LUCAS AUGUSTO MOYSÉS FRANCO

**EFEITO DA PROTEÇÃO DESENCADEADA PELO ESTRÓGENO
NA LINHAGEM C6 DE GLIOMA DE RATO**

Dissertação apresentada ao Departamento
de Farmacologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

São Paulo
2010

LUCAS AUGUSTO MOYSÉS FRANCO

**EFEITO DA PROTEÇÃO DESENCADEADA PELO ESTRÓGENO
NA LINHAGEM C6 DE GLIOMA DE RATO**

Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: **Farmacologia**

Orientador: **Profa. Dra. Carolina Demarchi Munhoz de Souza**

Co-orientador: **Cristoforo Scavone**

São Paulo
2010

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Franco, Lucas.

Efeito da proteção desencadeada pelo estrógeno na linhagem C6 de glioma de rato / Lucas Franco. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Carolina Munhoz.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Neurofarmacologia

Versão do título para o inglês: Effect of protection triggered by estrogen on rat glioma cell line C6.

Descritores: 1. Estrógeno 2. Neurofarmacologia 3. Estresse oxidativo 4. Viabilidade celular 5. Glia 6. C6 I. Munhoz, Carolina II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0220/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Lucas Franco.

Título da Dissertação: Efeito da proteção desencadeada pelo estrógeno na linhagem C6 de glioma de rato.

Orientador(a): Carolina Munhoz.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 291, referente ao projeto intitulado: *“Efeito da neuroproteção desenvolvido pelo estrógeno em linhagem de células C6 de glioma de rato “* sob a responsabilidade de **Lucas Augusto Moysés Franco**, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 19 de fevereiro de 2009.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEEA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Vice-Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Dedico meu trabalho primeiramente a Deus e a minha família, minha mãe, Ivani Maria Moysés, minhas irmãs Samyra Moysés Franco e Rachel Moysés Franco, a minha sobrinha Isabella Franco da Silva e aos meus amigos queridos Alexandre Borzani, Giovana Gianinni, Nicolas Rafael Formicola, Bruna Gianinni, Etienne Di Stasi entre outros.

Obrigado!

AGRADECIMENTOS

Aos prof^{as}. Dr^a. **Carolina Demarchi Munhoz de Souza e Cristoforo Scavone**, pela orientação e oportunidade de trabalhar em seu laboratório.

A **Lidia M. Yshii**, amiga sempre presente, torcendo pelas conquistas e compreensiva nos momentos difíceis.

Aos colegas do laboratório, **Elisa Kawamoto, Ana Elisa Böhmer, Dielly Lopes, Sabrina Degaspari, Rafaela Pestana, Ana Maria Orellana, Andrea Vasconcelos, Érica Duque, Paula Kinoshita, Camila Matsubara e Laís Rodrigues** pelo apoio e convivência.

A **Larissa de Sá Lima e Diana Zukas Andreotti**, pelo importante apoio técnico durante este período, e pela amizade.

A **Selma**, secretária de pós-graduação do Departamento de Farmacologia, por seu apoio administrativo.

Às bibliotecárias do Instituto de Ciências Biomédicas, pela atenção com que me receberam.

A CNPq, Fapesp e Capes pelo apoio financeiro.

RESUMO

Franco LAM. Efeito da proteção desencadeada pelo estrógeno na linhagem C6 de glioma de rato. [dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Evidências sugerem que as células da glia desempenham um papel importante na sinalização neuronal e na resposta inflamatória no Sistema Nervoso Central (SNC). Respostas inflamatórias crônicas, bem como a ativação da glia estão associadas com doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer. A inflamação crônica pode ser modulada por altas concentrações de espécies reativas de oxigênio (ERO) que potencializam esse quadro. O estrógeno (E2) é bem conhecido por suas ações neuroprotetoras que podem ser exercidas via receptores clássicos (ESR1, ESR2), não-clássicos (GPER-1) ou ainda por sua ação antioxidante, proveniente da alta semelhança com as moléculas dos flavonóides. A ação do E2 no SNC é relevante uma vez que este hormônio está relacionado com a modulação da memória, neurogênese e plasticidade. Este trabalho tem como objetivo investigar o papel protetor do E2 em linhagem de células C6 de glioma de ratos em um modelo de estresse oxidativo que induz morte celular pela exposição a concentrações tóxicas de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Ensaios de PCR, Western Blot e de imunofluorescência confirmaram a presença e funcionalidade dos receptores ESR1, enquanto ensaios de PCR mostraram a presença do RNAm para o GPER-1 em células C6. Nossos resultados confirmaram que a H_2O_2 induz morte nas células C6 e o pré-tratamento com E2 (por 24 horas) e G1 (por 20 minutos) diminuiu a toxicidade da H_2O_2 de maneira dose-dependente, gerando aumento de viabilidade celular. Estes resultados destacam o envolvimento do E2 e seus receptores na prevenção do dano celular em células da glia. Além disso, eles também sugerem que o rápido efeito protetor do E2 parece estar associado com a sinalização rápida do E2 via GPER-1. Por Western blot e RT-PCR avaliamos a participação da via AKT-CREB-BDNF frente aos tratamentos com E2, moduladores seletivos de estrógeno (SERMs) e G1, onde observamos que estes são capazes de modular a expressão da proteína AKT e os níveis de RNAm para BDNF.

Palavras-chave: C6. Estrógeno. Estresse oxidativo. Viabilidade celular.

ABSTRACT

Franco LAM. Effect of protection triggered by estrogen on rat glioma cell line C6 [Master thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Evidence suggests that glial cells play an important role in neuronal signaling and inflammatory responses in the central nervous system (CNS). Chronic inflammatory responses, as well as activation of glia, are associated with neurodegenerative disorders such as Parkinson's and Alzheimer's diseases. Chronic inflammation can be modulated by high concentrations of reactive oxygen species (ROS) that enhance this process. Estrogen (E2) is well known for its neuroprotective actions that can be performed via classical (ESR1, ESR2) and non-classical receptors (GPER-1) or by its antioxidant action due to its high similarity to flavonoids molecules. E2 action in the CNS is relevant as this hormone is associated to memory modulation, neurogenesis and plasticity. This work has as purpose to investigate the protective role of E2 in rat C6 glioma cell lines in a model of oxidative stress that induces cell death by exposure to toxic concentrations of hydrogen peroxide (H₂O₂). PCR, Western blot and immunofluorescence assays have confirmed the presence and functionality of the ESR1 receptor, while PCR assay has showed the presence of GPER-1 receptor mRNA in C6 cells. Our results confirmed that H₂O₂ induces cell death and pre-treatment with E2 (24 hours) and G1 (20 minutes) reduces H₂O₂ toxicity in a dose-dependent way, leading to increased cell viability. These results highlight the involvement of E2 and its receptors in preventing cell damage in glial cells. Moreover, they also suggest that the prompt E2 protective effect seems to be associated to the fast E2 signaling via GPER-1. We also evaluated the involvement of AKT-CREB-BDNF pathway when C6 cells were treated with E2, selective estrogen modulators (SERMs) and G1 by Western blot and RT-PCR assays, and we could notice that they can modulate the expression of AKT protein and BDNF RNAm levels.

Key words: C6. Estrogen. Oxidative stress. Cell viability.

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

SNC: Sistema nervoso central

ERO: Espécie reativa de oxigênio

E2: Estrógeno

ESR1 ou ER α : Receptor de estrógeno 1 ou receptor de estrógeno alfa

ESR2 ou ER β : Receptor de estrógeno 2 ou receptor de estrógeno beta

GP-130: Receptor de estrógeno acoplado a proteína G estimulatória 1

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

RT-PCR: Transcriptase Reversa-Reação em cadeia da polimerase

IGF-1: Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

DNA: Acido desoxirribonucléico

FT: Fator de transcrição

ERE: Elemento responsivo ao estrógeno

RTK: Receptor de tirosina quinase

ER: Receptor de estrógeno

mbER: Receptor de estrógeno ligado a membrana

PI-3K: Fosoinositol 3-quinase

MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno

mGluR1: Receptor de metabotrópico glutamatérgico

SERMs: Moduladores seletivos de estrógeno

DA: Doença de Alzheimer

NADPH: Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato

ERNs: Espécies reativas nitrogenadas

O₂: Oxigênio

REDOX: Redução-oxidação

TLR-4: Receptor Toll tipo 4

SBF: Soro bovino fetal

MEM: Meio Essencial Mínimo

L:Litro

g:Grama

M: Molar

CO₂: Dióxido de carbono
BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro
GAPDH: Gliceraldeído 3-fosfato-desidrogenase
RNA: Ácido ribonucléico
RNA_m: Ácido ribonucléico mensageiro
cDNA: DNA complementar
TAE: Tris-Acetato-EDTA
DTT: Ditionitrito
SDS: Dodecil sulfato de sódio
Tris-HCl: [*tris(hydroxymethyl)amino methane*]
LDH: Lactato desidrogenase
CREB: Elemento de resposta associado ao AMP cíclico
AKT: Proteína serina/treonina quinase
p-AKT: Proteína serina/treonina quinase fosforilada
ANOVA: análise de variância
cDNA: DNA complementar
DMSO: Dimetil sulfoxido
EPM: erro padrão da media
DAPI: 4,6-diamino-2-fenil-indol
PBS: Tampão fosfato salina
pb: Pares de base
TA: Temperatura de anelamento
NE: Extrato nuclear tratado com estrógeno
CE: Extrato citoplasmático tratado com estrógeno
CC: Extrato citoplasmático tratado com PBS
NC: Extrato nuclear tratado com PBS
h: Hora
UA: Unidades arbitrárias
Tam.: Tamoxifeno
Ful.: Fulvestranto
Da: Dalton
AMP: Adenosina monofosfato
AMPc: Adenosina monofosfato cíclica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Estrógeno, mecanismo de ação e suas relações com o SNC	12
1.2 Espécies reativas de oxigênio, inflamação e neurodegeneração	17
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 CULTURA DE CÉLULAS C6	21
3.2 RT-PCR	21
3.2.1 Extração do RNA total	21
3.2.2 Reação de RT(transcriptase reversa)	21
3.2.3 PCR (Reação em cadeia da polimerase)	22
3.3 Imunofluorescência para os receptores ESR1, ESR2 e GPER	23
3.4 Ensaio de Western Blot	24
3.5 Ensaio de viabilidade celular: liberação de lactato desidrogenase (LDH)	25
3.5.1 Curva dose-resposta para viabilidade celular com H ₂ O ₂ , E2 Tam e Ful.	25
3.5.2 Realização de tratamentos com H ₂ O ₂ , E2 Tam e Ful.	26
3.6 Análise de resultados	27
4 RESULTADOS	28
4.1 Análise dos níveis de RNA mensageiro dos receptores ESR1 e GPER por RT-PCR	28
4.2 Determinação da expressão protéica dos ESRs por imunofluorescência e Western Blot	29
4.3 Efeitos do tratamento com H ₂ O ₂ por 24 horas na viabilidade das células C6	32
4.4 Efeitos do tratamento concomitante de E2 e H ₂ O ₂ por 24h	34
4.5 Efeitos do pré-tratamento rápido (5 a 30 minutos) com E2 ou G1, (agonista do receptor de membrana GPER-1), na toxicidade induzida por H ₂ O ₂ nas células C6.	37
4.6 Efeitos do pré-tratamento com SERMS (Tam ou Ful) nos efeitos tóxicos induzidos por H ₂ O ₂ nas células C6.	39
4.7 Efeitos do pré-tratamento com E2, Tam, Ful ou G1 na ativação da AKT após exposição prolongada a H ₂ O ₂ nas células C6	42
4.8 Efeitos do pré-tratamento com E2, Tam, Ful ou G1 na fosforilação do fator de transcrição CREB após exposição prolongada a H ₂ O ₂ nas células C6	44
4.9 Efeitos do pré-tratamento com E2, Tam, Ful ou G1 nos níveis de RNAm de BDNF após exposição prolongada a H ₂ O ₂ nas células C6	45
4.10 Concentração de Anexina frente aos tratamentos.	46
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos demonstraram que mulheres no período pré-menopausa apresentam uma redução no risco de doenças cardiovasculares e no sistema nervoso central (SNC) em comparação com homens na mesma faixa etária (Prencipe et al., 1997; Barrett-Connor 1997). Entretanto, após a menopausa os riscos aumentam ou ainda ultrapassam as médias encontradas para os homens (Roquer et al., 1993; Barrett-Connor 1997). Embora os efeitos benéficos da terapia de reposição estrogênica em humanos estejam sob debate (Yaffe, 2003; DonCarlos et al., 2009), há uma vasta literatura em modelos animais mostrando que o estradiol (E2) é neuroprotetor e tem efeitos antiinflamatórios no encéfalo (Garcia-Segura et al., 2001; Morissette et al., 2008; Suzuki et al., 2009).

Nas últimas décadas foi claramente estabelecida a função protetora de estrogênios naturais e sintéticos para os neurônios no encéfalo de mamíferos utilizando diferentes abordagens *in vitro* e *in vivo* (Cyr et al., 2000; Kipp et al., 2006; Peri e Serio, 2008; Simpkins e Singh, 2008; Wilson et al., 2010; Tripanichkul et al., 2010).

