito foi completamente revertido pelo E2. Este efeito do E2 foi parcialmente bloqueado pela co-incubação com G15 e totalmente bloqueado pela co-incubação pelo G36. n = número de amostras analisadas. Pelo menos 3 experimentos independentes foram realizados. \* $p < 0.05$  comparado aos demais grupos.



**Figura 11. Aumento da expressão da pPDK1 pelo tratamento com E2 é dependente do GPER1.**

O tratamento com E2 reverteu a expressão reduzida da pPDK1 em células tratadas com ET-1. Este efeito foi abolido pela co-incubação com os antagonistas de GPER1, G15 ou G36, indicando a participação deste receptor no efeito protetor mediado pelo E2. n = número de amostras analisadas. Pelo menos 3 experimentos independentes foram realizados.  $\Omega p < 0.05$  comparado ao grupo controle e ET-1+E2.

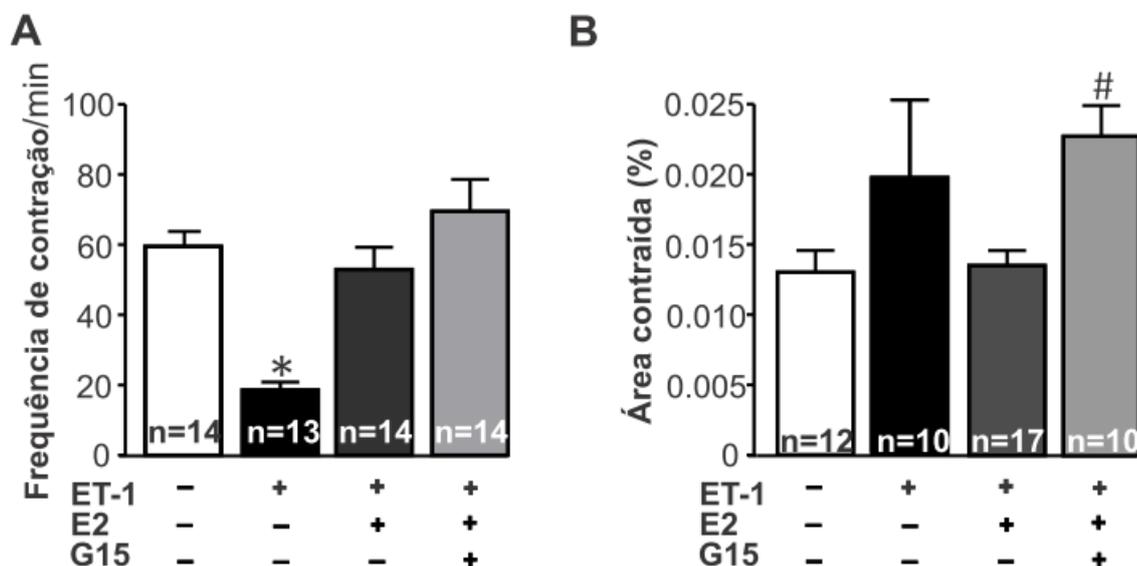
### 4.1.3 CONTRATILIDADE DOS CARDIOMIÓCITOS TRATADOS COM ET-1 E EFEITOS DO E2

O envolvimento do E2 na função cardíaca, especialmente em efeitos cronotrópicos e inotrópicos, tem sido indicado em alguns trabalhos, mas os mecanismos ainda não são definidos. Considerando estes achados, investigamos se E2 poderia exercer alguma modificação no padrão contrátil em cardiomiócitos hipertrofiados. Inicialmente, observamos que a ET-1 promoveu uma diminuição significativa da frequência de batimento das células, como pode ser observado na figura 12A.

Ainda é incerto por quais mecanismos a ET-1 promove tal redução no padrão de contração das células. Curiosamente, o tratamento prévio com E2 restaurou a frequência de contração nestas células. Para este parâmetro, o bloqueio do GPER1 não alterou o efeito do E2. Por isso, acredita-se que outros receptores, como o ER $\alpha$  e ER $\beta$  possam estar mediando os efeitos cronotrópicos positivos do E2.

Os efeitos do E2 na contratilidade da membrana também foram avaliados quanto ao parâmetro da área de contração da membrana (Figura 12B). Apesar de a ET-1 não ter promovido mudanças significativas, observa-se uma tendência para o aumento da porcentagem da área contraída. O tratamento prévio com E2 não alterou este parâmetro, no entanto, o bloqueio do GPER1 levou ao aumento significativo quando comparado ao controle e grupo ET-1+E2, demonstrando assim, que este receptor previne o aumento da mobilidade da membrana, uma segunda análise obtida através dos vídeos de frequência de contração.

Este resultado, pode indiretamente mostrar a intensidade de contração destas células. A participação do GPER1 neste evento foi de grande importância visto que o seu bloqueio com G15 aboliu os efeitos do E2 na força de contração. São recentes os achados de que receptores de estradiol podem modular a intensidade de contração em cardiomiócitos e por isso, tais efeitos devem ser investigados.



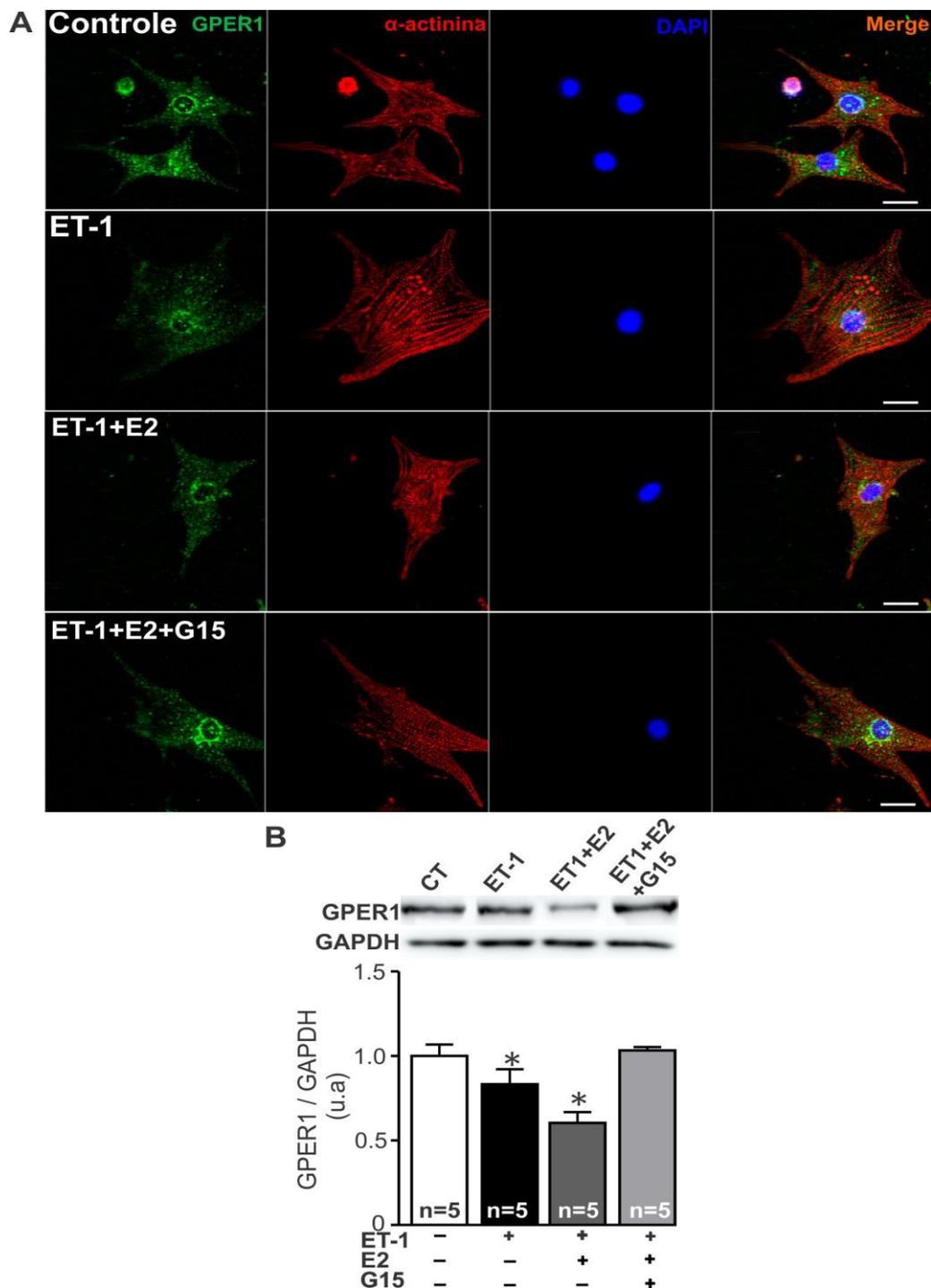
**Figura 12. E2 reverte a diminuição da frequência de contração induzida pela ET-1 em cardiomiócitos. A.** A ET-1 reduziu significativamente a frequência de contração dos cardiomiócitos. A quantificação da frequência de contração dos cardiomiócitos foi realizado através de vídeos com 1 minuto de duração em cada região sincicial. *n* = número de regiões analisadas por grupo. Este efeito foi prevenido pela co-incubação com E2e não foi mediado pelo GPER1. **B.** O gráfico representa a porcentagem de área contraída dos cardiomiócitos. Esta análise permite quantificar a força de contração dessas células através de uma análise da diferença de deslocamento da membrana durante a contração. O tratamento com E2 não alterou a porcentagem de contração em relação ao grupo controle. O grupo tratado com ET-1 apresentou uma tendência a aumento na porcentagem de contração, mas sem significância estatística. O bloqueio do receptor GPER1com G15 causou aumento significativo na porcentagem de contração. *n* = número de regiões analisadas por grupo. \**p* < 0.05 comparado aos demais grupos; # *p* < 0.05 comparado ao grupo controle e ET-1+E2.

#### 4.1.4 IMUNOLOCALIZAÇÃO DO GPER1 EM CARDIOMIÓCITOS

O padrão de expressão do GPER1 nos diferentes grupos foi avaliado por imunofluorescência e *western blot* (Figura 13A-B).

Na figura 13A observamos a expressão do GPER1 pela marcação na coloração verde. A imunolocalização demonstra que este receptor é expresso de forma difusa na membrana citoplasmática, mas é marcadamente localizado na região perinuclear.

Através da análise de expressão deste receptor, observa-se na figura 13B que o tratamento com ET-1 ou E2 reduziu a expressão do GPER1, enquanto que o tratamento com o antagonista G15 reverteu essa diminuição. Este efeito do E2 pode ser resultante da regulação que o ligante induz no receptor, ou seja, um excesso do ligante E2 pode ter induzido *downregulation* de seu receptor, o que fisiologicamente é esperado nessas condições. Interessante foi que, mesmo nessa condição com menor expressão do GPER1, o E2 foi capaz de reverter as vias hipertróficas ativadas pela ET-1. A expressão reduzida do GPER1 no grupo tratado com ET-1 pode participar dos mecanismos hipertróficos desenvolvidos nesse grupo.