Com relação aos mecanismos celulares e intracelulares associados ao estrógeno, 17- β -estradiol (E2), parece que este hormônio exerce uma ampla gama de funções em diferentes tipos de células. Vários mecanismos merecem ser mencionados em relação ao papel do E2 na proteção celular, entre eles, o de regular a produção do fator de crescimento IGF-1 (Cardona-Gomez et al., 2001; Ivanova et al., 2002), atenuar os processos pró-inflamatórios, através da diminuição da liberação de citocinas e óxido nítrico (Kajta et al., 2006; Kipp et al., 2007; Vegeto et al., 2008), ativar sinalização anti-apoptótica (Honda et al. 2001; Ivanova et al., 2002; Liu et al., 2003; Nilsen e Brinton, 2004), estar associado à melhora das atividades neuronal e sináptica (Karakaya et al., 2007; Woolley, 2007), e ainda atuar, em concentrações farmacológicas, como sequestrador de radicais livres no SNC (Behl, 2002).

1.1 Estrógeno, mecanismo de ação e suas relações com o SNC

Historicamente, os efeitos do E2 são atribuídos, principalmente, à sua ligação com um de seus dois receptores nucleares clássicos ER α e ER β , atualmente

receptores são designados ESR1 e ESR2, respectivamente, que agem como fatores de transcrição ativados por ligantes (Evans, 1988; Beato et al., 1989) modulando a atividade transcricional de alguns genes (Blaustein 2010; Deschamps e Murphy 2009; O'Lone et al., 2006). De forma mais detalhada, temos a presença dos ESR1 e/ou ESR2 inativos, acoplados a proteínas de choque térmico, presentes em maior concentração no citoplasma ou no núcleo da célula, localização esta que varia dependendo o fenótipo celular. Na presença de um agonista esse receptor se desliga da proteína de choque térmico e sofre uma dimerização, e este complexo migra para o núcleo com dois possíveis destinos, (1) ligar-se diretamente a uma região específica do DNA chamada de elemento responsivo ao estrógeno (ERE) agindo como fator de transcrição (FT) e levando a produção de proteínas específicas ou (2) agindo como co-fator transcricional, suprimindo ou induzindo a transcrição de outros genes, levando a produção ou inibição da síntese de proteínas específicas e diferentes das vinculadas ao ERE.

Em outra maneira, os ER podem ainda ser fosforilados pelos receptores de tirosina quinase (RTK). A fosforilação pode afetar a atividade do receptor, que sendo ativado pode translocar-se para o núcleo, mesmo na ausência de ligante. Por outro lado, ambos os ER citoplasmáticos e acoplados a membranas podem transativar os RTK ou receptores quinases associados, modulando cascatas intracelulares de sinalização.

Os receptores de estrógeno ligados a membranas (mbER) podem ser variações dos receptores intracelulares que estão acoplados a membranas, como a membrana plasmática, onde diretamente interagem com moléculas de sinalização, como a PI-3K, ativando a PI-3K e a via da MAPK, ou ainda com outros receptores, como os receptores metabotrópicos glutamatérgicos (mGluR1) (Morley et al., 1992; Aronica et al., 1994; Ahmad et al., 1999; Domenico et al., 1996; Imai et al. 1990; Zhou et al., 1996). O estrógeno e seus derivados podem ainda ligar-se aos receptores de estrógeno acoplados a proteína G (GPER-1) (G-protein coupled estrogen receptor-1) (Filardo et al., 2000; Filardo et al., 2002; Filardo, 2002; Thomas et al., 2005; Filardo e Thomas, 2005). A esses receptores de membrana são creditados os efeitos rápidos do E2, tais como aumento das concentrações intracelulares de cálcio e ativação de segundos mensageiros como o AMP cíclico (Lopez et al., 2001; Zheng et al., 2005; Vasudevan e Pfaff 2007).

Os receptores clássicos ESR1 e ESR2 quando transferidos para a membrana celular podem receber influência da ação do E2 e SERMs levando a efeitos rápidos (Segars e Driggers, 2002; Lösel e Wehling, 2003; Guo et al., 2005, Hewitt et al., 2005; Klinge et al., 2005; Song e Santen, 2006; Manavathi e Kumar, 2006). Como já mencionado, todos esses sinais desencadeados pelos receptores presentes na membrana plasmática promovem efeitos rápidos e ativação de vias de sinalização intracelular, muitas vezes de maneiras específicas em diferentes tipos celulares (Mendelsohn e Karas 1999; Simoncini et al., 2006; Kuppers et al., 2001; Bryant et al., 2006; Raz et al., 2008). Nas células da glia, por exemplo, acredita-se que esses receptores regulam a ativação de vias de sinalização de quinases (Dhandapani et al., 2005; Hirahara et al., 2009) e modificam os níveis intracelulares de cálcio (Chaban et al., 2004; Arnold, 2005; Kuo et al., 2009). De forma tardia, tal atividade de sinalização influencia fatores e co-fatores de transcrição que modulam a expressão gênica (Blaustein, 2010). Finalmente, compostos estrogênicos podem ainda agir em receptores presentes em organelas específicas, como a mitocôndria, o retículo endoplasmático e sinapses. O E2 pode também tamponar a ação de radicais livres, devido sua ação antioxidante, efeito esse alcançado devido à grande semelhança do E2 com a molécula dos flavonóides, antioxidantes clássicos.

De forma sucinta, os mecanismos de ação atualmente descritos do E2 via seus receptores clássicos e não-clássicos e seus efeitos diretos e indiretos, descritos acima, estão exemplificados na figura 1.

Figura 1. Representação esquemática dos mecanismos de ação do E2. Os compostos estrogênicos podem se ligar aos receptores de estrogênio intracelular ESR1 e/ou ESR2, que são translocados para o núcleo da célula (1). No núcleo eles reconhecem ERE, recrutam co-fatores e modulam a expressão gênica. Alternativamente, os ER podem interagir com outros fatores de transcrição (FT), regulando a expressão de genes diferentes, elementos de resposta (RE). Os ER também podem ser fosforilados pelo receptor tirosina quinase (RTK) (2), mesmo na ausência do ligante. Por outro lado, os ER presentes no citosol ou em membranas podem transativar os RTK modulando cascatas intracelulares. Receptores de estrogênio ligados a membrana (mber) são variantes de receptores intracelulares, que podem interagir diretamente com moléculas de sinalização (3) como PI-3K, ativando vias PI3K e MAPKs, ou com outros receptores, tais como receptores de glutamato metabotrópicos (mGluR1) (4). E2 e derivados também podem agir através de receptores acoplados a proteína G (GPER-1) (5). Todos esses sinais através da membrana plasmática ativam cascatas intracelulares que terminam em alvos citosólicos e/ou fatores de transcrição e cofatores que modulam a expressão gênica. Finalmente, compostos estrogênicos podem encontrar receptores em organelas específicas, como as mitocôndrias (6) ou podem tamponar radicais livres, devido às suas propriedades anti-oxidantes (7).
FONTE: DonCarlos et al. (2009).

Os receptores ESR1 e ESR2 podem ter funções distintas no sistema imunológico, esquelético, cardiovascular e SNC (Couse e Korash, 1999; Gustafsson, 2003; Harris, 2007). Por exemplo, ESR1 e ESR2 podem ter ações opostas nas regiões promotoras de alguns genes, particularmente daqueles envolvidos na

proliferação celular, sendo que a resposta proliferativa ao E2 pode ser resultado de um balanço entre as sinalizações de ESR1 e ESR2 (Liu et al., 2002). Na verdade, foram propostos alguns modelos de ação, envolvendo tanto cooperação como a competição entre dois receptores (Matthews e Gustafsson, 2003).

É evidente que muitos dos efeitos descritos do E2 não são diretos, e podem envolver a ativação de células não-neuronais, como por exemplo, astrócitos e microglia (Gonzalez Deniselle et al., 2001; Mahesh et al., 2006; Morale et al., 2006), que além de estarem envolvidas em uma ampla variedade de funções, incluindo a regulação do metabolismo neuronal, atividade neuronal, plasticidade e transmissão sináptica (Arevalo et al., 2010) parecem estar envolvidas primariamente neste efeito de neuroproteção (Dhandapani e Brann, 2003, Sortino et al., 2004, Plantania et al., 2005).

As ações do E2 e SERMs (moduladores seletivos de receptores de estrógeno) nas células da glia envolvem sinalização pelo ER iniciada no núcleo, na membrana, ou no citoplasma, assim como mecanismos independentes de ERs. Estas células expressam ERs clássicos (Garcia-Ovejero et al., 2005) e esta expressão está aumentada em diferentes condições patológicas (Blurton-Jones e Tuszynski, 2001; Garcia-Ovejero et al., 2002), que pode facilitar as ações do E2 para reduzir o dano neuronal. De fato, é notada uma maior expressão de ERs em tecido cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer (DA), demonstrando uma expressão aumentada dos ESR1 no núcleo basal de Meyert (Ishunina e Swaab, 2001; Carbonaro et al., 2009), no ramo vertical da banda diagonal de Broca (Ishunina e Swaab, 2003), bem como em outras áreas selecionadas do encéfalo (Lu et al., 2003). Este aumento da expressão dos ESR1 envolve especificamente astrócitos reativos que circundam a área lesada e as placas de β -amilóide (Lu et al., 2003).

1.2 Espécies reativas de oxigênio, inflamação e neurodegeneração

As EROs são essenciais na manutenção da homeostase celular. O ambiente redox intracelular é constantemente controlado e mantido em estado redutor, a não ser que a célula seja exposta a situações oxidantes extremas. A homeostase redox é crucial para que diversas funções celulares ocorram de maneira adequada, tais como ativação enzimática, síntese de DNA, regulação do ciclo celular e até mesmo

apoptose (Kamata e Hirata, 1999). As EROs incluem espécies radicalares como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e radical hidroxila ($-OH$), assim como espécies não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Kamata e Hirata, 1999). A maior fonte endógena de EROs é a mitocôndria, onde $O_2^{\bullet-}$ é gerado pela cadeia transportadora de elétrons (Srinivasan et al., 2001; Le Bras et al., 2005). A atividade de algumas enzimas como a NADPH oxidase, citocromo C oxidase e xantina oxidase também são fontes endógenas de EROs. A presença de metais redox ativos, como ferro e cobre, contribui para a geração de EROs (Babior, 1999; Kehrer, 2000; Vignais, 2002).

As células são equipadas com agentes antioxidantes, que são moléculas capazes de decompor EROs. Os maiores grupos de agentes antioxidantes são: moléculas com baixo peso molecular (vitaminas C e E, e as ubiquinonas), enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, redutase e catalase) e moléculas contendo grupos tióis (como a glutathiona) (Arrigo, 1999).

Em 1985, Helmut Sies (Sies e Cadenas, 1985) definiu estresse oxidativo como um desequilíbrio celular no qual os oxidantes predominariam sobre os antioxidantes. Ou seja, quando a produção de EROs e ERNs (espécies reativas nitrogenadas) excedesse a capacidade de defesa dos antioxidantes, ocorreria o estresse oxidativo (Poon et al., 2004). Neste sentido, o termo estresse oxidativo refere-se, portanto, à citotoxicidade causada por EROs e ERNs, incluindo o $O_2^{\bullet-}$, radical hidroxila ($-OH$) e H_2O_2 , que são produtos de processos metabólicos normais ou anormais que utilizam oxigênio molecular (O_2) (Coyle e Puttfarcken, 1993).

Esta idéia do desequilíbrio entre fatores oxidantes e antioxidantes para explicar o estresse oxidativo, embora ainda seja válida para explicar a modulação da concentração de EROs no organismo, está sendo atualmente substituída por uma visão mais complexa e elaborada de que as EROs intermediariam circuitos de sinalização fisiológicos e patológicos e lesões a constituintes celulares. Neste contexto, o estresse oxidativo seria resultado de um aumento na geração de EROs que, além de diretamente ocasionarem danos a constituintes celulares, atuariam como intermediários de circuitos redox. A ativação destes circuitos patológicos levaria a um aumento na proliferação, migração, remodelamento da matriz celular e inflamação, resultando, por exemplo, na lesão vascular observada na hipertensão arterial (Jones, 2006; Augusto, 2006).

Há provas convincentes de que a neurodegeneração no SNC e processos neuropatológicos agudos/crônicos estão freqüentemente associados a distúrbios e disfunções de mitocôndrias (Knott et al., 2008), uma vez que nesses quadros pode-se observar a atividade mitocondrial mais elevada, o que gera maior produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) como subproduto da reação.

Estudos vêm demonstrando a presença de receptores de E2 na mitocôndria e sugerindo uma ação local desse hormônio na manutenção e proliferação celular (Pedram et al., 2006). Sawada et al. (1998) mostraram que o pré-tratamento com E2 conferiu neuroproteção contra morte neuronal induzida por ânions superóxido e por H_2O_2 em cultura primária de células dopaminérgicas através de marcação com diacetato de diclorofluorescina, um marcador de radicais oxigenados. Vale ressaltar que um importante mecanismo de ação envolvido nos efeitos neuroprotetores de compostos estrogênicos está relacionado com a regulação da função mitocondrial (Brinton, 2008) (ver Figura 1). A função de uma mitocôndria intacta é essencial para a homeostasia da energia celular e sua sobrevivência celular, mas a falha nas funções mitocondriais tem sido de grande correlação com a etiologia de diversas doenças neurodegenerativas como doença de Alzheimer, Parkinson, Huntington, entre outras (Simpkins et al., 2005a, b, 2008). Há evidências sugerindo que a função mitocondrial é regulada por E2, uma vez que, em uma grande variedade de células, inclusive neurônios, é possível observarmos a localização de receptores de estrógeno nessa organela (Yang et al., 2004; Simpkins et al., 2008). Assim, os efeitos neuroprotetores dos SERMs podem ser dependente, em parte, da ativação dos ER na mitocôndria. Embora tais achados na literatura sejam controversos (Schweand e Gustafsson, 2006; Yang et al., 2006), existem evidências sugerindo que a ativação de ESR2 na mitocôndria pode inibir a sinalização apoptótica (Hsieh et al., 2006)

O controle da ação das EROs no SNC é de grande importância uma vez que estes tem a capacidade direta de modular os TLR-4 e a expressão de citocinas (Kieran, 2004). O papel da microglia ativada presente nos quadros inflamatórios e neurotóxicos no SNC também pode ser controlados pela diminuição de EROs (Dimayuga et al., 2007). O E2 tem capacidade de desempenhar um papel neuroprotetor atenuando o efeito do estresse oxidativo em células do SNC (Pratima et al., 2003). Esta ação poderia estar vinculada a sua atividade nos receptores clássicos, não-clássicos ou simplesmente pela sua ação antioxidante (Viña et al.,

2005). Sendo o E2 um agente farmacológico ideal para a diminuição dos efeitos negativos das EROs no SNC, é importante elucidarmos o papel das vias clássica, via ESR, e não-clássica, via GPER, sobre a modulação deste efeito. Vale salientar que em função da sua recente caracterização, pouco se sabe a respeito das funções fisiológicas do GPER no SNC, ou mais especificamente nas células da glia, onde eles podem atuar modulando a via AKT-CREB-BDNF, uma das possíveis vias de sinalização responsáveis pela proteção exercida pelo E2.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar possíveis efeitos protetores do 17β -estradiol em modelo de estresse por peróxido de hidrogênio em cultura de linhagem de células C6 de glioma de rato.