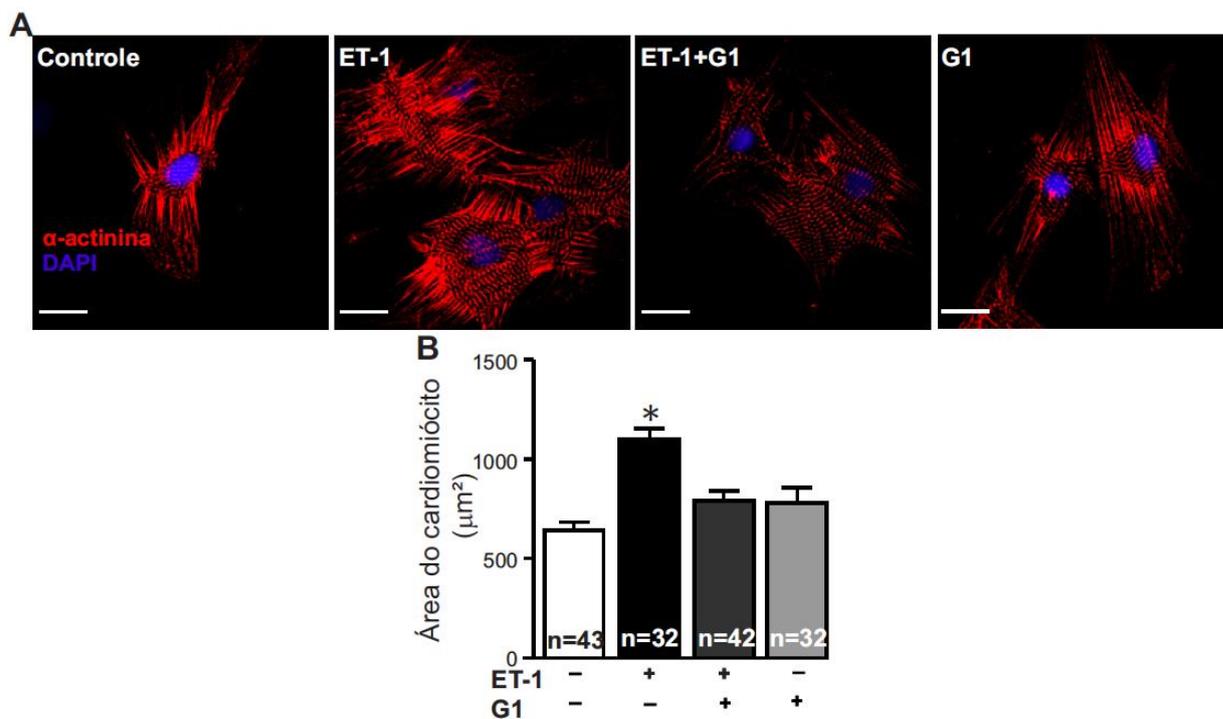
**Figura 13.** G15 previne *downregulation* do GPER1 induzida pelo tratamento com E2 em cardiomiócitos tratados com ET-1. **A.** Imagens representativas em microscopia confocal de cardiomiócitos de ratas neonatas corados para  $\alpha$ -actinina (vermelho) e GPER1 (verde). O núcleo foi corado com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). GPER1 foi predominantemente localizado na região perinuclear e também, apresentando marcação dispersa no citosol. Barra = 10  $\mu$ m. **B.** Análise

do *Western blot* indica que ET-1 e E2 resultou em expressão diminuída do GPER1 e que foi restabelecida pelo tratamento com o antagonista do GPER1, G15. Acima do gráfico, imagens representativas do *western blot*. O gráfico representa a quantificação da expressão das bandas para GPER1 em unidades arbitrárias e normalizadas pela expressão do GAPDH.  $n$  = número de amostras analisadas.  $*p < 0.05$  comparado aos demais grupos.

## **4.2 ATIVAÇÃO DO GPER1 PELO AGONISTA G1 REVERTE A HIPERTROFIA DE CARDIOMIÓCITOS INDUZIDA PELA ENDOTELINA 1 (ET-1)**

### **4.2.1 PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS DE CARDIOMIÓCITOS ATIVADOS POR G1**

Para confirmar a participação do GPER1 no efeito anti-hipertrófico do E2, foi realizada sua ativação usando-se o seu agonista G1 (Figura 14A-B). Assim, observamos que o tratamento prévio com G1, impediu o efeito hipertrófico da ET-1, o que confirma a participação desse receptor na prevenção da hipertrofia do cardiomiócito. Esse efeito do G1 foi similar ao observado com o pré tratamento com E2. O tratamento somente com G1 não alterou o padrão de área celular.



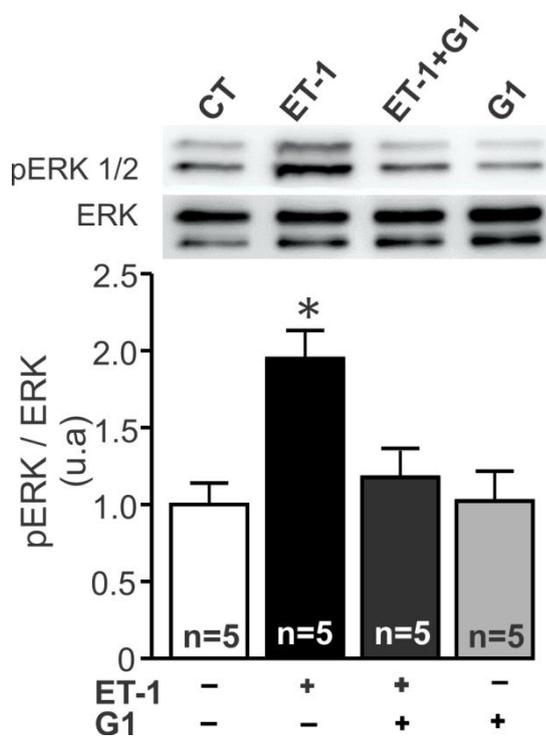
**Figura 14. Agonista do GPER1, G1, reverte o efeito hipertrófico da ET-1 em cardiomiócitos. A.** Imagens representativas do confocal mostrando a marcação para  $\alpha$ -actinina (vermelho) e DAPI (núcleo) em cardiomiócitos de fêmeas neonatas com 1-3 dias de vida. Barra = 10  $\mu$ m. **B.** Gráfico de barra representando o aumento significativo na área de superfície celular após o tratamento dos cardiomiócitos com ET-1, o qual foi prevenido pela co-incubação com G1. O tratamento com G1, um agonista do GPER1, resultou em reversão total dos efeitos hipertróficos da ET-1. n indica o número de cardiomiócitos analisados. Os dados apresentados são resultantes de pelo menos três experimentos independentes. \* $p < 0.05$  comparado aos demais grupos.

#### **4.2.2 VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA HIPERTROFIA DE CARDIOMIÓCITOS: EFEITO DO G1**

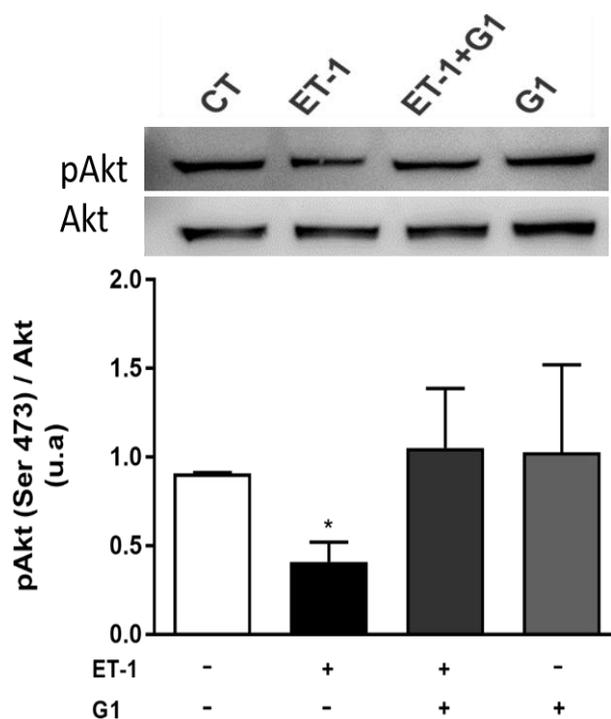
A participação de vias de sinalização tais como, da ERK1/2 e Akt no processo hipertrófico são classicamente descritas, mas, existem dados diferentes a depender do modelo utilizado para indução do processo patológico. A análise dessas vias na condição onde o GPER1 foi bloqueado, mostrou influência significativa dessas vias na prevenção da hipertrofia induzida pelo E2. Assim, testamos se a ativação do GPER1, utilizando o G1, poderia modular estas vias (Figuras 15 e 16).

O aumento da ativação de ERK1/2, como demonstrado na figura 15, foi prevenida pelo tratamento das células com o G1. Este dado, se correlaciona com as ações do E2 como observado nos experimentos anteriores. Assim, podemos considerar que quanto aos efeitos na sinalização dessa via envolvida na sinalização hipertrófica, o G1 ou E2 apresentaram efeitos similares. Apesar desse efeito do G1, quando o mesmo foi administrado sozinho no cultivo, não houve modificação no padrão de fosforilação da ERK1/2.

Já a fosforilação da Akt, foi menos sensível ao tratamento com G1, como pode ser observado na figura 16. A redução da fosforilação da Akt induzida por ET-1, não foi revertida pelo tratamento com G1 e nem sofreu alteração quando o G1 foi administrado sozinho ao cultivo. A diferença na atividade da Akt frente ao tratamento com E2 e com G1 pode ser resultado da ativação de diferentes proteínas a depender do agonista.



**Figura 15. Agonista do GPER1 reverte o aumento da fosforilação da ERK1/2 induzida pela ET-1.** O tratamento com ET-1 induziu aumento significativo na expressão da ERK1/2 fosforilada e a co-incubação com G1 normalizou esta expressão. A incubação apenas com o G1 não alterou a área de superfície das células. Na parte superior, está a imagem representativa de *Western blot*. Na parte inferior, a quantificação da fosforilação da ERK1/2 em unidades arbitrárias. \*  $p < 0.05$  comparado aos demais grupos.



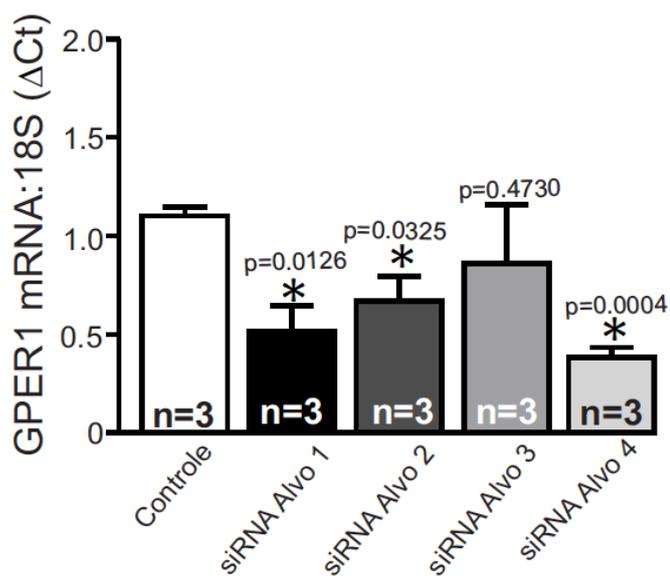
**Figura 16. Redução da expressão pAkt induzida pela ET-1 não foi alterada pelo tratamento com G1.** Na parte superior da figura, está a imagem representativa de *Western blot*. Na parte inferior, estão os valores de densitometria em unidades arbitrárias. O tratamento com ET-1 promoveu redução da fosforilação da Akt. O efeito da ET-1 não foi bloqueado pela co-incubação com G1.  $n = 5$ . Pelo menos 3 experimentos independentes foram realizados.  $*p < 0.05$  comparado ao grupo controle.

### **4.3. SILENCIAMENTO DO GPER1 POR RNA DE INTERFERÊNCIA (siRNA) REVERTE O EFEITO DE E2 NA HIPERTROFIA DE CARDIOMIÓCITOS INDUZIDA PELA ENDOTELINA 1 (ET-1)**

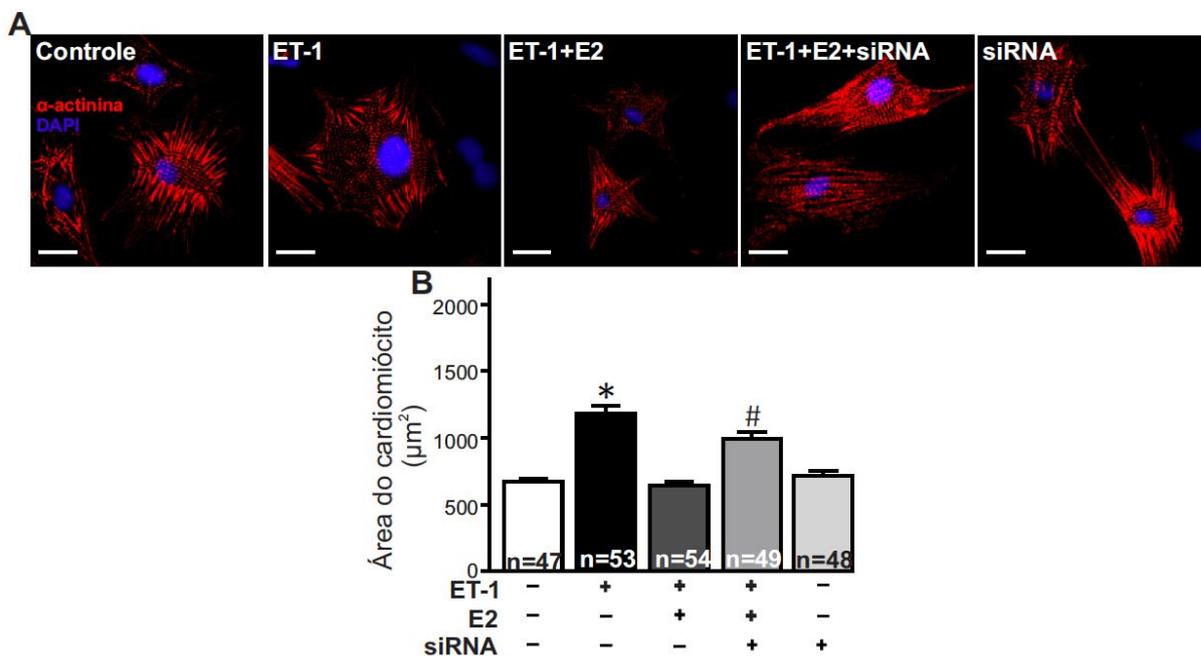
O silenciamento do GPER1 foi realizado utilizando-se RNA de interferência (siRNA) com o objetivo de se confirmar os resultados anteriores. Inicialmente foram testadas 4 sequências alvo do gene para GPER1. A escolha da melhor sequência para silenciamento foi feita através da análise da expressão do mRNA para GPER1 com a técnica do *Real-Time-PCR* (figura 17).

O silenciamento da sequência alvo 4 no gene do GPER1 foi o que produziu redução mais significativa do GPER1, representando 65% de silenciamento. A porcentagem de silenciamento dos alvos 1, 2 e 3 foram, respectivamente: 53%, 39% e 22%. Assim, o alvo 4 foi escolhido para o experimento de silenciamento e análise da área celular dos cardiomiócitos.

Na figura 18A-B está representada a área dos cardiomiócitos. Nela, observamos novamente que o pré tratamento com E2 reverteu a hipertrofia induzida por ET-1. O silenciamento de 65% nos cardiomiócitos. O silenciamento do GPER1 reverteu o efeito do pré-tratamento com E2.. Nenhuma alteração na área celular dos cardiomiócitos foi observada com o uso do siRNA sozinho.



**Figura 17. Análise da expressão do mRNA para definição do melhor alvo para silenciamento do GPER1.** A análise da expressão de mRNA para GPER1 mostrou que o silenciamento do alvo 4 foi o que produziu redução mais significativa do receptor. Assim, a sequência do alvo 4 foi utilizado nos experimentos de silenciamento do GPER1. \* $p < 0.05$  comparado ao grupo controle.



**Figura 18. O silenciamento do GPER1 reverte a ação anti-hipertrofica do E2.** **A.** Imagens representativas do confocal mostrando a marcação para  $\alpha$ -actinina e DAPI (núcleo) em cardiomiócitos de ratos neonatas com 1-3 dias de vida. Barra = 10  $\mu$ m. **B.** Gráfico de barra representando o aumento significativo na área de superfície celular após o tratamento dos cardiomiócitos com ET-1, o qual foi prevenido pela co-incubação com E2. O silenciamento do GPER1 reverteu o efeito anti-hipertrofico do E2. O tratamento das células apenas com o siRNA não alterou o padrão de área celular dos cardiomiócitos. n indica o número de cardiomiócitos analisados. Os dados apresentados são resultantes de pelo menos três experimentos independentes. \* $p < 0.05$  comparado aos demais grupos; # $p < 0.05$  comparado aos demais grupos.

## 5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi demonstrada a participação do GPER1 na atividade anti-hipertrofica do E2 em modelo de hipertrofia de cardiomiócitos induzida por ET1. A ET-1 produziu um padrão hipertrofico satisfatório a uma concentração de 100 nM. Esse padrão, serviu de modelo em nosso estudo, onde foi possível avaliar os efeitos do E2 e seu receptor de membrana em uma condição clássica de ativação de vias hipertroficas.

Outros estudos demonstraram esse efeito da ET-1 na indução da hipertrofia (MALIK et al., 2015; TANAKA et al., 2014). A ET-1 atua nos cardiomiócitos ativando a transcrição de genes envolvidos na proliferação celular. Além disso, o sistema cardiovascular, em especial, os cardiomiócitos, são locais de síntese e ação da ET-1, atuando principalmente de maneira parácrina ou autócrina (AGAPITOV; HAYNES, 2002; RUBANYI; POLOKOFF, 1994). Essa sinalização da ET-1 está envolvida na hipertrofia de cardiomiócitos e no desenvolvimento de fibrose e ativação de processos inflamatórios no tecido cardíaco, bem como atuando de maneira sistêmica na indução de vasoconstrição acentuada (ALLEN et al., 2003; NUNEZ et al., 1990; SUZUKI; KUMAZAKI; MITSUI, 1993). Por esse motivo, a droga é amplamente utilizada em estudos que visam a investigação da hipertrofia no sistema cardiovascular.

Neste trabalho, o tratamento com E2 preveniu o aumento da área dos cardiomiócitos induzido por ET-1. A atividade anti-hipertrofica do E2 foi demonstrada anteriormente em estudos *in vivo* e *in vitro*. Pedram e colaboradores (2013) investigaram os efeitos do E2 na prevenção da hipertrofia desenvolvida em cardiomiócitos induzida por Ang II. Foi demonstrado que o 17- $\beta$ -Estradiol e também um ligante específico do ER $\beta$  foram capazes de prevenir a hipertrofia (PEDRAM et al., 2013). O estudo citado acima, demonstrou que o E2 foi capaz de prevenir o aumento na atividade/fosforilação da classe I das HDAC, responsáveis pela sinalização hipertrofica induzida pela Ang II. A participação do ER $\beta$  também foi relacionada ao efeito cardioprotetor exercido pelo E2 em condições de hipóxia em cardiomiócitos adultos. A expressão do mRNA para este receptor foi aumentada na hipóxia (0.5% O<sub>2</sub>) e normalizada na normóxia (21% O<sub>2</sub>) (CUNNINGHAM et al., 2016), mostrando assim uma modulação do receptor nas condições de estresse cardíaco.

Corroborando a atividade anti-hipertrófica do E2, observada em nosso trabalho, outro estudo mostrou que *in vivo*, este efeito protetor também acontece (VAN EICKELS et al., 2001). Sob estimulação da sobrecarga circulatória após constrição transversa da aorta (TAC), o tratamento com E2 reverteu a hipertrofia em fêmeas ovariectomizadas. Nesses animais, o aumento da massa ventricular foi revertido com o tratamento com E2 por até 8 semanas. Quanto a sinalização hipertrófica modulada pelo E2, este estudo demonstrou que o mesmo foi capaz de reverter o aumento da fosforilação das MAPK (p38-mitogen-activated protein kinase), mas sem alteração na fosforilação da ERK1/2 e JNK. Nesse mesmo trabalho, a TAC aumentou a expressão de ANP e esta expressão foi ainda maior com o tratamento com E2. Wang e colaboradores (2012) também demonstraram que o tratamento com G1 em fêmeas ovariectomizadas melhorou a função cardíaca e reduziu a hipertrofia de cardiomiócitos nesses animais (WANG et al., 2012).

Estes estudos em modelos *in vivo* ou *in vitro* mostram uma atividade cardioprotetora do E2 e apontam para diversas vias de sinalização que podem ser moduladas por esse hormônio.

Este estudo mostrou que o bloqueio do GPER1 pelo G15 promoveu a perda dos efeitos anti-hipertróficos do E2. Pouco se sabe sobre a participação de GPER1 nos efeitos cardioprotetores do E2 (SHEN et al., 2014). A maioria dos trabalhos, até o momento, apontaram para o ER $\beta$  como o principal mediador das ações anti-hipertróficas do E2 (BABIKER et al., 2006; SKAVDAHL et al., 2005). Skavdahl e colaboradores (2005) demonstraram que camundongos fêmeas *knockout* para ER $\beta$  apresentaram hipertrofia cardíaca bem mais acentuada quando submetidas a TAC quando comparadas às *knockout* para ER $\alpha$ . Neste trabalho, o fato de o GPER1 estar envolvido na prevenção do aumento da área dos cardiomiócitos indica a importância de se estudar este receptor e as vias ativadas por ele em condições hipertróficas.

A via dos peptídeos natriuréticos é amplamente usada para descrever ou caracterizar o perfil hipertrófico em miócitos cardíacos (YANG et al., 2015). Estes peptídeos são liberados sob estímulo de sobrecarga circulatória em que, há um aumento na pressão ventricular. Esse aumento pressórico, funciona como estímulo mecânico para a liberação dos peptídeos (DEL RY; CABIATI; CLERICO, 2014). Os dados demonstraram, através da análise da expressão

de RNA mensageiro, que o tratamento com ET-1 foi capaz de aumentar a expressão de mRNA de ambos ANP e BNP. A redução na expressão do ANP e BNP induzida pelo E2, foi também mediada pelo GPER1, corroborando os dados de hipertrofia avaliados anteriormente. Acredita-se que esses peptídeos podem promover a ativação de mecanismos anti-hipertrofos em cardiomiócitos tratados com ET-1 e/ou sinalizar um aumento de área celular, funcionando como marcadores.

Outros trabalhos da literatura, mostram um efeito do E2, estimulando a expressão dos peptídeos natriuréticos. A maioria destes estudos foram realizados em condições de pós menopausa ou mesmo em mulheres em idade fértil (MAFFEI et al., 1999, 2001), mas sem estímulo patológico. No presente estudo, o tratamento com E2 reduziu significativamente a expressão do ANP e BNP para valores até menores que o controle. Apesar de parecerem conflitantes, acredita-se que sob estímulos patológicos, como a ET-1, o E2 possa atuar de forma a contrabalancear as vias hipertrofos e, assim, reduzir os marcadores de hipertrofia, tais como os peptídeos natriuréticos.