2.2 Objetivos específicos

1) Analisar a participação dos receptores de E2 (ESR1, ESR2 e GPER-1) na proteção desencadeada por esse hormônio em linhagem de células C6 de glioma de rato, utilizando peróxido de hidrogênio como fonte de estresse oxidativo e de moduladores seletivos dos ER (SERMs): Tamoxifeno e Fulvestranto; bem como do agonista G1 para o GPER .

2) Verificar se o efeito de proteção desencadeado pelo E2, SERMs ou G1 ativam a via AKT-CREB-BDNF, já que essa é uma das possíveis vias de sinalização responsáveis pela proteção exercida pelo E2, em nosso modelo experimental.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura de células C6

As células C6 (ATCC, VA, EUA) foram mantidas em meio de cultura MEM “Minimum Essential *Medium*” (Gibco, NY, EUA) sem fenol, suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab, SP, Brasil), 100 unidades/mL de penicilina e 100 µl/mL estreptomicina a 37 °C em 5% CO₂. 24 horas antes dos tratamentos, 2×10^2 ou 2×10^3 células foram plaqueadas e mantidas em incubadora à 95% O₂ / 5% CO₂, a 37 °C para que aderissem e atingissem 80% de confluência nos dias de experimento.

3.2 RT-PCR (Transcriptase reversa – reação em cadeia da polimerase)

Realizamos o ensaio de RT-PCR para determinar as variações nos níveis do RNAm para ESR1, ESR2 e GPER-1, para determinarmos se nossas células teriam capacidade de expressar tais proteínas para esses receptores. Ainda, realizamos este ensaio para BDNF e GAPDH no intuito de avaliar se os grupos tratados apresentavam alguma alteração na expressão gênica desta neurotrofina.

3.2.1 Extração do RNA total

O RNA total das células C6 foi extraído com o reagente Trizol[®] (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. O RNA total extraído foi ressuspendido em água DEPC e estocado a –80 °C até o dia do ensaio. A leitura das absorbâncias para o cálculo das concentrações de RNA total foi realizada em 260nm e então uma solução contendo 2 µg de RNA total foi preparada para ser utilizada no ensaio de RT-PCR.

3.2.2 Reação de RT (transcriptase reversa)

Todas as amostras de RNA foram inicialmente tratadas com DNase I (Invitrogen) de acordo com o fabricante para eliminar a presença de DNA nas amostras. As amostras foram incubadas por 15 minutos a 25 °C numa mistura

contendo RNase-free DNase e tampão da RNase-free DNase. Após este tempo, as amostras foram incubadas a 65 °C com EDTA (25 mM) (Invitrogen) por 10 minutos.

A reação pela obtenção do cDNA pela ação da transcriptase reversa (RT) foi realizada usando 500 ng de Oligo (dT)12-18 (Invitrogen) a 70 °C por 5 minutos. Após este tempo, os tubos foram imediatamente colocados no gelo e os seguintes reagentes foram adicionados: 4 µL de tampão RT 5x concentrado (Fermentas, Hanover, MD, EUA), 2 µL de dNTP mix 10mM (Fermentas), 1 µL de inibidor de ribonuclease 1000 U (Fermentas) por 5 minutos a 25 °C e em seguida foi adicionado 1 µL de RT 1000U (Fermentas). Essa mistura foi incubada por 10 minutos a 25 °C, seguida de uma incubação de 60 minutos a 42 °C e por último de 70 °C a 10 minutos. Após esse tempo, a reação foi terminada aquecendo as amostras a 70 °C por 15 minutos. Até o momento de serem submetidas à reação de PCR, as amostras foram mantidas a -80 °C.

3.2.3 PCR (Reação em cadeia da polimerase)

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram diluídos em tampão TE (10 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 1mM de EDTA) a uma concentração de 100 µM. O volume final da reação de PCR foi de 25 µL, e continha de 1 a 5 µL de cDNA (amostra), 2,5 µL de tampão para PCR 10x concentrado (Invitrogen, CA, EUA), 0,5 µL do *primer* iniciador 5' (*sense*) (10 µM), 0,5 µL do *primer* iniciador 3' (*antisense*) (10 µM), 0,5 µL de dNTP Mix (100 mM), 1 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,2 µL de *Taq Polimerase* (5 U/mL, Invitrogen) e água DEPC em quantidade suficiente para 50µL . A reação foi realizada no aparelho PCR Modelo TC-512, Techne (Staffordshire, Reino Unido).

As condições utilizadas do PCR foram: 1 ciclo inicial de desnaturação (94 °C, 4min) seguido de (X) números de ciclos de desnaturação, conforme tabela 1, (à 94 °C por 1min), ciclo de anelamento onde a temperatura varia em relação a tabela 1 (Y °C) por 1min e ciclo de extensão (à 72 °C, por 2min). Ao final, um ciclo final de extensão (72 °C, 7min) foi realizado.

Tabela 1 - Relação de oligonucleotídeos iniciadores utilizados, com suas sequência, pares de base, tamanho do produto formado, temperatura de anelamento individual utilizada e numero de ciclos realizados

Oligonucleotídeos Iniciadores	Seqüências (5'- 3')	Tam. do Produto	Temp.de anelamento (Y)	Núm.de ciclos (X)
BDNF	sense –ATGCTCAGCAGTCAAGTGCC	304	59 °C	32
	antisense –AGCCTTCCTTCGTGTAACCC			
GAPDH	sense – GCCAAGTATGATGACATCAAGAAG	357	63 °C	25
	antisense - TCCAGGGGTTTCTTACTCCTTGGA			
GPER	sense –GGCTTTGTGGGCAACATC	94	65 °C	35
	antisense –CGGAAAGACTGCTTGCAGG			
ESR1	sense – GCGGCTGCCACTGACCATG	185	67,5 °C	45
	antisense - CCTCGGGGTAGTTGAACACGG			

Pós o PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% com tampão TAE. O tamanho dos produtos esperados foi comparado a um padrão de tamanho molecular (100 bp DNA ladder, Invitrogen). O GAPDH foi utilizado como controle interno da reação.

3.3 Imunofluorescência para os receptores ESR1, ESR2 e GPER

Para a imunofluorescência, as células C6 foram fixadas com metanol 100% por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a lavagem com PBS, as mesmas foram incubadas com 40 mM de glicina-PBS por 5 minutos, e novamente foram lavadas com PBS. A seguir, as células foram incubadas com soro de bloqueio (5% de soro de burro + 0,01% Triton X-100 em PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguiu-se lavagem em PBS e incubação com anticorpo primário para as células C6 (GPER, ESR1 e ESR2 1:100; Abcam), diluído no soro de bloqueio, *overnight* sob agitação mínima a 4 °C. A seguir, as células foram lavadas com PBS e incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente com anticorpo secundário

conjugado à fluoróforo [anti-rabbit AlexaFluor 555 1:500 (Invitrogen)]. Finalmente, as lamínulas contendo as células foram lavadas com PBS, incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente com DAPI (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA) (1:50,000, diluído em Triton X-100 0,01% em PBS), lavadas novamente e montadas na lâmina com Fluoromount-G (Southern Biotech, PA, EUA) e seladas com esmalte. As células foram observadas no microscópio de fluorescência Nikon Eclipse 80i (Nikon Instruments Inc., NY, EUA). As imagens foram capturadas pela Nikon Digital Camera DXM 1200C e analisadas pelo software de Imagem *NIS-Elements Advanced Research 2.30* (Nikon Instruments Inc.). Foram observados dez campos visuais em três lamínulas diferentes.

3.4 Ensaio de Western Blot

As alterações induzidas pelos tratamentos realizados na concentração de Anexina, AKT, p-AKT, p-CREB e β -Actina foram avaliadas pelo ensaio de Western blot.

Para a extração de proteínas nucleares, o método que utilizamos foi baseado no trabalho de Rong e Baudry (1996). As células foram coletadas em PBS e centrifugadas a 12000 g x 3 minutos x 4 °C e o *pellet* foi ressuscitado em tampão de lise (10 mM HEPES; 1,5 mM MgCl₂; 10 mM KCl; 2 µg/mL leupeptina; 2 µg/mL antipaína; 0,5 mM PMSF; 0,1 mM EDTA; 30 mM NaF; 3 mM ortovonadato; 0,5 mM DTT; 2 mM pirofosfato) e incubado em gelo durante 15 minutos. Foi adicionado, em seguida, NP-40 0,5% com agitação vigorosa por 10 segundos em vórtex, centrifugando-se, em seguida, as amostras a 13000 g por 30 segundos a 4 °C. O sobrenadante foi considerado a fração citosólica e mantido para ser utilizado no ensaio de Western Blot. O *pellet* foi ressuscitado em tampão de extração (20 mM HEPES; 1,5 mM MgCl₂; 300 mM NaCl; 0,25 mM EDTA; 2 µg/mL leupeptina; 2 µg/mL antipaína; 0,5 mM PMSF; 30 mM NaF; 3 mM ortovonadato; 0,5 mM DTT; 2 mM pirofosfato) e incubado 20 minutos em gelo, seguido de centrifugação a 13.000 g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante, que corresponde a fração nuclear, foi recolhido e a concentração de proteínas determinada de acordo com o método descrito por Bradford (1976).

As proteínas foram ajustadas na concentração adequada com o tampão de Laemmli (1970) (0,125 M tris-HCl; 4% SDS; 20% v/v glicerol; 0,2 M DTT; 0,02% azul de bromofenol; pH 6,8) e aquecidas por 5 minutos a 95 °C. As proteínas foram aplicadas em gel SDS-PAGE 7%. Para a eletroforese (100V por 1hr e 30min), foi usado um tampão de corrida Tris-Glicina (25 mM tris-base; 0,192 M glicina; 0,1% SDS). As proteínas foram transferidas por eletroforese para uma membrana de nitrocelulose por 1 h a 400 mA utilizando tampão de transferência (25 mM tris-base; 192 mM glicina; 20% (v/v) metanol). Após a transferência, as membranas foram submetidas ao sistema SNAP (Millipore, Billerica, MA, EUA), onde seguimos as recomendações do fabricante. Os anticorpos primários utilizados foram o anti-ESR1, anti-ESR2 e anti-GPER 1:1000 (Abcam), anti-anexina 1:350 (Abcam), anti AKT 1:700 (Santa Cruz), p-CREB 1:700, p-AKT 1:500 (Chemicon) e β -Actina 1:3000 (Sigma). O anticorpo secundário utilizado foi anti-mouse, anti-rabbit 1:2000 e anti-goat 1:2500 (Sigma). A revelação foi feita por meio de kit de quimioluminescência ECL (Thermo Fisher Scientific).

3.5 Ensaio de viabilidade celular: liberação de lactato desidrogenase (LDH)

A atividade da LDH foi medida pelo kit de detecção de citotoxicidade CytoTox 96 (Promega, Madison, WI, EUA). Este ensaio consiste na conversão do sal cloreto de iodofenil-nitrofenil tetrazólio em formazan. A reação é catalisada pela enzima LDH, enzima liberada do citosol pelas células mortas, e pela diaforase, um substrato presente no kit. 50 μ L da mistura de reação foram adicionados a 50 μ L do sobrenadante das células. A solução resultante foi então incubada por 30 minutos em temperatura ambiente e em seguida foi realizado a leitura em 490 nm.

3.5.1 Curva dose-resposta para viabilidade celular com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), E2, Fulvestranto e Tamoxifeno.

Utilizamos kit (Promega) para a determinação da dosagem de Lactato desidrogenase (LDH), encontramos através de uma curva-dose resposta, a menor concentração de H_2O_2 que foi tóxica para as células C6, porém essa toxicidade ainda pôde ser revertida com o tratamento com E2.

3.5.2 Realização de tratamentos com H_2O_2 , E2, G1, Tamoxifeno e Fulvestranto.

Determinamos as curvas concentração/tempo-efeito para H_2O_2 , E2, G1, Tamoxifeno e Fulvestranto nas C6 através do ensaio da LDH (Kit da Promega) onde avaliamos a diminuição da viabilidade celular mediada pelo H_2O_2 e a proteção conferida pelo pré-tratamento com E2, agonista de E2 Tamoxifeno e G1 e ainda bloqueio do efeito protetor pelo antagonista estrogênico Fulvestranto.

Após a padronização das curvas concentração/resposta para o E2, SERMs e G1, foram definidos os esquemas de tratamento descritos abaixo na tabela 2:

Tabela 2 - Modelo de tratamento utilizado para avaliar os efeitos do E2, G1, tamoxifeno e fulvestranto na toxicidade induzida pela H_2O_2 .

Identificação	Grupos	Pré-tratamento	Tratamento	Concentrações dos tratamentos
1	Controle	PBS por 2h	Mesmo meio de PBS por mais 24h	
2	H_2O_2	PBS por 2h	Adição de H_2O_2 ao meio e incubação por 24h	H_2O_2 75 μ M
3	E2	E2 por 2h	Mesmo meio de E2 por mais 24h	E2 10 nM
4	H_2O_2 + E2	E2 por 2h	Adição de H_2O_2 ao meio e incubação por 24h	H_2O_2 75 μ M e E2 10 nM
5	Tam	Tam. por 2h	Mesmo meio de Tam. por mais 24h	Tam 1 μ M
6	Tam + H_2O_2	Tam. por 2h	Adição de H_2O_2 ao meio e incubação por 24h	Tam 1 μ M e H_2O_2 75 μ M
7	Ful	Ful. por 2h	Mesmo meio de Ful. por mais 24h	Ful 10 μ M
8	Ful + H_2O_2	Ful. por 2h	Adição de H_2O_2 ao meio e incubação por 24h	Ful 10 μ M e H_2O_2 75 μ M
9	Ful + H_2O_2 + E2	Ful. por 2h	Adição de H_2O_2 e E2 ao meio e incubação por 24h	Ful 10 μ M , H_2O_2 75 μ M e E2 10 nM
10	G1	G1 por 20 min	Troca de meio com G1 por meio com PBS por 24h	G1 100 nM
11	G1 + H_2O_2	G1 por 20 min	Troca de meio com G1 por meio com H_2O_2 por 24h	G1 100 nM e H_2O_2 75 μ M

3.6 Análise de resultados

Todos os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. Os dados receberam tratamento estatístico pelo teste ANOVA (*Analysis of Variance*) de uma via seguido do pós-teste Student Newman-Keuls (GraphPad Prism5 software package, GraphPad Software, San Diego, CA, USA), onde as diferenças foram consideradas significantes para o valor $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

EXPRESSÃO DOS RECEPTORES ESR E GPER-1 NAS CÉLULAS C6

4.1 Análise dos níveis de RNA mensageiro dos receptores ESR1 e GPER por RT-PCR

Para caracterizar a presença dos receptores ESR1 e GPER-1 nas células C6 realizamos o ensaio de RT-PCR (Figuras 2 e 3). Em uma primeira fase, procuramos caracterizar as condições ideais de ensaio para os primers ESR1 e GPER. Depois de varias tentativas com concentrações diferentes de cDNA, temperatura de anelamento e número de ciclos, definimos que a situação ideal para estudos do RNAm para ESR1 é de 45 ciclos, temperatura de anelamento em 67,5 °C e 5 µL de cDNA nas células C6 tratadas com PBS, e 35 ciclos, temperatura de anelamento em 65 °C e 5 µL de cDNA para o GPER-1. Nossos resultados mostram que as células C6 apresentam o RNAm tanto do receptor clássico ESR-1 como do receptor de membrana GPER-1.

Figura 2. Análise da expressão do RNAm de ESR1 para as células C6 contole. Utilizamos 1µL de cDNA de extrato de útero de ratas Wistar (linha 1) como controle positivo para ESR1 com 37 ciclos a 67,5°C de temperatura de anelamento (TA). Foi utilizado 5µL de cDNA de C6 a 67,5 °C em números de ciclos crescentes de 37(linha 2), 42 (linha 3) e 45 (linha 4). Como controle negativo realizamos a reação de todos os constituintes do mix na ausência de cDNA em 45 ciclos, 67,5 °C (TA) (linha 5).

Figura 3. Análise da expressão do RNAm de GPER-1 para as células C6 controle.

Utilizamos 1µL de cDNA de extrato de ovário e útero de ratas Wistar, respectivamente (linha 4 e 5) como controle positivo para GPER-1 com 35 ciclos a 65 °C (TA). Foram utilizadas concentrações graduais de cDNA de C6 sendo 1µL (linha 1), 2 µL (linha 2) e 5µL (linha 3) a 65 °C (TA) todos em 35 ciclos. Como controle negativo realizamos a reação de todos os constituintes do mix na ausência de cDNA em 35 ciclos, 65 °C (TA) (linha 6).

4.2 Determinação da expressão protéica dos ESRs por imunofluorescência e Western Blot

Para verificar a presença da proteína dos ER nas células C6, em nosso modelo experimental, realizamos ensaios de imunofluorescência e Western Blot. Na figura 4, podemos notar que as células C6 controles que foram incubadas com PBS, apresentaram uma maior concentração de ERs no citoplasma, em relação ao núcleo. Frente ao tratamento com E2 notamos uma inversão deste quadro, onde as células C6 apresentam maior fluorescência na região nuclear, em relação ao citoplasma.

Figura 4. Fotomicrografias de microscopia da cultura de células C6 submetida à imunofluorescência com anticorpo anti-ESR1 ou ESR2 e marcador nuclear DAPI. **A.** As células C6 foram marcadas com DAPI (azul). **B.** Padrão de imunorreatividade ao ESR1, após tratamento de E2 1 μ M por 24 horas. **C.** Imagem sobreposta de A e B. **D.** As células foram marcadas com DAPI. **E.** Padrão de imunorreatividade ao ESR1, após tratamento com PBS (24h). **F.** Imagem sobreposta de A e B. **G.** As células C6 foram marcadas com DAPI. **H.** Padrão de imunorreatividade ao ESR2, após tratamento de E2 (1 μ M, 24 h). **I.** Imagem sobreposta de G e H. **J.** As células foram marcadas com DAPI. **K.** Padrão de imunorreatividade ao ESR2, após tratamento com PBS por 24h. **L.** Imagem sobreposta de J e K.

Para confirmação de tal caracterização, realizamos o ensaio de Western Blot (Figura 5), onde podemos observar que o tratamento com PBS demonstra uma maior expressão dos receptores ESR1 no citoplasma, em relação ao núcleo, e que frente ao tratamento com E2 (0,1 μ M por 24h) notamos agora uma maior concentração deste receptor no núcleo dessas células. Esses dados corroboram os resultados de imunofluorescência, mostrados na figura 4.

Figura 5. Expressão e translocação nuclear dos receptores ESR-1 em células C6 tratadas com estrógeno (E2) ou PBS. A) Imagem representativa das autoradiografias provenientes do ensaio de western blot realizado em proteínas nucleares (10 ug) e citosólicas (10 ug). B) Análise densitométrica (unidades arbitrárias) da razão proteína nuclear/citosólica representadas em A. Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. de 4 experimentos individuais. ** $p < 0,01$ vs PBS (two-tailed T test). β -actina foi utilizado como controle interno do ensaio

Como esperávamos uma localização nuclear e não citoplasmática dos ERs, realizamos o ensaio de imunofluorescência sob as mesmas condições, mas agora com outra linhagem celular MCF-7, linhagem esta de câncer de mama que é bem estabelecida por apresentar expressão dos ERs. Nossos resultados de imunofluorescência mostraram que as células MCF-7 tratadas com PBS apresentam visualmente maior concentração de ESR1 no citoplasma, em relação ao núcleo, e que o tratamento com E2, 1 μ M por 24h, leva a inversão deste quadro, onde temos maior concentração de ESR1 no núcleo, em relação ao citoplasma (Figura 6).

Figura. 6. Fotomicrografias de microscopia da cultura de células MCF-7 submetidas à imunofluorescência com anticorpo anti-ESR1 e marcador nuclear DAPI. A. As células MCF-7 foram marcadas com DAPI (azul). **B.** Padrão de imunorreatividade ao ESR1, após tratamento de E2 1 µM por 24 h. **C.** Imagem sobreposta de A e B. **D.** As células foram marcadas com DAPI. **E.** Padrão de imunorreatividade ao ESR1, após tratamento com PBS (24 h). **F.** Imagem sobreposta de A e B.

EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO COM ESTRÓGENO, SERMS E G1 NA VIABILIDADE CELULAR APÓS INSULTO COM H₂O₂

4.3 Efeitos do tratamento com H₂O₂ por 24 horas na viabilidade das células C6

A próxima etapa foi determinar a concentração de H₂O₂ capaz de induzir morte celular, mas que ainda pudesse ser atenuada pelo pré-tratamento com estrógeno. Assim, realizamos uma curva concentração-resposta em duas com duas densidades de células por poço (2×10^2 e 2×10^3) para a toxicidade do H₂O₂ em cultura de células C6 (24 hrs), sendo o grupo controle tratado com veículo (PBS). Os valores acima de 100 µM de H₂O₂ significativamente causaram morte celular, porém em todos esses grupos as concentrações foram muito elevadas para o efeito desejado. Desta maneira, realizamos novas curvas, onde nossos dados mostraram que as concentrações 50 e 75µM de H₂O₂, como aumento da concentração de LDH,

geraram morte em nossas células, em níveis ainda possíveis de serem atenuados dados mostrados nas Figuras 7 e 8.

Ainda, nossos resultados mostraram que o efeito tóxico induzido pelo tratamento com H_2O_2 nas células C6 é dependente da densidade de células por poço (Figuras 7 e 8), onde um incremento de 10 vezes no número de células é capaz de gerar uma curva dose-resposta em U (2×10^3 células) ou U invertido (2×10^2 células) para a H_2O_2 .

Figura 7. Atividade da enzima LDH no meio de incubação das células C6 tratadas com H_2O_2 . A atividade de LDH no meio de incubação das células C6 (2×10^3 células/poço) tratadas 24hrs com H_2O_2 foi determinada pelo kit citotoxicidade CytoTox 96 (Promega) pela leitura na absorvância em 490 nm. Os dados representam as médias $\pm$ EPM. (n= 8, provenientes de 3 lotes de culturas independentes). ***P<0,001 vs C6 tratado com PBS; U.A.= Unidades Arbitrárias.

Figura 8. Atividade da enzima LDH no meio de incubação das células C6 tratadas com H_2O_2 . A atividade de LDH no meio de incubação das células C6 (2×10^2 células/poço) tratadas 24hrs com H_2O_2 foi determinada pelo kit de citotoxicidade

CytoTox 96 (Promega) pela leitura na absorvância em 490nm. Os dados representam as médias $\pm$ EPM. (n= 8, provenientes de 3 lotes de culturas independentes). ***P<0,001 vs C6 tratado com PBS; U.A.= Unidades Arbitrárias.

4.4 Efeitos do tratamento concomitante de E2 e H₂O₂ por 24h

Uma vez definidas as doses de H₂O₂, avaliamos os efeitos do E2 na modulação da toxicidade induzida por H₂O₂ em células C6. Os ensaios de viabilidade celular mostraram que o E2 não foi capaz de proteger as células C6 da toxicidade induzida por H₂O₂ (50uM) e em alguns casos chegou até a potencializar esse efeito tóxico (Figura 9). Quando aumentamos a concentração de H₂O₂ para 75uM, esse efeito potencializador do E2 foi perdido (Figura 10).

Novamente, o efeito do tratamento com E2 foi dependente da densidade celular, uma vez que numa densidade menor de células (2.10² células/poço), o tratamento com E2 foi capaz de atenuar os efeitos tóxicos induzidos pela exposição da células C6 a H₂O₂ nas concentrações de 50uM ou 75uM (Figura 11 e 12). Nossos resultados também mostraram que enquanto na menor concentração de H₂O₂ (50uM), o tratamento com E2 foi protetor apenas na concentração de 100nM, na toxicidade gerada pela exposição a 75uM de H₂O₂, esse hormônio foi capaz de atenuar a morte celular mesmo na concentração mais baixa, de 10nM (Figuras 11 e 12).

Diante desses resultados, decidimos utilizar a densidade de 2 x 10² células/poço e a concentração de 75uM para a H₂O₂ nos próximos experimentos para avaliar os efeitos protetores do E2.

Figura 9. Atividade da enzima LDH no meio de incubação das células C6 tratadas com E2 e H₂O₂. As culturas de células C6 (2 x 10³ células/poço) foram expostas por 24h à PBS (controle), ao H₂O₂ (50 µM), ao E2 (0,01 ou 0,1µM) ou tratamento concomitante entre H₂O₂ (50 µM) e E2 (0,01 ou 0,1µM). A atividade da enzima LDH foi determinada pelo kit de citotoxicidade CytoTox 96 (Promega) pela leitura na absorbância em 490 nm. Os dados representam as médias ± EPM. . (n= 8, provenientes de 3 lotes de culturas independentes). ***P<0,001 e **P<0,01 vs C6 tratado com PBS; U.A.= Unidades Arbitrárias.

Figura 10. Atividade da enzima LDH no meio de incubação das células C6 tratadas com E2 e H₂O₂. As culturas de células C6 (2 x 10³ células/poço) foram expostas por 24 h à PBS (controle), ao H₂O₂ (75 µM), ao E2 (0,01 ou 0,1µM) ou tratamento concomitante entre H₂O₂ (75 µM) e E2 (0,01 ou 0,1µM). A atividade da enzima LDH foi determinada pelo kit de citotoxicidade CytoTox 96 (Promega) pela leitura na absorbância em 490 nm. Os dados representam as médias ± EPM. (n= 8, provenientes de 3 lotes de culturas independentes). ***P<0,001 vs C6 tratado com PBS; U.A.= Unidades Arbitrárias.