Alguns trabalhos demonstraram que a ativação da sinalização do BNP leva a formação do segundo mensageiro GMPC, ativando proteínas efetoras, as quais levariam ao efeito compensatório para reversão da hipertrofia (DEL RY; CABIATI; CLERICO, 2014). No entanto, observou-se que os níveis de mRNA dos peptídeos permaneceu elevado após o tratamento por 48 horas no grupo tratado com ET-1+E2+G15. Provavelmente, esses peptídeos por si só não são capazes de reverter a hipertrofia induzida por ET-1, mas participam na sinalização da ativação de vias anti-hipertrofos. Nossos dados mostram que o GPER1 parece estar envolvido na redução da expressão dos peptídeos natriuréticos o que coincidiu também com seu efeito sobre a área celular.

A análise da marcação do GPER foi realizada por imuno-histoquímica. A imunolocalização mostrou um padrão intenso de expressão do GPER1 na região perinuclear, demonstrando que este receptor é expresso na membrana citoplasmática, mas é marcadamente localizado na região perinuclear. Por outra técnica, *Western Blot*, observou-se que o tratamento com E2 reduziu a expressão do GPER1, enquanto a utilização do antagonista G15 reverteu essa diminuição. Este efeito das drogas, pode ser resultante da regulação que o ligante induz no receptor, ou seja, o excesso do ligante E2 pode ter induzido a *downregulation*

de seu receptor, o que fisiologicamente é esperado nessas condições. Interessante foi que, mesmo nessa condição com menor expressão do GPER1, o E2 foi capaz de reverter as vias hipertróficas ativadas pela ET-1.

A análise de dados referentes à expressão deste receptor é complexa, pois deve ser considerada sua marcação nos diferentes compartimentos celulares, o que pode indicar atividade diferenciada deste. Já foi demonstrado, que este receptor é imunolocalizado de diferentes formas a depender do tipo celular (AKAMA et al., 2013; SANDÉN et al., 2011). Em cardiomiócitos, pouco se conhece sobre sua localização subcelular. Revankar e colaboradores (2005), analisaram a localização intracelular do GPER1 em células COS7 (fibroblasto do rim de macacos). Através da marcação do receptor com uma proteína fluorescente verde (GFP), o grupo demonstrou que este receptor está localizado no envelope nuclear, ligado ao retículo endoplasmático e complexo de Golgi. Entretanto, não foi observada co-localização do GPER1 no citoesqueleto de actina e mitocôndria (REVANKAR et al., 2005b).

Alguns autores têm sugerido que as vias de sinalização evocada pelo GPER1 podem depender da localização intracelular deste receptor. Portanto, consideramos que no presente estudo, a abordagem futura mais detalhada sobre a localização do GPER1 em cardiomiócitos hipertrofiados e tratados com E2 poderá enriquecer a compreensão dos efeitos do E2 mediados por este receptor de membrana.

O envolvimento do E2 na função cardíaca, especialmente em efeitos cronotrópicos e inotrópicos, tem sido indicado em alguns trabalhos, mas os mecanismos ainda não são definidos. Os dados deste trabalho mostraram que a ET-1 promoveu uma diminuição significativa da frequência de batimento das células.

Ainda é incerto por quais mecanismos a ET-1 promove tal redução no padrão de contração das células. Alguns autores sugerem que poderia envolver a mobilização de cálcio, o que acontece principalmente em condições patológicas (SEO et al., 2014; YAMAMURA, 2014). Ono e colaboradores (2001) mostraram que a ET-2 tem efeito cronotrópico negativo em células do nó sinoatrial de coelhos. Este efeito da ET-1 foi ainda associado com um aumento na extensão (tempo) do potencial de ação de maneira dependente do receptor ET<sub>A</sub>.

Assim, os investigadores utilizaram a técnica de *voltage-clamp* do tipo *whole-cell*, para avaliar as correntes envolvidas no efeito mediado pela ET-1 (ONO et al., 2001). Através destas análises, os autores concluíram que o efeito inibitório da ET-1 na contração de células sinoatriais, era através de sua ação, inibindo as correntes de cálcio ( $I_{Ca2+L}$ ) e potássio ( $I_k$ ). A ação sobre a corrente  $I_k$ , culminou na lentificação da repolarização do potencial de ação nestas células. Também, já foi demonstrado que esta ação da ET-1 é independente do NO, visto que a adição de *N-nitro-L-arginine methyl ester* (L-NAME), um inibidor da NO sintase, não alterou os feitos da ET-1 (ZHU; YANG; ENDOH, 1997).

Curiosamente, em nosso trabalho, o tratamento prévio com E2 restaurou a frequência de contração nestas células. Para este parâmetro, o bloqueio do GPER1 não alterou o efeito do E2. Por isso, acredita-se que outros receptores, como o ER $\alpha$  e ER $\beta$  possam estar mediando os efeitos cronotrópicos positivos do E2. O interesse em estudos envolvendo mecanismos explicando como o E2 pode exercer efeitos positivos nesta condição ajudaria na compreensão da modulação exercida por estrogênios em miócitos cardíacos.

Apesar de a ET-1 não ter promovido mudanças significativas na amplitude de mobilidade da membrana, observa-se uma tendência para o aumento da porcentagem da área contraída. O tratamento prévio com E2 não alterou este parâmetro, no entanto, o bloqueio do GPER1 levou a um aumento significativo quando comparado ao controle e grupo ET-1+E2, demonstrando assim, que este receptor pode prevenir o aumento da mobilidade da membrana em cardiomiócitos.

Este resultado pode, indiretamente, mostrar a intensidade de contração destas células. A participação do GPER1 neste evento foi de grande importância visto que, o bloqueio deste com G15 aboliu os efeitos do E2 na força de contração. São recentes os achados de que receptores de estradiol podem modular a intensidade de contração em cardiomiócitos. Vigne e colaboradores, em 1989, já haviam demonstrado que a ET-1 era capaz de produzir efeito inotrópico positivo em células atriais de ratos. A ET-1 produziu um efeito bifásico no perfil de contração destas células. No primeiro minuto após o tratamento, observou-se uma redução da amplitude de contração (menor que 10%) e após esse tempo, houve aumento significativo da tensão, o que durou aproximadamente 45 minutos e só regrediu após sucessivas lavagens das células. Esse estudo, mostrou ainda que a esta ação da ET-1 é mediada pela mobilização

do inositol (monofosfato, bifosfato e trifosfato) intracelular, pois a concentração deste foi aumentada com o tratamento com ET-1 a 100 nM. Ainda, o bloqueio farmacológico dos canais de cálcio (D888) aboliu os efeitos inotrópicos da ET-1, sugerindo que o influxo de cálcio é importante mediador das ações da ET-1 (VIGNE; LAZDUNSKI; FRELIN, 1989). Com isso, contextualizando com o nosso trabalho, consideramos que a imunolocalização perinuclear do GPER1, possa estar envolvida na liberação do cálcio reticular e assim, contribuir ou influenciar de alguma forma para as ações da ET-1.

Um estudo de Opel e colaboradores (2015) analisou a participação de um regulador de sinalização das proteínas G, chamado de RGS4, no padrão de contratilidade de cardiomiócitos. O RGS4 é considerado como um desativador de receptores acoplados a proteínas G, por acelerar a atividade GTPásica das subunidades  $\alpha$ . Neste estudo, o uso de animais com deleção genética para RGS4 (RGS4<sup>-/-</sup>) mostrou que os mesmos apresentam maiores frequências de *sparks* de cálcio e essa frequência foi ainda amplificada pelo tratamento dos cardiomiócitos com ET-1 (100 nM) (OPEL et al., 2015). Esse efeito da ET-1 ocorreu tanto em animais RGS4<sup>+/+</sup> como RGS4<sup>-/-</sup>. Seria de esperar então que, o tratamento com ET-1, em nosso estudo, fosse capaz de até aumentar a frequência de contração dos cardiomiócitos, o que não ocorreu. Apesar deste efeito esperado, já foi demonstrado que a ET-1 pode alterar o padrão de contração não somente pelo aumento do transiente de cálcio, mas, também por ações citosólicas e nucleares que culminam no padrão contrátil e na ativação de vias de sinalização, como a CaM/CaMK II/HDAC5. Assim, o padrão contrátil observado não deve ser analisado apenas do ponto de vista da mecânica de contração, mas também, como resultante de toda a sinalização intracelular evocada pela ET-1. O aumento na área contraída, observada no grupo ET-1+E2+G15, pode indicar que o GPER1, mesmo não interferindo na frequência de contração em condições de estímulo pela ET-1, pode estar envolvido na magnitude de contração nessas mesmas condições.

Por isso, consideramos promissores que os efeitos do E2 mediados pelo GPER1 possam participar do mecanismo de mobilização de cálcio, produzindo efeito cronotrópico positivo e modulando os mecanismos da força de contração. Obviamente, esses mecanismos necessitam ser melhor compreendidos considerando novas técnicas e abordagens específicas.

A GRK5 atua em cardiomiócitos regulando os eventos de sinalização que controlam a função cardíaca e é conhecida por sofrer *upregulation* na insuficiência cardíaca. Apesar de a função principal da GRK5 ser a de dessensibilizar receptores acoplados a proteína G através da fosforilação, tem sido demonstrado que a GRK5 se localiza no núcleo dos miócitos cardíacos onde exerce efeitos independentes dos receptores acoplados a proteína G, promovendo respostas mal-adaptativas na hipertrofia cardíaca e insuficiência cardíaca (HULLMANN et al., 2014). O aumento de GRK5 nuclear está associado ao desenvolvimento de hipertrofia patológica. No entanto, protocolos visando desenvolvimento de hipertrofia fisiológica não induziram aumento no acúmulo nuclear de GRK5 (TRAYNHAM et al., 2015).

Através da análise da densidade de marcação da GRK5 no núcleo e citoplasma, foi possível avaliar a razão núcleo citoplasma, que indica a translocação nuclear da GRK5. Nossos resultados, sugeriram que a translocação da GRK5 para o núcleo no grupo tratado com ET-1 pode estar mediando seus efeitos hipertróficos. Além disso, essa translocação foi revertida no grupo tratado com E2. O tratamento com G15 não alterou este padrão, mas observa-se uma tendência de ser maior que o pré-tratado com E2. A acumulação nuclear de GRK5 ocorre após ativação da subunidade Gq. Durante a fase de hipertrofia patológica que precede a insuficiência cardíaca, há um aumento da atividade de sinalização através de GPCRs que são acoplados a Gq. Ao entrar no núcleo, através de seu domínio catalítico, a GRK5 pode fosforilar fatores como HDAC5 ou NFAT, orientando-os para o núcleo e liberando sua repressão no MEF2 (HULLMANN et al., 2014), um fator de transcrição essencial na regulação do crescimento de cardiomiócitos. Esse mecanismo pode certamente ajudar a compreender as vias de regulação do E2 em cardiomiócitos hipertrofiados.

A via de sinalização MAPK/ERK1/2 parece ser crucial na regulação de eventos fisiológicos e patológicos cardíacos (FRYER et al., 2001; KOVACS et al., 2009). Em nosso estudo, o tratamento com ET-1 produziu aumento significativo na expressão de ERK1/2 e o mesmo foi abolido pelo pré-tratamento com o E2. Este dado corrobora as ações da ERK1/2 no desenvolvimento da hipertrofia induzida por ET-1 (YUE, 2000). Nossos dados revelaram ainda que no grupo tratado com G15, a expressão de ERK1/2 é maior que o grupo pré-tratado com E2. Em conjunto, nossos resultados revelaram que a ativação da ERK induzida por ET-1 foi suprimida por E2, podendo este efeito ser parcialmente mediado pelo GPER1.