Figura 11. Atividade da enzima LDH no meio de incubação das células C6 tratadas com E2 e H₂O₂. As culturas de células C6 (2 x 10² células/poço) foram expostas por 24h à PBS (controle), ao H₂O₂ (50 µM), ao E2 (0,01 ou 0,1µM) ou tratamento concomitante entre H₂O₂ (50 µM) e E2 (0,01 ou 0,1µM). A atividade da enzima LDH foi determinada pelo kit de citotoxicidade CytoTox 96 (Promega) pela leitura na absorbância em 490 nm. Os dados representam as médias ± EPM. (n= 10, provenientes de 3 lotes de culturas independentes). *P<0,05 e ***P<0,001 vs C6 tratado com PBS; +P<0,05 vs C6 tratado com H₂O₂ 50µM. U.A.= Unidades Arbitrárias.

Figura 12. Atividade da enzima LDH no meio de incubação das células C6 tratadas com E2 e H₂O₂. As culturas de células C6 (2 x 10² células/poço) foram expostas por 24 h à PBS (controle), ao H₂O₂ (75 µM), ao E2 (0,01 ou 0,1µM) ou tratamento concomitante entre H₂O₂ (75 µM) e E2 (0,01 ou 0,1µM). A atividade da enzima LDH foi determinada pelo kit de citotoxicidade CytoTox 96 (Promega) pela leitura na absorbância em 490nm. Os dados representam as médias ± EPM. (n= 10, provenientes de 3 lotes de culturas independentes).

***P<0,001 vs C6 tratado com PBS; ++P<0,01 vs C6 tratado com H₂O₂ 75 µM; U.A.= Unidades Arbitrárias.

4.5 Efeitos do pré-tratamento rápido (5 a 30 minutos) com E2 ou G1, agonista do receptor de membrana GPER-1, na toxicidade induzida por H₂O₂ nas células C6.

Para avaliar se esse efeito protetor do E2 era dependente da ativação dos seus receptores de membrana, realizamos o pré-tratamento das células C6 com E2 nas doses de 10nM e 100nM entre 5 a 30 minutos antes do insulto induzido por H₂O₂. Nossos resultados mostraram que o pré-tratamento com E2 na dose de 10uM além de não ser capaz de atenuar os efeitos tóxicos induzidos pela H₂O₂, potencializou a toxicidade nas exposições mais curtas a esse hormônio (Figura 14). Entretanto, no pré-tratamento com 100nM de E2, nota-se uma tendência, embora não significativa, deste hormônio atenuar os efeitos tóxicos induzidos pela exposição prolongada a H₂O₂ (Figura 13).

Figura 13. Atividade da enzima LDH no meio de incubação das células C6 tratadas com E2 e H₂O₂. As culturas de células C6 (2×10^2 células/poço) foram expostas por 24h à PBS (controle) e ao H₂O₂ (75 µM) e por 5, 15 e 30 minutos ao E2 (100 nM) ou tratamento concomitante entre H₂O₂ (75 µM) e E2 por 5, 15 e 30 minutos ao E2 (100 nM). A atividade da enzima LDH foi determinada pelo kit de citotoxicidade CytoTox 96 (Promega) pela leitura na absorbância em 490nm. Os dados representam as médias $\pm$ EPM. (n= 12, provenientes de 3

lotes de culturas independentes) #P<0,05; ##P<0,01 e ###P<0,001 vc C6 tratado com PBS; U.A.= Unidades Arbitrárias.

Figura 14. Atividade da enzima LDH no meio de incubação das células C6 tratadas com E2 e H₂O₂. As culturas de células C6 (2×10^2 células/poço) foram expostas por 24h à PBS (controle) e ao H₂O₂ (75 µM) e por 5, 15 e 30 minutos ao E2 (10 nM) ou tratamento concomitante entre H₂O₂ (75 µM) e E2 por 5, 15 e 30 minutos ao E2 (10 nM). A atividade da enzima LDH foi determinada pelo kit de citotoxicidade CytoTox 96 (Promega) pela leitura na absorbância em 490nm. Os dados representam as médias $\pm$ EPM (n= 12, provenientes de 3 lotes de culturas independentes) ###P<0,001 vc C6 tratado com PBS; ***P<0,001 vs C6 tratado com H₂O₂ 75 µM por 24h; U.A.= Unidades Arbitrárias.

Como o E2 se liga tanto aos receptores clássicos e não clássicos, realizamos o pré-tratamento com G1 nas concentrações de 0,1, 1 e 10nM (20min), para verificar a participação do receptor GPER-1 nos efeitos rápidos observados com o E2. Nossos resultados mostraram que na ausência de H₂O₂, o G1 foi capaz de diminuir a viabilidade das células C6 (Figura 15), como observado na figura 14. Já na presença do insulto, o pré-tratamento com G1 nas concentrações de 0,1 e 1nM (20min) foi capaz de atenuar a morte celular induzida por H₂O₂ (75µM, 24hrs), enquanto a maior dose de G1, 10nM, não teve efeito protetor (Figura 15).

Figura 15. Atividade da enzima LDH no meio de incubação das células C6 tratadas com G1 e H₂O₂. As culturas de células C6 (2×10^2 células/poço) foram expostas por 24h à PBS (controle) e ao H₂O₂ (75 µM) e com G1 (0,1, 1 e 10 nM) por 20 minutos ou pré-tratamento com G1 (0,1, 1 e 10 nM, 20 minutos) seguido de tratamento com H₂O₂ (75 µM, 24h). A atividade da enzima LDH foi determinada pelo kit de citotoxicidade CytoTox 96 (Promega) pela leitura na absorbância em 490nm. Os dados representam as médias $\pm$ EPM (n= 12, provenientes de 3 lotes de culturas independentes) ###P<0,001 vc C6 tratado com PBS; ***P<0,001 vs C6 tratado com H₂O₂ 75 µM por 24hrs; U.A.= Unidades Arbitrárias.

4.6 Efeitos do pré-tratamento com SERMS (Tam e Ful) nos efeitos tóxicos induzidos por H₂O₂ nas células C6.

Para avaliarmos especificamente o papel do receptor ESR1 modulando o efeito protetor do E2 através da análise de viabilidade celular pelo ensaio de LDH utilizamos tamoxifeno (Tam) e fulvestranto (Ful) que são SERMs, que podem agir como agonistas ou antagonistas dependendo do fenótipo celular (Ciriza et al., 2004). Para determinarmos a concentração ideal à ser utilizada e qual papel seria desempenhado por cada um deles buscamos na literatura qual seriam as concentrações que poderíamos utilizar. Para o Ful idealizamos as concentrações de 10, 1 e 0,1µM (Wang et al., 2008; Lee et al., 2003; Bouker et al., 2004) e 100, 10 e 1µM para o Tam (Nehra et al., 2010; Moodbidri et al., 2005; Gruber et al., 1999).

Nosso próximo passo foi realizar uma curva concentração-resposta, para avaliarmos qual concentração dentre as selecionadas seria escolhida. Uma vez feito

o tratamento com Ful nas concentrações de 10, 1 e 0,1 μM , somente com a de 10 μM notamos que a exposição ao Ful isoladamente não apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle e o grupo E2, bem como o tratamento conjunto de Ful 10 μM + E2 10nM continuou não demonstrando diferença estatística em relação aos mesmos grupos. Os dados, portanto, demonstram claramente uma ação de antagonismo farmacológico (Figura 16). Em relação ao tratamento com Tam nas concentrações de 100, 10 e 1 μM , observamos que este composto só não apresenta ação tóxica, uma vez que não apresenta diferença estatística em relação ao grupo controle, na concentração de 1 μM (grupo Tam 1 μM) e no tratamento conjunto com H_2O_2 (grupo Tam 1 μM + H_2O_2 75 μM), além disso, é bem perceptível a ação do Tam como agonista se pensarmos que o tratamento conjunto de Tam 1 μM com H_2O_2 leva a uma viabilidade celular maior em relação ao tratamento com o grupo H_2O_2 isoladamente (Figura 17).

Vale ressaltar que temos também diferença estatística entre o grupo H_2O_2 75 μM vs os grupos Tam 10 e 1 μM , (Figura 18) . Desta maneira demonstramos pela figura 17 que o Tam na concentração de 1 μM e Ful com 10 μM efetivamente exercem seus papéis de agonista e antagonista, respectivamente, vale ressaltar que o tratamento conjunto de E2 10nM+ H_2O_2 75 μM + Ful 10 μM demonstra diferença estatística significativa em relação aos grupos controle, E2 e H_2O_2 isolados.

Figura 16. Atividade da enzima LDH no meio de incubação das células C6 tratadas com E2 e Ful. As células C6 (2×10^2 células/poço) foram expostas por 24h à PBS (controle) e ao E2 (10 nM) e ao Ful (10, 1 e 0,1 nM) ou tratamento concomitante entre E2 (10 nM) e ao Ful (10, 1 e 0,1 μM). A atividade da enzima LDH foi determinada pelo kit de citotoxicidade CytoTox 96 (Promega) pela leitura na absorvância em 490nm. Os dados representam as médias $\pm$ EPM (n= 5, provenientes de 3 lotes de culturas independentes) *P<0,05 vs C6

tratado com PBS; $%%P < 0,01$ e $%%P < 0,001$ vs C6 tratado com E2 10nM por 24hrs; U.A.= Unidades Arbitrárias.

Figura 17. Atividade da enzima LDH no meio de incubação das células C6 tratadas com H₂O₂ e Tam. As células C6 (2×10^2 células/poço) foram expostas por 24h à PBS (controle) e ao H₂O₂ (75 µM) e ao Tam (100, 10 e 1 nM) ou tratamento concomitante entre H₂O₂ (75 µM) e Tam (100, 10 e 1 nM). A atividade da enzima LDH foi determinada pelo kit de citotoxicidade CytoTox 96 (Promega). Os dados representam as médias $\pm$ EPM ($n = 5$, provenientes de 3 lotes de culturas independentes) * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ vs C6 tratado com PBS; ### $P < 0,001$ vs C6 tratado com H₂O₂ 75µM por 24hrs; U.A.= Unidades Arbitrárias.

Figura 18. Atividade da enzima LDH no meio de incubação das células C6 tratadas com H₂O₂, E2, Tam. e Ful. As células C6 (2×10^2 células/poço) foram expostas por 24h à PBS (controle), ao H₂O₂ (75 µM), ao E2 (10 nM), ao Tam (1 µM) e ao Ful (10 µM) ou tratamento concomitante entre H₂O₂ (75 µM) e E2 (10 nM), ou Tam (1 µM), ou Ful + E2 (10 µM e 10nM), ou ainda tratamento

concomitante de E2 (10 nM) com Ful (10 μ M). A atividade da enzima LDH foi determinada pelo kit de citotoxicidade CytoTox 96 (Promega). Os dados representam as médias $\pm$ EPM (n= 6, provenientes de 3 lotes de culturas independentes) *P<0,05 e ***P<0,001 vs C6 tratado com PBS; ###P<0,001 vs C6 tratado com H₂O₂ 75 μ M por 24hrs ; %%P<0,01 e %%%P<0,001 vs C6 tratado com E2 10nM por 24hrs; U.A.= Unidades Arbitrárias.

Efeitos do pré-tratamento com estrógeno, SERMS e G1 na ativação da via AKT-CREB-BDNF após insulto com H₂O₂

4.7 Efeitos do pré-tratamento com E2, Tam, Ful ou G1 na ativação da proteína quinase AKT após exposição prolongada a H₂O₂ nas células C6

Como observado na figura abaixo, o tratamento com H₂O₂ foi capaz de ativar a proteína quinase AKT nas células C6. O mesmo aconteceu quando as células foram expostas ao E2, na ausência do estímulo tóxico induzido pela H₂O₂, quando comparadas ao grupo controle, tratado com PBS. Já o pré-tratamento das C6 com Tam, Ful e G1 não teve efeito na ativação da quinase AKT, na ausência de H₂O₂. Porém, enquanto o E2 não teve efeito, os pré-tratamentos com Tam, Ful e G1 foram capazes de reverter o aumento induzido pela H₂O₂ na ativação da AKT, medida pela fosforilação dessa quinase (Figura 19).

Figura 19. Efeitos do pré-tratamento com E2, Tam, Ful ou G1 na ativação da proteína quinase AKT na ausência ou na presença da toxicidade induzida por H₂O₂ (75μM) em células C6. A) Imagem representativa das autoradiografias provenientes do ensaio de western blot realizado em proteínas (5 μg) extraídas das células C6. B) Análise densitométrica (unidades arbitrárias) da razão fosfo-AKT/AKT representadas em A. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M. de 4 experimentos individuais. #P<0,05 e ##P<0,01 vs C6 tratado com H₂O₂ 75μM por 24hrs; %P<0,05 vs C6 tratado com E2 10nM por 24hrs; U.A.= Unidades Arbitrárias. β-actina foi utilizada como controle interno do ensaio.

4.8 Efeitos do pré-tratamento com E2, Tam, Ful ou G1 na fosforilação do fator de transcrição CREB após exposição prolongada a H₂O₂ nas células C6

Para avaliarmos a atividade da via em estudo, nosso próximo passo foi de observarmos a ativação do fator de transcrição CREB, p-CREB (43 kDa), uma vez que para se ligar ao DNA e exercer sua função na modulação de genes, esse fator precisa estar na forma fosforilada. Como observado na Figura 20, mesmo que autoradiografia para o p-CREB (Figura 20A), sugira um aumento na fosforilação deste fator induzida por H₂O₂ e E2, e uma diminuição deste parâmetro nos grupos pré-tratados com Tam, Ful e G1, esses efeitos não foram confirmados pela análise densitométrica das bandas (Figura 20B).

Figura 20. Efeitos do pré-tratamento com E2, Tam, Ful ou G1 na fosforilação do fator de transcrição CREB na ausência ou na presença da toxicidade induzida por H₂O₂ (75μM) em células C6. A) Imagem representativa das autoradiografias provenientes do ensaio de western blot realizado em proteínas (10 μg) extraídas das células C6. B) Análise densitométrica (unidades arbitrárias) da razão fosfo-CREB/β-actina representadas em A. Os resultados estão expressos como média

± E.P.M. de 4 experimentos individuais. U.A.= Unidades Arbitrárias. β -actina foi utilizada como controle interno do ensaio.

4.9 Efeitos do pré-tratamento com E2, Tam, Ful ou G1 nos níveis de RNAm de BDNF após exposição prolongada a H_2O_2 nas células C6

O BDNF é um fator trófico liberado no SNC que tem muitas funções, entre elas a de modular o crescimento e melhorar a viabilidade de células frente a estímulos lesivos. Desta maneira, nossa próxima pergunta foi saber como estaria a expressão desse gene, frente aos tratamentos propostos. Para tanto realizamos o ensaio de RT-PCR. Podemos observar na figura abaixo, que há uma diferença nos níveis de RNAm deste gene quando estimulado pelos diferentes tratamentos. GAPDH foi utilizado com controle interno (Figura 21A). Pela análise densitométrica das bandas específicas (Figura 21B) observamos que, em relação ao grupo controle, tivemos significativamente aumento da concentração de RNAm para os grupos H_2O_2 75 μ M + E2 10nM, G1 100nM e G1 100nM + H_2O_2 75 μ M. Em outra perspectiva podemos notar que alguns grupos apresentam diminuição na expressão do RNAm desse gene em relação ao grupo controle como o H_2O_2 75 μ M, Tam 1 μ M, Tam 1 μ M + H_2O_2 75 μ M, Ful 10 μ M e Ful 10 μ M + H_2O_2 75 μ M + E2 10nM.

Em relação ao grupo H_2O_2 , enquanto os grupos Tam 1 μ M e Ful 10 μ M + H_2O_2 75 μ M + E2 10nM apresentaram menor nível de RNAm para BDNF, todos os outros apresentaram significativamente aumento na expressão do gene.

Os grupos G1 100nM e G1 100nM + H_2O_2 75 μ M em comparação com o grupo E2 10nM foram os únicos que apresentaram aumento da expressão do gene, por outro lado, tirando o grupo controle e o grupo H_2O_2 75 μ M + E2 10nM que não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo E2, todos os remanescentes tiveram menor expressão do RNAm para BDNF.

Figura 21. Efeitos do pré-tratamento com E2, tamoxifeno, fulvestranto ou G1 na modulação dos níveis de RNAm na ausência ou na presença da toxicidade induzida por H₂O₂ (75µM) em células C6. A) Imagem representativa das fotografias provenientes do ensaio de RT-PCR realizado em cDNA extraídas das células C6. B) Análise densitométrica (unidades arbitrárias) da razão BDNF/GAPDH representadas em A. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M. de 4 experimentos individuais. *P<0,05 e ***P<0,001 vs C6 tratado com PBS; #P<0,05, ##P<0,01 e ###P<0,001 vs C6 tratado com H₂O₂ 75µM por 24hrs; %P<0,05, %%P<0,01 e %%%P<0,001 vs C6 tratado com E2 10nM por 24hrs; U.A.= Unidades Arbitrárias. GAPDH foi utilizada como controle interno do ensaio.

4.10 Concentração de Anexina frente aos tratamentos

No intuito analisarmos se a diminuição da viabilidade celular era devido a um aumento da apoptose nas células C6, verificamos a expressão da proteína anexina (Figura 22A), como nos passos anteriores. Pela análise densitométrica das bandas (Figura 22B), observamos que o tratamento com H₂O₂ aumentou a

expressão desta proteína, aumento revertido pelo pré-tratamento com E2, Tam, Ful e G1.

Figura 22. Efeitos do pré-tratamento com E2, tamoxifeno, fulvestranto ou G1 na expressão de Anexina, na ausência ou na presença da toxicidade induzida por H₂O₂ (75μM) em células C6. A) Imagem representativa das autoradiografias provenientes do ensaio de western blot realizado em proteínas (5 μg) extraídas das células C6. B) Análise densitométrica (unidades arbitrárias) da razão Anexina/β-actina representadas em A. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M. de 4 experimentos individuais. *P<0,05 vs C6 tratado com PBS; U.A.= Unidades Arbitrárias. β-actina foi utilizada como controle interno do ensaio.

5 DISCUSSÃO

Embora exista um grande interesse na avaliação dos efeitos neuroprotetores do E2, pouco se sabe sobre os eventuais efeitos e contribuições que esse hormônio possa ter em células não neuronais do SNC, como exemplo, alguns tipos de células da glia (astrócitos e microglia). Sendo as células C6 modelos experimentais bem utilizados para o estudo do efeito de agentes protetores e tóxicos em relação às células da glia, e na avaliação de vias de sinalização dos mediadores da inflamação no SNC, torna-se interessante estudar os efeitos protetores do E2 nessas células, bem como os mecanismos de ação pelos quais esses efeitos ocorrem. A compreensão da sinalização associada aos efeitos protetores do E2 contribuirá para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas utilizadas para diminuir ou atenuar o aparecimento de doenças neurodegenerativas como Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson e esclerose lateral amiotrófica e/ou para amenizar os sintomas das mesmas, presentes em maior incidência no envelhecimento.

Neste trabalho, procuramos inicialmente caracterizar a presença dos receptores ESR1, ESR2 e GPER-1 nas células C6. Nossos resultados revelaram a presença de RNAm para ESR1 e GPER-1, e a ausência de RNAm para ESR2 nas células C6, corroborando dados obtidos em outros estudos (Mhyre et al., 2006).

Pelos resultados nos ensaios de imunofluorescência e Western Blot, caracterizamos a presença já relatada pela literatura dos receptores clássicos de E2, ESR1 e ESR2, que costumam estar ligados a proteínas de choque térmico e assim permanecem inativados. A presença do agonista gera o desligamento do receptor associado a esta proteína de choque térmico, que é ubiquitinada, levando a formação de um complexo receptor de E2 + agonista. Este complexo sofre dimerização e migra para o núcleo expondo os sítios de ligação ao DNA (AF-1 e/ou AF-2) presentes no receptor. Um dos mecanismos de ação mais conhecidos pelo qual os ERs exercem seus efeitos está ligado à sua ação genômica direta, ou seja ao serem ativados, os complexos E2-ER ligam-se a uma região promotora do DNA chamada ERE, agindo como fatores de transcrição de vários genes alvos (Metivier et al., 2003; Gruber et al., 2004).

Atualmente é bem discutida a localização dos receptores de E2 que inicialmente acreditava-se ser predominante no núcleo e não no citoplasma. Nas células C6, todavia, observamos uma maior densidade desses receptores no

citoplasma dessas células e não no núcleo. Na presença do ligante (E2), os receptores citoplasmáticos migraram para o núcleo, sugerindo uma funcionalidade do receptor quando ativado pelo ligante. Diante disso, e por se tratar de uma linhagem de célula tumoral, resolvemos avaliar outro tipo celular, também tumoral, as células MCF-7, linhagem isolada de tumor de mama humano e que sabidamente expressam os receptores ESR1. Nossos resultados mostraram-se semelhantes tanto para as células C6 quanto para as células MCF-7, demonstrando que ambas linhagens frente aos tratamentos com PBS, apresentam maior concentração de ESR1 no citoplasma, em relação ao núcleo, e E2 1 μ M, com maior concentração no núcleo em relação ao citoplasma, confirmando desta maneira nossa metodologia e os resultados encontrados. Além disso, vale ressaltar, que a presença dos ERs em locais extranucleares já foi descrita. Estudos de análise ultraestrutural demonstraram imunorreatividade positiva para os receptores ESR1 e ESR2 presentes em processos que ocorrem em posições citoplasmáticas nos espinhos dendríticos, axônios, sinapses e células da glia (Milner et al., 2001, 2005; Hart et al., 2007). Ainda, é citado na literatura a identificação de ER na membrana plasmática de neurônios e células da glia (Arvanitis et al., 2004; Pawlak et al., 2005; Gorosito et al., 2008; Marin et al., 2008; Micevych e Mermelstein, 2008; Hirahara et al., 2009; Kelly e Ronnekleiv, 2009)

A ausência de imunoreatividade para o GPER-1 nas células C6, apesar das mesmas apresentarem o RNAm para este receptor, pode ser devido à falta de especificidade dos anticorpos testado, uma vez que outros estudos mostram a presença do GPER-1 em células de glia, tais como a microglia e astrócitos, respectivamente (Blasko et al., 2009; Kuo et al., 2010). Neste sentido, Brailoiu et al. (2007) postula que não existe ainda disponível comercialmente um anticorpo específico o suficiente para marcar o GPER-1.

Curiosamente, nossos resultados de imunofluorescência demonstraram imunorreatividade para a proteína ESR2, o que contradiz os resultados observados no ensaio de RT-PCR (dados não apresentados). Essa discrepância pode ser devido à alta concentração do anticorpo para ESR2 utilizada (1:100), o que pode ter diminuído a especificidade do anticorpo à proteína ESR2, uma vez que a homologia entre ESR1 e ESR2 é alta, considerando que ambos os receptores possuem domínios funcionais distintos, A/B, C, D e E/F. O domínio A/B é o que possui menor homologia (cerca de 20%) entre ESR1 e ESR2 (Tora et al., 1989) que é

independente de ligante e cuja atividade é específica para cada promotor e célula (Nilsson et al., 2001). A região E/F é a que possui maior homologia (55%) entre os receptores (Tora et al., 1989).

Após a padronização dos ERs nosso próximo passo foi de fazermos os mesmo com o H_2O_2 , que tem sua ação tóxica associada à sua capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio (ERO) que são potencialmente produzidas pelas mitocôndrias, através do metabolismo celular pelo complexo citocromo P450, peroxissomos e células que possuem sua atividade inflamatória ativada (Silva et al., 2009). Assim, escolhemos o peróxido de hidrogênio como estímulo tóxico e indutor de estresse oxidativo. O estresse oxidativo seria resultado de um aumento na geração de EROs que, além de diretamente ocasionarem danos a constituintes celulares, atuariam como intermediários de circuitos redox. A ativação destes circuitos patológicos levaria a um aumento na proliferação, migração, remodelamento da matriz celular e inflamação.

A concentração utilizada neste trabalho foi escolhida para gerar toxicidade, mas com possibilidade de atenuação do estímulo, mimetizando quadros que são caracterizados pela presença de superatividade mitocondrial e conseqüente elevada concentração de ROS, como nos casos de doenças neurodegenerativas (Knott et al., 2008)

Nossos resultados mostraram que a capacidade do E2 em atenuar a toxicidade induzida por H_2O_2 em nosso modelo experimental foi inversamente proporcional à densidade celular, ou seja, quanto maior o número de células, menor a capacidade do E2 em atenuar os efeitos tóxicos da H_2O_2 , chegando em algumas situações a potencializá-los. Acreditamos que uma explicação para esses resultados, que se mostraram diferentes dos encontrados na literatura (Sur et al., 2003), para tratamento concomitante de E2 e H_2O_2 que apresentam diminuição acentuada na viabilidade celular (ver Figuras 9 e 10), seria que o E2 por sua já conhecida capacidade de estimular a multiplicação celular, principalmente em casos de células tumorais (Cicatiello et al., 2010; Kumar et al., 2010), que é o caso das células C6 utilizadas em nossos estudos, estaria aumentando exponencialmente o número de células originalmente plaqueadas (2×10^3 células por poço). A ação tóxica do H_2O_2 por sua vez desencadearia a morte destas células, assim, um maior número de células mortas levaria a uma maior concentração de LDH no meio de

cultura. Dessa maneira, com um número menor de células e o efeito proliferativo do E2 não seria suficiente para mascarar seu efeito protetor.

Beyer et al. (2003) sugerem que a ativação da via não-clássica do E2 requer interações com receptores ou sítios de ligação presentes na membrana plasmática, assim caracterizando um efeito estrogênico por um mecanismo mais ágil e rápido. De fato, nossos dados mostram que cinco minutos de pré-tratamento com estrógeno (100 nM) tem uma tendência de aumentar a viabilidade celular frente à posterior incubação com H₂O₂, (Figura 13), sugerindo o efeito rápido de proteção que poderia ser proveniente da ação do GPER-1 ou do receptor ESR1 agora ligado à membrana celular como demonstrado por outros pesquisadores (Segars e Driggers, 2002; Lösel e Wehling, 2003; Guo et al., 2005; Manavathi e Kumar, 2006). Entretanto, embora exista esta tendência em, nossos resultados, estes não foram estatisticamente significativos, e mais ainda, em menor concentração (10 nM), o pré-tratamento agudo com E2 aumentou a toxicidade induzida pela H₂O₂ em cultura de células C6. Uma das possíveis explicações para isso pode estar associado às concentrações de E2 as utilizadas nesses experimentos. Embora um pouco acima da concentração fisiológica (0,01nM), as concentrações utilizadas podem não ser suficientes para revelar o efeito protetor do E2 através de sua sinalização rápida. Dessa maneira, o intervalo entre proteção e toxicidade induzida por E2 seria bastante tênue. Neste sentido, Sur et al. (2003), relataram o mesmo achado. Neste trabalho, os autores mostram que concentrações farmacológicas, na ordem de uM, e não fisiológicas, na ordem de nM, são necessárias para revelar o efeito protetor do E2 frente ao estímulo tóxico de H₂O₂ em células C6. Eles sugerem que este efeito pode não estar associado à ativação dos receptores estrogênicos, estando mais vinculado ao efeito anti-oxidante direto da molécula de E2, ou à modulação dos níveis de Ca²⁺ intracelular. Vale ressaltar que este trabalho é de 2003, quando o receptor GPER-1 ainda não era considerado um receptor estrogênico.