A proteína serina/treonina quinase Akt é um importante mediador da sinalização da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e regula uma grande variedade de funções celulares em diferentes tecidos. Trabalhos anteriores indicaram a dependência das vias de sinalização da Akt na regulação do crescimento cardíaco, função contrátil, e angiogênese coronariana (SHIOJIMA; WALSH, 2006), além de ações neuroprotetoras (BOURQUE; MORISSETTE; DI PAOLO, 2014). Nossos dados demonstraram uma participação importante da proteína Akt nos efeitos do E2. A expressão da Akt diminuída no grupo ET-1 foi revertida pelo pré-tratamento com E2. Este efeito do E2 pode contribuir para o entendimento de como sua sinalização contribuiu para reversão da hipertrofia ativada pela ET-1. Além disso, o E2 perdeu parcialmente seu efeito no aumento da expressão de Akt quando o GPER1 foi bloqueado. Quanto ao G36, este antagonista apresentou efeito mais pronunciado que o G15 na redução da expressão da Akt fosforilada, o que corrobora dados indicando maior afinidade desta droga ao GPER1.

Mais uma vez, este receptor parece estar envolvido nas ações do E2 em cardiomiócitos hipertrofiados. Em células não estimuladas, a Akt reside no citosol e seu domínio quinase é inibido por um domínio hidrofóbico C-terminal. Em resposta à estimulação por fatores de crescimento, como no nosso estudo por ET-1, Akt é recrutada para a membrana plasmática através do seu domínio PH N-terminal. Associada à membrana, a Akt é sequencialmente fosforilada nos seus dois sítios regulatórios, T308 ou S473 (no caso de Akt1), por quinases conhecidas como proteína-quinases dependentes de fosfoinosítídeos 1 (PDK1).

No estudo de Deschamps e Murphy (2009), animais infartados foram tratados com 110 nM de G1. Esse tratamento prévio com G1, reduziu a área infartada após a isquemia (DESCHAMPS; MURPHY, 2009). Essa ação foi perdida com *wortmannin*, um inibidor da PI3K, mostrando assim, uma dependência dessa via para as ações mediadas pelo GPER1. Interessantemente, o G1 aumentou a expressão tanto de Akt quanto de ERK1/2 no estudo. Em contraponto, em nosso estudo, o bloqueio do GPER1 foi relacionado com redução da Akt, mas com aumento da ERK1/2. Patten e colaboradores (2004) relacionaram a cardioproteção exercida pelo E2 com a ativação da via PI3K/Akt (PATTEN et al., 2004). Essa via, foi também relacionada com a redução da área infartada após o tratamento com E2.

A proteína PDK1, que é efetora na cascata de ativação da Akt, foi também avaliada em nosso estudo. A participação da PDK1 fosforilada confirma a via de ativação da Akt participando nos efeitos protetores exercidos pelo E2. Observamos que a redução da expressão da PDK1 fosforilada no grupo tratado com ET-1, coincidiu com a redução da Akt no mesmo grupo. Da mesma forma, o aumento na expressão da Akt fosforilada coincidiu com o aumento da expressão da PDK1 fosforilada o grupo pré-tratado com E2.

Tanto para a expressão da Akt quanto para PDK1, a participação do GPER1 foi essencial, induzindo uma redução na expressão destas mesmo na presença do E2. A redução da Akt fosforilada foi parcialmente reduzida quando as células foram tratadas com G15, indicando a participação de outros receptores de E2 nesse processo. Apesar disso, a redução na expressão da PDK1 fosforilada foi totalmente dependente do GPER1, como observado nos grupos tratados com G15 ou G36.

Em 2006, após a identificação do GPER1 pelo mesmo grupo de pesquisadores, Bologna e colaboradores identificaram através de screening biomolecular, o G1, agonista específico do GPER1 (BOLOGA et al., 2006), que passou a ser utilizado amplamente em trabalhos investigando os efeitos mediados pelo receptor de membrana do E2. Em trabalhos posteriores, o estudo do GPER1 mostrou evidências de suas ações protetoras no sistema cardiovascular (LINDSEY; CHAPPELL, 2011).

A análise dos efeitos tanto do E2, impedindo o desenvolvimento de hipertrofia via ET-1, quanto do bloqueio do GPER1 via G15 mostraram a participação do receptor mediando ações no cardiomiócito. Assim, foram investigados os efeitos do G1 no modelo hipertrófico utilizado em nossos experimentos anteriores e observamos que o tratamento prévio com G1 impediu o efeito hipertrófico da ET-1, ressaltando a participação desse receptor na prevenção da hipertrofia do cardiomiócito. Esse efeito do G1 foi similar ao observado com o pré tratamento com E2. Apesar de sua ação impedindo o desenvolvimento de hipertrofia, quando as células foram tratadas apenas com o G1 não houve alteração do padrão de área celular.

Estudos como o de Kabir e colaboradores (2015) mostraram que em machos C57BL/6, a expressão de mRNA para GPER1 no coração é maior quando comparado ao ER $\alpha$  e ER $\beta$ . Nesse estudo, os autores relacionam a ativação do GPER1 com o efeito cardioprotetor agudo

do E2 em modelo de isquemia/reperfusão miocárdica. O tratamento com E2, reduziu a porcentagem de área infartada em animais controle e *knockout* para ER $\alpha$  e ER $\beta$ , mas, não teve efeito cardioprotetor no animais *knockout* para GPER1 (KABIR et al., 2015). Em modelo *in vitro*, os efeitos cardioprotetores e antiapoptóticos da ativação do GPER1 também foram demonstrados (LI; XIANG; PING, 2015). Trabalhos como estes, apesar de serem desenvolvidos em machos, indicam um papel importante do GPER1 como mediador das ações de E2 e indicam que mesmo em outras condições que não sejam a hipertrofia, os efeitos da ativação do GPER1 são cardioprotetores.

Em fêmeas, já foi demonstrado uma interação entre o GPER1 e a *Receptor activity modifying protein 3* (RAMP3), uma proteína relacionada com o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca. Através da técnica de *Bioluminescence Resonance Energy Transfer* (BRET), Lenhart e colaboradores (2013) demonstraram a interação molecular entre GPER1 e RAMP3 como mecanismo importante para as ações mediadas pelo GPER1. Essa interação é sugerida pelos autores como um mecanismo para direcionar e translocar o GPER1 dentro da célula, permitindo suas ações rápidas. Além disso, nesse estudo a ativação do GPER1 via G1 promoveu efeitos anti-hipertróficos no coração e uma redução da fibrose perivascular, um efeito que foi presente em machos Ramp<sup>+/+</sup> mas não em machos Ramp<sup>-/-</sup> (LENHART et al., 2013).

Alguns modelos de injúria cardíaca como o de isquemia e reperfusão, bem como de *knockouts* para proteínas de interações com os receptores acoplados a proteína G, como citado acima, tem sido descritos na literatura e todos mostram algum tipo de efeito protetor exercido pela via mediada pelo GPER1. Apesar disso, estudos sobre as vias hipertróficas ativadas bem como os efeitos do GPER1 em modelos com fêmeas e *in vitro* são escassos.

A participação de vias de sinalização tais como da ERK1/2 e Akt no processo hipertrófico são classicamente descritas, mas existem dados diferentes, a depender do modelo utilizado para indução do processo patológico. A análise dessas vias, na condição de bloqueio do GPER1, mostrou influência significativa dessas vias na prevenção da hipertrofia induzida pelo E2. Assim, testamos se a ativação do GPER1, utilizando o G1, poderia modular estas vias. O aumento da ativação de ERK1/2 foi prevenido pelo tratamento das células com o G1. Este dado se correlaciona com as ações do E2 como observado nos experimentos anteriores.

Assim, podemos considerar que, quanto aos efeitos na sinalização dessa via envolvida na sinalização hipertrófica, o G1 ou E2 apresentaram efeitos similares. Apesar desse efeito do G1, quando o mesmo foi administrado sozinho no cultivo, não houve modificação no padrão de fosforilação da ERK1/2.

No estudo de Kabir e colaboradores (2015), o tratamento com E2 aumentou a expressão da ERK1/2 fosforilada, contrastando assim com os nossos achados quando comparamos com o tratamento com G1 ou E2. Tal efeito, de aumentar a expressão da ERK1/2, pode ter ocorrido como resultado de uma dose elevada de E2 (40 nM) comparada com a utilizada em nosso estudo (10 nM). Além disso, o trabalho citado acima, utilizou um modelo de coração isolado e um tratamento com E2 que precedia a isquemia. Assim, é possível que a diferença do modelo, dose e vias de injúria, sejam responsáveis pela diferença na ativação da ERK1/2 observado nesses trabalhos.

No mesmo trabalho, a fosforilação da Akt foi aumentada no grupo WT tratado com E2, o mesmo resultado obtido com E2, mas não com G1 em nosso estudo. A Akt é considerada uma proteína envolvida na sobrevivência celular e produção de óxido nítrico, de forma indireta, pela ativação da sintase de óxido nítrico. De forma interessante, coração de animais knockout para GPER1 não apresentaram aumento na expressão da Akt fosforilada. Esse estudo, relacionando aos nossos dados, mostram que o GPER1 está envolvido na ativação de via de sinalização anti-hipertrófica como da Akt.

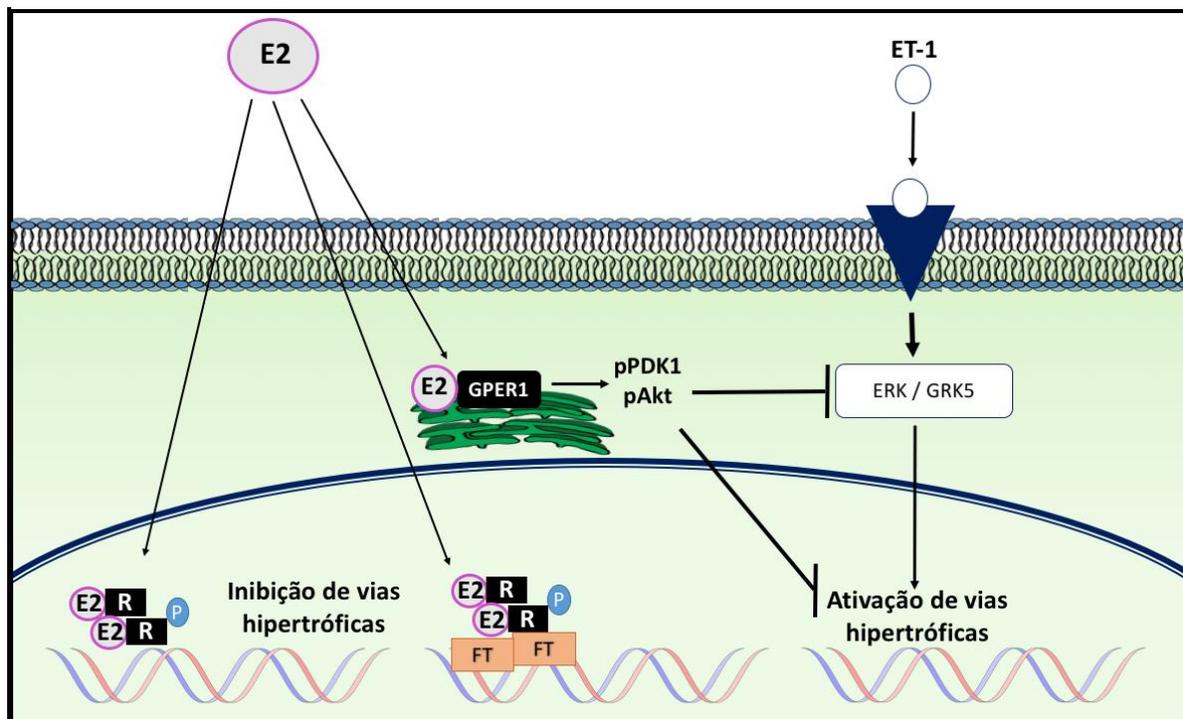
Através da técnica de utilização do RNA de interferência (siRNA), foi escolhida uma sequência alvo para o GPER1 que produziu 65% de silenciamento do receptor. A análise da área dos cardiomiócitos mostrou novamente que o pré tratamento com E2 reverteu a hipertrofia induzida por ET-1 e que o pré tratamento com E2 na condição onde houve o silenciamento de 65% do GPER1 reverteu a ação hipertrófica da ET-1. O silenciamento do GPER1 mostrou novamente que este receptor tem função importante no processo hipertrófico desenvolvido em cardiomiócitos. Em função de a técnica de silenciamento ter reduzido para 35% a expressão do receptor, acreditamos que esta atividade basal que restou pode ter sido responsável por impedir o bloqueio total das ações do E2 na célula. De qualquer forma, o dado contribui para confirmação do papel do receptor no crescimento da célula e representa

uma nova ferramenta de investigação para as vias de sinalização envolvidas nas ações do GPER1.

Outros estudos, principalmente envolvendo pesquisas com células carcinogênicas, utilizaram a técnica de silenciamento do GPER1 como estratégia de investigação (FRANCOIS et al., 2015; LAM et al., 2014). Lam e colaboradores, em 2014, mostraram que a ativação do GPER1 com o G1 foi capaz de inibir o crescimento de células tumorais da próstata resistentes a castração. Nesse estudo, o tratamento com G1 durante 16 dias em uma dose de 4mg/kg/dia, subcutaneamente, promoveu redução do volume tumoral para menos que 50% comparado ao controle (LAM et al., 2014).

Em células de carcinoma ovariano, a migração e proliferação celular dessas células foi prevenida pelo tratamento com E2. Interessantemente, a ativação de ERK1/2 nesse modelo foi relacionado com a capacidade de metástase das células. Os autores, através de técnica de silenciamento ou do bloqueio do GPER1 (G15), mostraram que a reversão do aumento da ativação da ERK1/2 induzida pelo tratamento com E2 foi mediado pelo GPER1 e não pelos receptores ER $\alpha$  e ER $\beta$  (FRANCOIS et al., 2015). Em nosso estudo, a prevenção da ativação da ERK1/2 também foi observada e indica que mesmo em outros tipos celulares, a via das MAPK é um alvo das ações não genômicas do E2.

Assim, nosso estudo trouxe informações acerca das ações do GPER1 em uma condição de hipertrofia do cardiomiócito e os resultados apontam para a participação do receptor em efeitos importantes exercidos pelo E2. Nossos dados apontam para ideia do E2 contribuindo para a redução da hipertrofia através da inibição de vias hipertróficas, como da GRK5, ERK1/2 e para a ativação de vias protetoras tais como Akt/PDK1. Dessa forma, apresentamos abaixo, uma síntese do mecanismo de ação proposto para o eixo E2/GPER1.



**Figura 19. Esquema proposto para as vias envolvidas nas ações mediadas pelo eixo E2-GPER1.**

Conforme observado nessa pesquisa, a investigação das ações do GPER1 seja utilizando o seu antagonista (G15) ou agonista (G1), mostrou que a modulação deste receptor interfere na ativação da via PDK1/Akt e esta sinalização protetora no cardiomiócito pode ter sido responsável pelas ações anti-hipertróficas do E2, resultando na redução da expressão da ERK1/2. Por outro lado, efeitos não mediados pelo GPER1 também se destacaram, como a redução da translocação nuclear da GRK5, o que pode ter sido mediado por outros receptores de E2, que além de interferir nessa via, podem ainda ter sido responsáveis por parte das ações anti-hipertróficas do mesmo, através de suas ações clássicas nucleares.

## 6 CONCLUSÕES

Este trabalho demonstra o papel protetor essencial do E2 em cardiomiócitos hipertrofiados através da ET-1 e apresenta resultados que demonstram fortes evidências para a participação do GPER1 nos efeitos mediados pelo E2. Os mecanismos envolvidos na proteção exercida pelo E2, além da prevenção do aumento da área celular, envolve modificações na expressão dos marcadores hipertróficos ANP e BNP, prevenção de alterações no padrão contrátil exercido pela ET-1, redução na translocação nuclear de fatores ativadores do crescimento celular (GRK5) e inibição de moléculas ativadoras de vias hipertróficas como a ERK1/2. Ainda, este trabalho sugere que a via protetora utilizada pelo E2 para produzir seus efeitos protetores seja via proteína PDK1/Akt, aumentada com o pré-tratamento com E2, resultado que pode ser comprovado pelo bloqueio deste receptor pelo G15 e mais eficazmente pelo G36.

O silenciamento do GPER1 evidenciou ainda mais as ações estrogênicas não genômicas, mediadas pelo GPER1. Nesse estudo, o bloqueio parcial das ações do E2 com o siRNA GPER1 corrobora os resultados do mecanismo antihipertrófico atribuído ao E2 e se caracteriza como ferramenta importante para futuras investigações nessa linha de pesquisa.

Observamos que mais estudos das vias alteradas neste trabalho, especialmente em modelo *in vivo*, possam enriquecer essa linha de pesquisa. Em contrapartida, os resultados encontrados sugerem ainda maior investigação de como o E2 pode modificar tais vias no cardiomiócito, havendo então necessidade de associar ao modelo *in vivo*, o cultivo celular para investigações de vias de sinalização ativadas ou influenciadas pelo GPER1.

Considerando que o foco das pesquisas mais recentes do sistema endócrino envolvendo o E2, tem se voltado mais para as ações não genômicas deste como importante na abordagem da terapia hormonal, este trabalho contribui para a compreensão de tais efeitos, abordando uma condição importante para a doenças cardiovasculares – a hipertrofia de cardiomiócitos.

## REFERÊNCIAS

ABDULLAH, S. M. et al. Relation of coronary atherosclerosis determined by electron beam computed tomography and plasma levels of n-terminal pro-brain natriuretic peptide in a multiethnic population-based sample (the Dallas Heart Study). **The American Journal of Cardiology**, v. 96, n. 9, p. 1284–1289, 1 nov. 2005.

AGAPITOV, A. V.; HAYNES, W. G. Role of endothelin in cardiovascular disease. **Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system: JRAAS**, v. 3, n. 1, p. 1–15, mar. 2002.

AGERO, U. et al. Defocusing microscopy. **Microscopy Research and Technique**, v. 65, n. 3, p. 159–165, out. 2004.

AKAMA, K. T. et al. Post-synaptic density-95 (PSD-95) binding capacity of G-protein-coupled receptor 30 (GPR30), an estrogen receptor that can be identified in hippocampal dendritic spines. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 9, p. 6438–6450, 1 mar. 2013.

ALEXANDER, S. P. H.; MATHIE, A.; PETERS, J. A. Guide to Receptors and Channels (GRAC), 5th edition. **British Journal of Pharmacology**, v. 164 Suppl 1, p. S1-324, nov. 2011.

ALLEN, B. G. et al. Both endothelin-A and endothelin-B receptors are present on adult rat cardiac ventricular myocytes. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 81, n. 2, p. 95–104, fev. 2003.

ALLEN, C.; EVANS, G.; SUTTON, E. L. Pharmacologic Therapies in Women's Health: Contraception and Menopause Treatment. **The Medical Clinics of North America**, v. 100, n. 4, p. 763–789, jul. 2016.

AOYAGI, T.; MATSUI, T. Phosphoinositide-3 kinase signaling in cardiac hypertrophy and heart failure. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 18, p. 1818–1824, 2011.

ARIAZI, E. A. et al. The G protein-coupled receptor GPR30 inhibits proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells. **Cancer Research**, v. 70, n. 3, p. 1184–1194, 1 fev. 2010.

ARNAL, J.-F. et al. Structure-function relationship of estrogen receptors in cardiovascular pathophysiological models. **Thrombosis Research**, v. 130 Suppl 1, p. S7-11, out. 2012.

ARO, A. L. et al. Left-ventricular geometry and risk of sudden cardiac arrest in patients with preserved or moderately reduced left-ventricular ejection fraction. **Europace: European Pacing**,

**Arrhythmias, and Cardiac Electrophysiology: Journal of the Working Groups on Cardiac Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Cellular Electrophysiology of the European Society of Cardiology**, 2 jun. 2016.

BABIKER, F. A. et al. Estrogen receptor beta protects the murine heart against left ventricular hypertrophy. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 7, p. 1524–1530, jul. 2006.

BELMONTE, S. L.; BLAXALL, B. C. G protein coupled receptor kinases as therapeutic targets in cardiovascular disease. **Circulation Research**, v. 109, n. 3, p. 309–319, 22 jul. 2011.

BELO, N. O. et al. Involvement of atrial natriuretic peptide in blood pressure reduction induced by estradiol in spontaneously hypertensive rats. **Regulatory Peptides**, v. 117, n. 1, p. 53–60, 15 jan. 2004.

BOGOYEVITCH, M. A. et al. Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes. The potential role of the cascade in the integration of two signaling pathways leading to myocyte hypertrophy. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 2, p. 1110–1119, 14 jan. 1994.

BOGOYEVITCH, M. A.; MARSHALL, C. J.; SUGDEN, P. H. Hypertrophic agonists stimulate the activities of the protein kinases c-Raf and A-Raf in cultured ventricular myocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 44, p. 26303–26310, 3 nov. 1995.

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

BOPASSA, J. C. et al. A novel estrogen receptor GPER inhibits mitochondria permeability transition pore opening and protects the heart against ischemia-reperfusion injury. **AJP: Heart and Circulatory Physiology**, v. 298, n. 1, p. H16–H23, 1 jan. 2010.

BOURQUE, M.; MORISSETTE, M.; DI PAOLO, T. Raloxifene activates G protein-coupled estrogen receptor 1/Akt signaling to protect dopamine neurons in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mice. **Neurobiology of Aging**, v. 35, n. 10, p. 2347–2356, out. 2014.

BROUCHET, L. et al. Estradiol accelerates reendothelialization in mouse carotid artery through estrogen receptor-alpha but not estrogen receptor-beta. **Circulation**, v. 103, n. 3, p. 423–428, 23 jan. 2001.

BUPHA-INTR, T.; HAIZLIP, K. M.; JANSSEN, P. M. L. Role of endothelin in the induction of

cardiac hypertrophy in vitro. **PloS One**, v. 7, n. 8, p. e43179, 2012.

CARMECI, C. et al. Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. **Genomics**, v. 45, n. 3, p. 607–617, 1 nov. 1997.

CASELLI, S. et al. Patterns of left ventricular diastolic function in Olympic athletes. **Journal of the American Society of Echocardiography: Official Publication of the American Society of Echocardiography**, v. 28, n. 2, p. 236–244, fev. 2015.