É de consenso que a sinalização rápida, não-clássica, do E2 é muito importante para a manifestação dos seus efeitos no encéfalo, uma vez que esses sinais modificam proteínas (através de fosforilação/desfosforilação) e suas funções, e podem, ainda, modular a expressão gênica independente dos receptores ESR clássicos, ou até mesmo amplificar seus efeitos (Lopez et al., 2001; Iwase, 2003; Zheng et al., 2005; Vasudevan e Pfaff, 2007). Existem diversos estudos controversos quanto a responsividade do receptor acoplado a proteína G para o E2

e sua localização (Langer et al., 2010). Vários estudos sugerem uma função para o GPER-1 na sinalização induzida por E2 através da membrana (Maggiolini et al., 2004; Thomas et al., 2005; Filardo et al., 2008), ao passo que, trabalhos *in vitro* não apóiam a hipótese de que o GPER-1 possa atuar diretamente como um receptor acoplado a proteína G para o E2 (Pedram et al., 2006; Madak-Erdogan et al., 2008; Otto et al., 2008). Desta forma, podemos observar que a função do GPER-1 nas ações do E2 no encéfalo ainda é pouco estudada (Lebesgue et al., 2010). Embora este estudo não tenha avaliado ainda a localização do GPER, nossos resultados utilizando G1 sugerem a participação desse receptor na atenuação dos efeitos tóxicos induzidos pela H_2O_2 em células C6. Esses resultados reforçam nossa hipótese discutida anteriormente, de que para revelar o efeito rápido do E2 em células C6 são necessárias doses mais elevadas.

Já está bem definido pela literatura que o E2 pode modular amplamente vias de sinalização, mas em especial duas vias que são classicamente influenciadas pela ação de compostos estrogênicos que são as vias da PI-3K (*phosphoinositide-3-kinase*) e da MAPK (*mitogen-activated protein kinases*). A via da MAPK está relacionada com a modulação de muitos eventos celulares fundamentais como proliferação celular, sobrevivência, diferenciação, apoptose, morbidade e metabolismo (Cheskis et al., 2008). A via da PI-3K age como uma retroalimentação negativa endógena ou um mecanismo compensatório que atua na limitação de eventos pró-inflamatórios e quimiotáticos em resposta a danos celulares (Fukao e Koyasu, 2003; Wilson et al., 2010). O modelo experimental utilizado está relacionado com a resposta das células C6 frente ao estímulo tóxico do H_2O_2 , que leva à injúria pela sua ação como espécie reativa de oxigênio e possivelmente geração de estímulos inflamatórios (Linden et al., 2008; Gulden et al., 2010). A linhagem utilizada é representada principalmente por células de microglia, responsáveis pelos estímulos inflamatórios iniciais de processos neurodegenerativos no SNC. Devido a menor abrangência de eventos constitutivos funcionais que poderiam influenciar a atividade da via de estudo, optamos pelo estudo da via PI-3K frente aos tratamentos que modulam a viabilidade das células C6 em nosso modelo de estudo.

A PI-3K é a enzima responsável pela fosforilação da Akt que é uma serina quinase que está implicada em uma grande variedade de modelos como um fator de sobrevivência. A literatura cita que a fosforilação da Akt é rapidamente ativada e

assim mantida 24 horas pós-tratamento (Dhandapani e Brann, 2007). Corroborando com nossos resultados, já foi demonstrado pela literatura que o H_2O_2 aumenta significativamente a expressão de p-Akt em células da glia (Mena et al., 2008). Acreditamos que tal efeito seja decorrente da tentativa das células C6 em ativar uma possível via de sobrevivência frente ao estímulo lesivo. O E2 é um hormônio capaz de modular diretamente a atividade da enzima PI-3K, uma vez que em concentrações fisiológicas é capaz de fosforilar a PI-3K (Dhandapani e Brann, 2007) rapidamente. Este efeito é crucial para o desempenho protetor do E2 frente a excitotoxicidade do glutamato, uma vez que a co-administração de um inibidor seletivo da PI-3K aboliu o efeito neuroprotetor estrogênico (Simoncini et al., 2000). Vale ressaltar que o efeito neuroprotetor do E2 e alguns SERMs modulando a ativação da Akt é devido ao aumento na expressão do fator anti-apoptótico Bcl-2 (Cardona-Gomez et al., 2001; Nilsen e Brinton, 2003; Wise et al., 2005; D'Astous et al., 2006).

Nossos resultados demonstram que Ful e G1, principalmente frente ao estímulo tóxico do H_2O_2 , diminuíram a expressão de p-Akt normalizada em relação ao E2. Acreditamos que tal efeito seja uma resposta particular de cada fármaco. Outro fator que temos que levar em consideração é que já foi citada na literatura a ação do Ful modulando as ações do GPER (Kleuser et al., 2008; Lucas et al., 2010)

Na sequência da cascata de sinalização da PI3K o passo seguinte a ser analisado foi o CREB (*cAMP response element-binding*). Ele é uma proteína celular que regula a transcrição de mais de 10.000 genes alvos (Euskirchen et al., 2004), incluindo aqueles envolvidos em quadros de estresse e sobrevivência, como o (*brain derived neurotrophic factor*) BDNF, CRF e dinorfina (Kim et al., 1993; Cole et al., 1995; Hyman et al., 1995; Itoi et al., 1996; Finkbeiner et al., 1997; Tao et al., 1998; Olson et al., 2005). Vale lembrar que o CREB é amplamente expresso no encéfalo e é um membro da família protéica de elementos capazes de modular fatores de transcrição em resposta aos níveis de AMPc (Shaywitz e Greenberg, 1999; Mayr e Montminy, 2001). De forma mais detalhada temos que a ativação de receptores acoplados à proteínas-G estimulatórias ativam a adenilil ciclase, que por sua vez leva ao acúmulo de AMPc no citosol. Este segundo mensageiro, por sua vez, ativa a proteína quinase A, que fosforila o CREB na serina 133 (Gonzalez e Montminy, 1989; Gonzalez et al., 1991).

Enquanto esta parece ser a via principal de regulação da fosforilação do CREB, a MAPK por sua vez ativa quinases ribossômicas S6 assim como a cálcio calmodulina quinase IV que também fosforilam o CREB na serina 133 (Xing et al., 1996; Lonze e Ginty, 2002). Embora a fosforilação do CREB na serina 133 leve a ativação e transcrição de uma variedade de produtos gênicos, o CREB pode também ser fosforilado na serina 142, levando a inibição da transcrição gênica (Matthews et al., 1994; Kornhauser et al., 2002). Assim, a mediação da transcrição gênica pelo CREB é um passo, dentro das vias de sinalização, que pode ser modulado por vários mecanismos intracelulares. Em relação a isso nossa questão foi, se o CREB pode ser fosforilado por tantos mecanismos, porque em nossos resultados não achamos diferença estatística em sua modulação?

Um dos fatores que nos levou ao questionamento foi que, os níveis de RNAm para o BDNF, uma proteína diretamente modulada por aquele fator de transcrição, apresentaram-se alterados em nosso modelo experimental. O BDNF é a neurotrofina com maior prevalência no encéfalo, estando envolvida em alguns processos celulares como a plasticidade sináptica dependente de atividade, na sobrevivência e diferenciação de neurônios e células da glia (Ernfors et al., 1994; Jones et al., 1994; Huang e Reichardt, 2001). Além disso, o aumento da concentração ou expressão do BDNF é esperado como consequência da ativação da via PI3K-AKT-CREB (Tao et al., 1998). Nossos resultados sugerem então que a modulação do RNAm para o BDNF, em nosso modelo, ocorre independente da ativação do CREB. De fato, o BDNF pode ser modulado por outros fatores, entre eles a via da MAPK, ou diretamente pelo próprio ESR1 agindo como fator de transcrição ao ligar-se ERE. Além disso, o próprio BDNF pode modular a fosforilação do CREB (Gooney et al., 2004; Pandey et al., 2006). Assim, é possível que as alterações nos níveis de BDNF, em nosso modelo, levaram a uma modulação negativa na fosforilação do CREB.

Vale lembrar que sabe-se pouco sobre a ação do GPER-1 em células do SNC, menor ainda é o conhecimento sobre sua ação em células de linhagem de glioma, como as C6. Desta forma, torna-se importante ressaltar a ação que o G1 exerce 24h após tratamento, modulando de forma expressiva o aumento do RNAm para o BDNF, nas células submetidas ao tratamento com G1 e no tratamento concomitante do H₂O₂ com G1. Teria então o G1 um papel não só de resposta rápida, mas também de indução tardia a uma resposta protetora, independente de estímulo tóxico em outras células e sistemas?

Já foi citado na literatura que o Fulvestranto pode exercer efeito de agonista no receptor GPER (Li et al., 2010; Meyer et al., 2010). Analisando nossos resultados de AKT e p-CREB podemos notar que há uma semelhança nas respostas encontradas entre os tratamentos que envolvem a participação do G1 e do Fulvestranto, supomos então que em nosso fenótipo celular, nestas concentrações (ful. 10 μ M e G1 100nM) e 24h após os tratamentos temos o Fulvestranto agindo de forma semelhante ao G1.

No sentido de confirmarmos nossos resultados de viabilidade realizamos a quantificação da anexina que é uma proteína presente em diversos eventos que modulam a sinalização de morte em células, como modulação de níveis intracelulares de cálcio, doenças cardiovasculares, doença de Alzheimer e isquemia cerebral (Alfonso et al., 2008; Duncan et al., 2008; Mussunoor et al., 2008). Por esta perspectiva, imaginamos que ela seria uma alternativa para confirmação dos resultados de viabilidade celular que encontramos pelos ensaios de LDH. Mas como pudemos observar pela análise da figura 31, somente tivemos diferença estatística entre o grupo H₂O₂ e controle. Imaginamos que tal falta de sensibilidade no ensaio esteja relacionada principalmente ao amplo espectro de atividades a qual a anexina está envolvida, principalmente pelo fato de sua expressão ser modulada em atividades como divisão celular, apoptose (Liemann e Huber, 1997; Rand, 2000; Gerke e Moss, 2002; Rescher e Gerke, 2004; Hayes e Moss, 2004) e alta marcação em células tumorais (Mussunoor et al., 2008; Alfonso et al., 2008; Duncan et al., 2008), eventos esses em grande atividade devido ao nosso modelo experimental e por tratar-se de células tumorais.

Podemos então afirmar que as células C6 apresentam receptores ESR1 e GPER, além disso, que o H₂O₂ na concentração de 75 μ M exerce efeito tóxico que leva a morte celular, mas com possibilidade reversão deste efeito pelo tratamento prolongado de 24h com E2 em 10nM e Tam 1 μ M. Podemos afirmar também que o Ful, na concentração de 10 μ M possui ação de antagonista. O G1 em tratamento conjunto com H₂O₂ apresenta ação protetora. Ainda, acreditamos que os efeitos de proteção encontrados são independentes da via AKT-CREB, mas que tal proteção pode ser desencadeada pela ação do BDNF, que seria modulado por vias alternativas a da AKT-CREB-BDNF.

Existe um grande interesse em conhecer a dinâmica entre o balanço e os sinais de morte e de neuroproteção. As evidências apontam para a existência de sobreposições entre os mecanismos de apoptose e necrose, desde que as mesmas vias são fundamentais para os dois processos. No entanto, a maior compreensão dos mecanismos associados à sinalização de proteção são fundamentais no sentido de garantir que certas substâncias possam ser utilizadas sem ativar sinalização oncogênica. Os resultados desse estudo abrem novas perspectivas no estudo da sinalização associada ao estrógeno que envolve receptores GPER-1. Esta nova abordagem pode levar a descoberta de compostos que ativem vias protetoras, sem inibir elementos de regulação que removam o controle natural da sinalização de sobrevivência celular. A compreensão destes processos parecem ser o grande desafio para a busca de uma terapia a base de estrógeno no tratamento das doenças neurodegenerativas.

6 CONCLUSÃO

Pudemos avaliar efeito protetor do 17β -estradiol em modelo de estresse por peróxido de hidrogênio em cultura de linhagem de células C6 de glioma de rato, vimos que tal efeito é dependente de uma relação específica entre o número de células plaqueadas e a concentração que estas são tratadas. Vimos ainda que o efeito tóxico gerado pelo H_2O_2 é independente de fragmentação de DNA.

Foi visto que nossas células apresentam receptores de E2 (ESR1 e GPER-1) e que eles estão envolvidos na proteção desencadeada por esse hormônio, uma vez que através do uso dos moduladores seletivos dos receptores de E2, tamoxifeno e fulvestranto; bem como do agonista G1 para o GPER, pudemos demonstrar que tal ação protetora pode ser desenvolvida na presença dos agonistas tamoxifeno e G1 frente ao insulto tóxico, e ainda que tal efeito pode ser bloqueado pela ação de antagonismo farmacológico do fulvestranto.

Verificamos que tal efeito protetor, bem como os tratamentos propostos modulam significativamente a expressão de RNAm para o BDNF, mas que tal ação é independente da modulação da via AKT-CREB-BDNF, que embora tenha alteração em alguns dos níveis protéicos de AKT não apresentam modulação do CREB.