CAVASIN, M. A. et al. Estrogen and testosterone have opposing effects on chronic cardiac remodeling and function in mice with myocardial infarction. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 284, n. 5, p. H1560-1569, maio 2003.

CLERK, A. et al. Differential activation of protein kinase C isoforms by endothelin-1 and phenylephrine and subsequent stimulation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases in ventricular myocytes cultured from neonatal rat hearts. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 52, p. 32848–32857, 30 dez. 1994.

COLAN, S. D. et al. Left ventricular diastolic function in elite athletes with physiologic cardiac hypertrophy. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 6, n. 3, p. 545–549, set. 1985.

CUNNINGHAM, K. F. et al. Increased expression of estrogen-related receptor  $\beta$  during adaptation of adult cardiomyocytes to sustained hypoxia. **American Journal of Cardiovascular Disease**, v. 6, n. 2, p. 46–54, 2016.

DEL RY, S.; CABIATI, M.; CLERICO, A. Natriuretic peptide system and the heart. **Frontiers of Hormone Research**, v. 43, p. 134–143, 2014.

DENNIS, M. K. et al. In vivo effects of a GPR30 antagonist. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 6, p. 421–427, jun. 2009.

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. H1806-1813, nov. 2009.

DING, Q. et al. Estradiol-mediated ERK phosphorylation and apoptosis in vascular smooth muscle cells requires GPR 30. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 297, n. 5, p. C1178-1187, nov. 2009.

DONALDSON, C. et al. Estrogen attenuates left ventricular and cardiomyocyte hypertrophy by an estrogen receptor-dependent pathway that increases calcineurin degradation. **Circulation Research**, v. 104, n. 2, p. 265–275, 11p following 275, 30 jan. 2009.

EHLER, E.; MOORE-MORRIS, T.; LANGE, S. Isolation and culture of neonatal mouse cardiomyocytes. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 79, 6 set. 2013.

ESPOSITO, G. et al. Genetic alterations that inhibit in vivo pressure-overload hypertrophy prevent cardiac dysfunction despite increased wall stress. **Circulation**, v. 105, n. 1, p. 85–92, 1 jan. 2002.

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

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

FILARDO, E. J.; THOMAS, P. Minireview: G protein-coupled estrogen receptor-1, GPER-1: its mechanism of action and role in female reproductive cancer, renal and vascular physiology. **Endocrinology**, v. 153, n. 7, p. 2953–2962, jul. 2012.

FILICE, E. et al. A new membrane G protein-coupled receptor (GPR30) is involved in the cardiac effects of 17 $\beta$ -estradiol in the male rat. **Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society**, v. 60, n. 4, p. 3–10, dez. 2009.

FRANCOIS, C. M. et al. 17 $\beta$ -estradiol inhibits spreading of metastatic cells from granulosa cell tumors through a non-genomic mechanism involving GPER1. **Carcinogenesis**, v. 36, n. 5, p. 564–573, 1 maio 2015.

FRIELER, R. A.; MORTENSEN, R. M. Immune Cell and Other Noncardiomyocyte Regulation of Cardiac Hypertrophy and Remodeling. **Circulation**, v. 131, n. 11, p. 1019–1030, 17 mar. 2015.

FRYER, R. M. et al. Differential activation of extracellular signal regulated kinase isoforms in preconditioning and opioid-induced cardioprotection. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 296, n. 2, p. 642–649, fev. 2001.

GOMES, E. R. M. et al. Angiotensin-(1-7) prevents cardiomyocyte pathological remodeling through a nitric oxide/guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent pathway. **Hypertension**, v. 55, n. 1, p.

153–160, jan. 2010.

GUATIMOSIM, S. et al. Nuclear Ca<sup>2+</sup> regulates cardiomyocyte function. **Cell Calcium**, v. 44, n. 2, p. 230–242, ago. 2008.

GURUSAMY, N. et al. Cardioprotection by adaptation to ischaemia augments autophagy in association with BAG-1 protein. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 13, n. 2, p. 373–387, fev. 2009.

HAAS, E. et al. Regulatory role of G protein-coupled estrogen receptor for vascular function and obesity. **Circulation Research**, v. 104, n. 3, p. 288–291, 13 fev. 2009.

HAIDER, A. W. et al. Increased left ventricular mass and hypertrophy are associated with increased risk for sudden death. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 32, n. 5, p. 1454–1459, nov. 1998.

HALL, J. M.; COUSE, J. F.; KORACH, K. S. The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 40, p. 36869–36872, 5 out. 2001.

HAYWARD, C. S.; KELLY, R. P.; COLLINS, P. The roles of gender, the menopause and hormone replacement on cardiovascular function. **Cardiovascular Research**, v. 46, n. 1, p. 28–49, abr. 2000.

HEINZEL, F. R. et al. Myocardial hypertrophy and its role in heart failure with preserved ejection fraction. **Journal of Applied Physiology**, v. 119, n. 10, p. 1233–1242, 15 nov. 2015.

HEYMANS, S. et al. Macrophage microRNA-155 promotes cardiac hypertrophy and failure. **Circulation**, v. 128, n. 13, p. 1420–1432, 24 set. 2013.

HILL, J. A. et al. Cardiac hypertrophy is not a required compensatory response to short-term pressure overload. **Circulation**, v. 101, n. 24, p. 2863–2869, 20 jun. 2000.

HULLMANN, J. E. et al. GRK5-mediated exacerbation of pathological cardiac hypertrophy involves facilitation of nuclear NFAT activity. **Circulation Research**, v. 115, n. 12, p. 976–985, 5 dez. 2014.

JESSUP, J. A. et al. Attenuation of salt-induced cardiac remodeling and diastolic dysfunction by the GPER agonist G-1 in female mRen2.Lewis rats. **PloS One**, v. 5, n. 11, p. e15433, 2010.

KABIR, M. E. et al. G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1 Mediates Acute Estrogen-Induced

Cardioprotection via MEK/ERK/GSK-3 $\beta$  Pathway after Ischemia/Reperfusion. **PLOS ONE**, v. 10, n. 9, p. e0135988, 10 set. 2015.

KANDA, N.; WATANABE, S. 17Beta-estradiol enhances the production of nerve growth factor in THP-1-derived macrophages or peripheral blood monocyte-derived macrophages. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 121, n. 4, p. 771–780, out. 2003.

KATZENELLENBOGEN, B. S.; KORACH, K. S. A new actor in the estrogen receptor drama--enter ER-beta. **Endocrinology**, v. 138, n. 3, p. 861–862, mar. 1997.

KIM, J. et al. Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for beta-arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 5, p. 1442–1447, 1 fev. 2005.

KORNBERG, L. et al. Cell adhesion or integrin clustering increases phosphorylation of a focal adhesion-associated tyrosine kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 33, p. 23439–23442, 25 nov. 1992.

KOVACS, K. et al. Prevalent role of Akt and ERK activation in cardioprotective effect of Ca(2+) channel- and beta-adrenergic receptor blockers. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 321, n. 1–2, p. 155–164, jan. 2009.

KOZIRIS, L. P. et al. Serum levels of total and free IGF-I and IGFBP-3 are increased and maintained in long-term training. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 86, n. 4, p. 1436–1442, abr. 1999.

KRUMHOLZ, H. M.; LARSON, M.; LEVY, D. Sex differences in cardiac adaptation to isolated systolic hypertension. **The American Journal of Cardiology**, v. 72, n. 3, p. 310–313, 1 ago. 1993.

KVINGEDAL, A. M.; SMELAND, E. B. A novel putative G-protein-coupled receptor expressed in lung, heart and lymphoid tissue. **FEBS letters**, v. 407, n. 1, p. 59–62, 21 abr. 1997.

LAM, C. S. P. et al. Size, shape, and stamina: the impact of left ventricular geometry on exercise capacity. **Hypertension**, v. 55, n. 5, p. 1143–1149, maio 2010.

LAM, C. S. P. et al. Influence of sex and hormone status on circulating natriuretic peptides. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 58, n. 6, p. 618–626, 2 ago. 2011.

LAM, H.-M. et al. Targeting GPR30 with G-1: a new therapeutic target for castration-resistant

prostate cancer. **Endocrine Related Cancer**, v. 21, n. 6, p. 903–914, 5 nov. 2014.

LANG, R. M. et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. **Journal of the American Society of Echocardiography: Official Publication of the American Society of Echocardiography**, v. 18, n. 12, p. 1440–1463, dez. 2005.

LEASK, A. Getting to the Heart of the Matter: New Insights Into Cardiac Fibrosis. **Circulation Research**, v. 116, n. 7, p. 1269–1276, 27 mar. 2015.

LEINWAND, L. A. Sex is a potent modifier of the cardiovascular system. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 3, p. 302–307, ago. 2003.

LENHART, P. M. et al. G-protein-coupled receptor 30 interacts with receptor activity-modifying protein 3 and confers sex-dependent cardioprotection. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 51, n. 1, p. 191–202, 2013.

LEVY, D. Clinical significance of left ventricular hypertrophy: insights from the Framingham Study. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 17 Suppl 2, p. S1-6, 1991.

LI, H. et al. COX-2 is involved in ET-1-induced hypertrophy of neonatal rat cardiomyocytes: role of NFATc3. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 382, n. 2, p. 998–1006, 15 fev. 2014.

LI, J.; JUBAIR, S.; JANICKI, J. S. Estrogen Inhibits Mast Cell Chymase Release to Prevent Pressure Overload-Induced Adverse Cardiac Remodeling. **Hypertension**, v. 65, n. 2, p. 328–334, 1 fev. 2015.

LI, M. et al. NFATc4 and myocardin synergistically up-regulate the expression of LTCC  $\alpha 1C$  in ET-1-induced cardiomyocyte hypertrophy. **Life Sciences**, v. 155, p. 11–20, 15 jun. 2016a.

LI, M. et al. MicroRNA-29a-3p attenuates ET-1-induced hypertrophic responses in H9c2 cardiomyocytes. **Gene**, v. 585, n. 1, p. 44–50, 1 jul. 2016b.

LI, W.-L.; XIANG, W.; PING, Y. Activation of novel estrogen receptor GPER results in inhibition of cardiocyte apoptosis and cardioprotection. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, n. 2, p. 2425–2430, ago. 2015.

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

3758, ago. 2009.

LINDSEY, S. H.; CHAPPELL, M. C. Evidence That the G Protein–Coupled Membrane Receptor GPR30 Contributes to the Cardiovascular Actions of Estrogen. **Gender Medicine**, v. 8, n. 6, p. 343–354, dez. 2011.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.

MAFFEI, S. et al. Circulating levels of cardiac natriuretic hormones measured in women during menstrual cycle. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 22, n. 1, p. 1–5, jan. 1999.

MAFFEI, S. et al. Increase in circulating levels of cardiac natriuretic peptides after hormone replacement therapy in postmenopausal women. **Clinical Science (London, England: 1979)**, v. 101, n. 5, p. 447–453, nov. 2001.

MAGGIOLINI, M. et al. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 26, p. 27008–27016, 25 jun. 2004.

MALIK, S. et al. G Protein  $\beta\gamma$  Subunits Regulate Cardiomyocyte Hypertrophy Through a Perinuclear Golgi Phosphatidylinositol 4-phosphate Hydrolysis Pathway. **Molecular Biology of the Cell**, 21 jan. 2015.

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

MENAOUAR, A. et al. Anti-hypertrophic effects of oxytocin in rat ventricular myocytes. **International Journal of Cardiology**, v. 175, n. 1, p. 38–49, 15 jul. 2014.

MENAZZA, S.; MURPHY, E. The Expanding Complexity of Estrogen Receptor Signaling in the Cardiovascular System. **Circulation Research**, v. 118, n. 6, p. 994–1007, 18 mar. 2016.

NILSSON, S. et al. Mechanisms of estrogen action. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 4, p. 1535–1565, out. 2001.

NISHIZUKA, Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. **FASEB**

**journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 9, n. 7, p. 484–496, abr. 1995.

NUNEZ, D. J. et al. Endothelin-1 mRNA is widely expressed in porcine and human tissues. **Journal of Clinical Investigation**, v. 85, n. 5, p. 1537–1541, 1 maio 1990.

O'DOWD, B. F. et al. Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. **Genomics**, v. 47, n. 2, p. 310–313, 15 jan. 1998.

ONO, K. et al. Electrophysiological analysis of the negative chronotropic effect of endothelin-1 in rabbit sinoatrial node cells. **The Journal of Physiology**, v. 537, n. 2, p. 467–488, dez. 2001.

OPEL, A. et al. Absence of the Regulator of G-protein Signaling, RGS4, Predisposes to Atrial Fibrillation and Is Associated with Abnormal Calcium Handling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 31, p. 19233–19244, 31 jul. 2015.

OWMAN, C. et al. Cloning of human cDNA encoding a novel heptahelix receptor expressed in Burkitt's lymphoma and widely distributed in brain and peripheral tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 228, n. 2, p. 285–292, 12 nov. 1996.

PARE, G. et al. Estrogen receptor-alpha mediates the protective effects of estrogen against vascular injury. **Circulation Research**, v. 90, n. 10, p. 1087–1092, 31 maio 2002.

PATTEN, R. D. et al. 17beta-estradiol reduces cardiomyocyte apoptosis in vivo and in vitro via activation of phospho-inositide-3 kinase/Akt signaling. **Circulation Research**, v. 95, n. 7, p. 692–699, 1 out. 2004.

PEDRAM, A. et al. Estrogen inhibits cardiomyocyte hypertrophy in vitro. Antagonism of calcineurin-related hypertrophy through induction of MCIP1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 28, p. 26339–26348, 15 jul. 2005.

PEDRAM, A. et al. Estrogen inhibits cardiac hypertrophy: role of estrogen receptor-beta to inhibit calcineurin. **Endocrinology**, v. 149, n. 7, p. 3361–3369, jul. 2008.

PEDRAM, A. et al. Estrogen receptor-beta prevents cardiac fibrosis. **Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 24, n. 11, p. 2152–2165, nov. 2010.

PEDRAM, A. et al. Estrogen regulates histone deacetylases to prevent cardiac hypertrophy. **Molecular Biology of the Cell**, v. 24, n. 24, p. 3805–3818, dez. 2013.

PETTERSSON, K.; GUSTAFSSON, J. A. Role of estrogen receptor beta in estrogen action. **Annual Review of Physiology**, v. 63, p. 165–192, 2001.

PRETORIUS, L. et al. Promoting physiological hypertrophy in the failing heart. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 35, n. 4, p. 438–441, abr. 2008.

PROSSNITZ, E. R.; BARTON, M. Signaling, physiological functions and clinical relevance of the G protein-coupled estrogen receptor GPER. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 89, n. 3–4, p. 89–97, set. 2009.

PROSSNITZ, E. R.; BARTON, M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 7, n. 12, p. 715–726, 16 ago. 2011.

RECCHIA, A. G. et al. The G protein-coupled receptor 30 is up-regulated by hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) in breast cancer cells and cardiomyocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 12, p. 10773–10782, 25 mar. 2011.

REDFIELD, M. M. et al. Plasma brain natriuretic peptide concentration: impact of age and gender. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 40, n. 5, p. 976–982, 4 set. 2002.

REVANKAR, C. M. et al. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. **Science (New York, N.Y.)**, v. 307, n. 5715, p. 1625–1630, 11 mar. 2005a.

REVANKAR, C. M. et al. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. **Science (New York, N.Y.)**, v. 307, n. 5715, p. 1625–1630, 11 mar. 2005b.

RUBANYI, G. M.; POLOKOFF, M. A. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. **Pharmacological Reviews**, v. 46, n. 3, p. 325–415, set. 1994.

SAGARA, S. et al. Overexpression of coupling factor 6 attenuates exercise-induced physiological cardiac hypertrophy by inhibiting PI3K/Akt signaling in mice. **Journal of Hypertension**, v. 30, n. 4, p. 778–786, abr. 2012.

SANDÉN, C. et al. G protein-coupled estrogen receptor 1/G protein-coupled receptor 30 localizes in the plasma membrane and traffics intracellularly on cytokeratin intermediate filaments. **Molecular Pharmacology**, v. 79, n. 3, p. 400–410, mar. 2011.

SEO, K. et al. Combined TRPC3 and TRPC6 blockade by selective small-molecule or genetic deletion inhibits pathological cardiac hypertrophy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the**

**United States of America**, v. 111, n. 4, p. 1551–1556, 28 jan. 2014.

SHEN, T. et al. SIRT1 functions as an important regulator of estrogen-mediated cardiomyocyte protection in angiotensin II-induced heart hypertrophy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 713894, 2014.

SHIMIZU, I.; MINAMINO, T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 97, p. 245–262, 2 jun. 2016.

SHIOJIMA, I.; WALSH, K. Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling pathway. **Genes & Development**, v. 20, n. 24, p. 3347–3365, 15 dez. 2006.

SHUBEITA, H. E. et al. Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 33, p. 20555–20562, 25 nov. 1990.

SKAVDAHL, M. et al. Estrogen receptor-beta mediates male-female differences in the development of pressure overload hypertrophy. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 288, n. 2, p. H469-476, fev. 2005.

SUGDEN, P. H. Signaling pathways activated by vasoactive peptides in the cardiac myocyte and their role in myocardial pathologies. **Journal of Cardiac Failure**, v. 8, n. 6, p. S359–S369, dez. 2002.

SUGDEN, P. H. Ras, Akt, and mechanotransduction in the cardiac myocyte. **Circulation Research**, v. 93, n. 12, p. 1179–1192, 12 dez. 2003.

SUGDEN, P. H.; CLERK, A. Endothelin signalling in the cardiac myocyte and its pathophysiological relevance. **Current Vascular Pharmacology**, v. 3, n. 4, p. 343–351, out. 2005.

SUGIYAMA, N. et al. ERbeta: recent understanding of estrogen signaling. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 21, n. 9, p. 545–552, set. 2010.

SUZUKI, T.; KUMAZAKI, T.; MITSUI, Y. Endothelin-1 Is Produced and Secreted by Neonatal Rat Cardiac Myocytes in Vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 191, n. 3, p. 823–830, mar. 1993.

TAKADA, Y. et al. Cloning of cDNAs encoding G protein-coupled receptor expressed in human endothelial cells exposed to fluid shear stress. **Biochemical and Biophysical Research**

**Communications**, v. 240, n. 3, p. 737–741, 26 nov. 1997.

TANAKA, A. et al. Endothelin-1 induces myofibrillar disarray and contractile vector variability in hypertrophic cardiomyopathy-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. **Journal of the American Heart Association**, v. 3, n. 6, p. e001263, dez. 2014.

TERAUCHI, M. et al. Effects of oral estradiol and levonorgestrel on cardiovascular risk markers in postmenopausal women. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 285, n. 6, p. 1647–1656, jun. 2012.

THOMAS, P. et al. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. **Endocrinology**, v. 146, n. 2, p. 624–632, fev. 2005.

TOUFEXIS, D. J. et al. Estrogen disrupts the inhibition of fear in female rats, possibly through the antagonistic effects of estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 36, p. 9729–9735, 5 set. 2007.

TRAUPE, T. et al. Distinct roles of estrogen receptors alpha and beta mediating acute vasodilation of epicardial coronary arteries. **Hypertension**, v. 49, n. 6, p. 1364–1370, jun. 2007.

TRAYNHAM, C. J. et al. Differential Role of G Protein-Coupled Receptor Kinase 5 in Physiological Versus Pathological Cardiac Hypertrophy. **Circulation Research**, v. 117, n. 12, p. 1001–1012, 4 dez. 2015.

VAN EICKELS, M. et al. 17 -Estradiol Attenuates the Development of Pressure-Overload Hypertrophy. **Circulation**, v. 104, n. 12, p. 1419–1423, 18 set. 2001.

VASAN, R. S. et al. Plasma natriuretic peptides for community screening for left ventricular hypertrophy and systolic dysfunction: the Framingham heart study. **JAMA**, v. 288, n. 10, p. 1252–1259, 11 set. 2002.

VEGETO, E. et al. Estrogen receptor-alpha mediates the brain antiinflammatory activity of estradiol. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 16, p. 9614–9619, 5 ago. 2003.

VIGNE, P.; LAZDUNSKI, M.; FRELIN, C. The inotropic effect of endothelin-1 on rat atria involves hydrolysis of phosphatidylinositol. **FEBS Letters**, v. 249, n. 2, p. 143–146, 5 jun. 1989.

VOISIN, M.-B.; PRÖBSTL, D.; NOURSHARGH, S. Venular basement membranes ubiquitously

express matrix protein low-expression regions: characterization in multiple tissues and remodeling during inflammation. **The American Journal of Pathology**, v. 176, n. 1, p. 482–495, jan. 2010.

WANG, H. et al. Activation of GPR30 attenuates diastolic dysfunction and left ventricle remodeling in oophorectomized mRen2.Lewis rats. **Cardiovascular Research**, v. 94, n. 1, p. 96–104, 1 abr. 2012.

WANG, T. J. et al. Impact of age and sex on plasma natriuretic peptide levels in healthy adults. **The American Journal of Cardiology**, v. 90, n. 3, p. 254–258, 1 ago. 2002.

WEIL, B. R. et al. Signaling via GPR30 protects the myocardium from ischemia/reperfusion injury. **Surgery**, v. 148, n. 2, p. 436–443, ago. 2010.

WHO. **World Health Organization. Global health risks: mortality and burden of disease attributable to select major risks.**, 2009.

WHO. **The top ten causes of death.**, 2014.

YAMAMURA, A. Pathological function of Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor in pulmonary arterial hypertension. **Journal of Smooth Muscle Research = Nihon Heikatsukin Gakkai Kikanshi**, v. 50, p. 8–17, 2014.

YANG, K. et al. Indoxyl sulfate induces oxidative stress and hypertrophy in cardiomyocytes by inhibiting the AMPK/UCP2 signaling pathway. **Toxicology Letters**, v. 234, n. 2, p. 110–119, 19 fev. 2015.

YANG, L. et al. CpG-ODN attenuates pathological cardiac hypertrophy and heart failure by activation of PI3K $\alpha$ -Akt signaling. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e62373, 2013.

YUE, T.-L. Extracellular Signal-regulated Kinase Plays an Essential Role in Hypertrophic Agonists, Endothelin-1 and Phenylephrine-induced Cardiomyocyte Hypertrophy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 48, p. 37895–37901, 22 nov. 2000.

ZHAO, D. et al. Cardiovascular risk assessment: a global perspective. **Nature Reviews. Cardiology**, 10 mar. 2015.

ZHU, Y.; YANG, H. T.; ENDOH, M. Does nitric oxide contribute to the negative chronotropic and inotropic effects of endothelin-1 in the heart? **European Journal of Pharmacology**, v. 332, n. 2, p. 195–199, 6 ago. 1997.