REFERÊNCIAS*

- Ahmad S, Singh N and Glazer RI. Role of AKT1 in 17beta-estradiol- and insulin-like growth factor I (IGF-I)-dependent proliferation and prevention of apoptosis in MCF-7 breast carcinoma cells. *Biochemical Pharmacology*, 1999;58:425-30.
- Alfonso P, Canamero M, Fernandez-Carbonie F, et al. Proteome analysis of membrane fractions in colorectal carcinomas by using 2D-DIGE saturation labeling. *J Proteome Res* 2008;7:4247-55.
- Arevalo MA, Santos-Galindo M, Bellini MJ, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. Actions of estrogens on glial cells: Implications for neuroprotection. *Biochim Biophys Acta*. 2010;95:252-64
- Arnold S. Estrogen suppresses the impact of glucose deprivation on astrocytic calcium levels and signaling independently of the nuclear estrogen receptor. *Neurobiol Dis*. 2005;20:82-92.
- Aronica SM, Kraus WL and Katzenellenbogen BS. *Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994;91:8517-21.
- Arrigo AP. Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic Biol Med*. 1999; 27:936-44.
- Arvanitis DN, Wang H, Bagshaw RD, Callahan JW, Boggs JM. Membrane-associated estrogen receptor and caveolin-1 are present in central nervous system myelin and oligodendrocyte plasma membranes. *J Neurosci Res*. 2004;75:603-13.
- Augusto O. *Radicais livres bons, maus e naturais*. São Paulo: Oficina de Textos; 2006
- Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood*. 1999;93:1464-76.
- Barrett-Connor E. Sex differences in coronary heart disease. Why are women so superior? The 1995 Ancel Keys Lecture. *Circulation*. 1997;95:252-64.
- Beato M, Chalepakis G, Schauer M, Slater EP. DNA regulatory elements for steroid hormones. *J Steroid Biochem*. 1989;32:737-47.
- Beyer C, Pawlak J, Brito V, Karolczak M, Ivanova T, Kuppers E. Regulation of gene expression in the developing midbrain by estrogen: implication of classical and nonclassical steroid signaling. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;1007:17-28.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: Sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Behl C. Oestrogen as a neuroprotective hormone. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3:433-42.

Blasko E, Haskell CA, Leung S, Gualtieri G, Halks-Miller M, Mahmoudi M, Dennis MK, Prossnitz ER, Karpus WJ, Horuk R. Beneficial role of the GPR30 agonist G-1 in an animal model of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2009;214:67-77.

Blaustein JD. The year in neuroendocrinology. *Molecular Endocrinology*, 2010;24:252-60

Blondeau N, Widmann C, Lazdunski M, Heurteaux C. Activation of the nuclear factor-kappaB is a key event in brain tolerance. *J Neurosci.* 2001;21:4668-77.

Blurton-Jones M, Tuszynski MH. Reactive astrocytes express estrogen receptors in the injured primate brain. *J Comp Neurol.* 2001;433:115-23.

Bouker KB, Skaar TC, Fernandez DR, O'Brien KA, Riggins RB, Cao D, Clarke R. Interferon regulatory factor-1 mediates the proapoptotic but not cell cycle arrest effects of the steroidal antiestrogen ICI 182,780 (faslodex, fulvestrant). *Cancer Res.* 2004;64:4030-9.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.

Brailoiu E, Dun SL, Brailoiu GC, Mizuo K, Sklar LA, Oprea TI, Prossnitz ER, Dun NJ. Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. *J Endocrinol.* 2007;193:311-21.

Brinton RD. The healthy cell bias of estrogen action: mitochondrial bioenergetics and neurological implications. *Trends Neurosci.* 2008;31:529-37

Bryant DN, Sheldahl LC, Marriott LK, Shapiro RA, Dorsa DM. Multiple pathways transmit neuroprotective effects of gonadal steroids. *Endocrine.* 2006;29:199-207.

Carbonaro V, Caraci F, Giuffrida ML, Merlo S, Canonico PL, Drago F, Copani A, Sortino MA. Enhanced expression of ERalpha in astrocytes modifies the response of cortical neurons to beta-amyloid toxicity. *Neurobiol Dis.* 2009;33:415-21.

Cardona-Gómez GP, Mendez P, DonCarlos LL, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. Interactions of estrogens and insulin-like growth factor-I in the brain: implications for neuroprotection. *Brain Res Brain Res Rev.* 2001;37:320-34.

Cicatiello L, Mutarelli M, Grober OM, Paris O, Ferraro L, Ravo M, Tarallo R, Luo S, Schroth GP, Seifert M, Zinser C, Chiusano ML, Traini A, De Bortoli M, Weisz A. Estrogen Receptor {alpha} Controls a Gene Network in Luminal-Like Breast Cancer Cells Comprising Multiple Transcription Factors and MicroRNAs. *Am J Pathol.* 2010; [Epub ahead of print]. Available from: <http://ajp.amjpathol.org/cgi/content/full/176/5/2113>

Chaban VV, Lakhter AJ, Micevych P. A membrane estrogen receptor mediates intracellular calcium release in astrocytes. *Endocrinology*. 2004;145:3788-95.

Cheng Q, Cant CA, Moll T, Hofer-Warbinek R, Wagner E, Birnstiel ML, Bach FH, de Martin R. NK-kappa B subunit-specific regulation of the I kappa B alpha promoter. *J Biol Chem*. 1994;269:13551-7.

Cheskis BJ, Greger J, Cooch N, McNally C, Mclarney S, Lam HS, Rutledge S, Mekonnen B, Hauze D, Nagpal S, Freedman LP. MNAR plays an important role in ERa activation of Src/MAPK and PI3K/Akt signaling pathways. *Steroids*. 2008;73:901-5.

Clemens JA, Stephenson DT, Dixon EP, Smalstig EB, Mincy RE, Rash KS, Little SP. Global cerebral ischemia activates nuclear factor-kappa B prior to evidence of DNA fragmentation. *Brain Res Mol Brain Res*. 1997;48:187-96.

Cole RL, Konradi C, Douglass J, Hyman SE. Neuronal adaptation to amphetamine and dopamine: molecular mechanisms of prodynorphin gene regulation in rat striatum. *Neuron*. 1995;14:813-23.

Couse JF, Korach KS. Reproductive phenotypes in the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Ann Endocrinol*. 1999;60:143-8.

Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*. 1993;262:689-95.

Cyr M, Calon F, Morissette M, Grandbois M, Di Paolo T, Callier S. Drugs with estrogen-like potency and brain activity: potential therapeutic application for the CNS. *Curr Pharm Des*. 2000;6:1287-312.

D'Astous M, Mendez P, Morissette M, Garcia-Segura LM, Di Paolo T. Implication of the phosphatidylinositol-3 kinase/ protein kinase B signaling pathway in the neuroprotective effect of estradiol in the striatum of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mice. *Mol Pharmacol*. 2006;69:1492-8.

Deschamps AM, Murphy E. Activation of a novel estrogen receptor, gper, is cardioprotective in male and female rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;297:H1806-13

Dhandapani KM, Wade FM, Mahesh VB, Brann DW. Astrocyte-derived transforming growth factor- β mediates the neuroprotective effects of 17 β -estradiol: involvement of nonclassical genomic signaling pathways. *Endocrinology*. 2005;146:2749-59.

Dhandapani K, Brann D. Neuroprotective effects of estrogen and tamoxifen in vitro: a facilitative role for glia? *Endocrine*. 2003;21:59-66.

Dhandapani KM, Brann DW. Role of astrocytes in estrogen-mediated neuroprotection. *Exp Gerontol*. 2007;42:70-5.

Dominguez R, Liu R, Baudry M. 17-Beta-estradiol-mediated activation of extracellular-signal regulated kinase, phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B-Akt and N-methyl-D-aspartate receptor phosphorylation in cortical synaptoneurosomes. *J Neurochem*. 2007;101:232-40.

Domenico MD, Castoria G, Falco Ad, Bontempo P, Nola E and Auricchio F. *Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells*. The European Molecular Biology Organization Journal, 1996;15:1292-1300

DonCarlos LL, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. Neuroprotective actions of selective estrogen receptor modulators. *Psychoneuroendocrinology*. 2009;34:S113-22.

Driggers PH, Segars JH. Estrogen action and cytoplasmic signaling pathways. Part II: the role of growth factors and phosphorylation in estrogen signaling. *Trends Endocrinol Metab*. 2002;13:422-7.

Duncan R, Carpenter B, Main LC, et al. Characterisation and protein expression profiling of annexins in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2008;98:426-33

Ernfors P, Lee KF, Jaenisch R. Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature*. 1994;368:147-50.

Euskirchen G, Royce TE, Bertone P, Martone R, Rinn JL, Nelson FK, Sayward F, Luscombe NM, Miller P, Gerstein M, Weissman S, Snyder M. CREB binds to multiple loci on human chromosome 22. *Mol Cell Biol*. 2004;24:3804-14.

Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*. 1988;240:889-95.

Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR Jr. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol*. 2000;14:1649-60.

Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR Jr, Bland KI. 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. *Mol Endocrinol*. 2002;16:70-84.

Filardo EJ, Thomas P. GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. *Trends Endocrinol Metab*. 2005;16:362-7.

Filardo EJ. Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen via the G-protein-coupled receptor, GPR30: a novel signaling pathway with potential significance for breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2002;80:231-8.

Filardo EJ, Quinn JA, Sabo E. Association of the membrane estrogen receptor, GPR30, with breast tumor metastasis and transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Steroids*. 2008;73:870-3.

Finkbeiner S, Tavazoie SF, Maloratsky A, Jacobs KM, Harris KM, Greenberg ME. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron*. 1997;19:1031-47.

Fukao T, Koyasu S. PI3K and negative regulation of TLR signaling. *Trends Immunol* 2003;24:358–63.

Garcia-Ovejero D, Azcoitia I, Doncarlos LL, Melcangi RC, Garcia-Segura LM. Glia-neuron crosstalk in the neuroprotective mechanisms of sex steroid hormones. *Brain Res Brain Res Rev*. 2005;48:273-86.

García-Ovejero D, Veiga S, García-Segura LM, Doncarlos LL. Glial expression of estrogen and androgen receptors after rat brain injury. *J Comp Neurol*. 2002;450:256-71.

Garcia-Segura LM, Azcoitia L, Doncarlos LL. neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol*. 2001;63:29-60.

Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* 2002;82:331-71

Glezer I, Munhoz CD, Kawamoto EM, Marcourakis T, Avellar MC, Scavone C. MK-801 and 7-Ni attenuate the activation of brain NF-kappa B induced by LPS. *Neuropharmacology*. 2003;45:1120-9.

González Deniselle MC, González SL, De Nicola AF. Cellular basis of steroid neuroprotection in the wobbler mouse, a genetic model of motoneuron disease. *Cell Mol Neurobiol*. 2001;21:237-54.

Gonzalez GA, Montminy MR. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell*. 1989;59:675-80.

Gonzalez GA, Menzel P, Leonard J, Fischer WH, Montminy MR. Characterization of motifs which are critical for activity of the cyclic AMP-responsive transcription factor CREB. *Mol Cell Biol*. 1991;11:1306-12.

Gooney M, Messaoudi E, Maher FO, Bramham CR, Lynch MA. BDNF-induced LTP in dentate gyrus is impaired with age: analysis of changes in cell signaling events. *Neurobiol Aging*. 2004;25:1323-31.

Gorosito SV, Lorenzo AG, Cambiasso MJ. Estrogen receptor alpha is expressed on the cell-surface of embryonic hypothalamic neurons. *Neuroscience*. 2008;154:1173-7.

Grilli M, Pizzi M, Memo M, Spano P. Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF-kappaB activation. *Science*. 1996;274:1383-5.

Gruber AD, Schreur KD, Ji HL, Fuller CM, Pauli BU. Molecular cloning and transmembrane structure of hCLCA2 from human lung, trachea, and mammary gland. *Am J Physiol*. 1999;276:C1261-70.

Gruber CJ, Gruber DM, Gruber IM, Wieser F, Huber JC. Anatomy of the estrogen response element. *Trends Endocrinol Metab*. 2004;15:73-8.

Gülden M, Jess A, Kammann J, Maser E, Seibert H. Cytotoxic potency of H₂O₂ in cell cultures: impact of cell concentration and exposure time. *Free Radic Biol Med*. 2010;49:1298-305.

Guo X, Razandi M, Pedram A, Kassab G, Levin ER. Estrogen induces vascular wall dilation: mediation through kinase signaling to nitric oxide and estrogen receptors alpha and beta. *J Biol Chem*. 2005;280:19704-10.

Gustafsson JA. What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signalling. *Trends Pharmacol Sci*. 2003;24:479-85.

Hayes MJ, Moss SE. Annexins and disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;322:1166-70.

Harris HA. Preclinical characterization of selective estrogen receptor beta agonists: new insights into their therapeutic potential. *Ernst Schering Found Symp Proc*. 2006;1:149-61.

Hart SA, Snyder MA, Smejkalova T, Woolley CS. Estrogen mobilizes a subset of estrogen receptor-alpha-immunoreactive vesicles in inhibitory presynaptic boutons in hippocampal CA1. *J Neurosci*. 2007;27:2102-11.

Hewitt SC, Harrell JC, Korach KS. Lessons in estrogen biology from knockout and transgenic animals. *Annu Rev Physiol*. 2005;67:285-308.

Hirahara Y, Matsuda K, Gao W, Arvanitis DN, Kawata M, Boggs JM. The localization and non-genomic function of the membrane-associated estrogen receptor in oligodendrocytes. *Glia*. 2009;57(2):153-65.

Honda K, Shimohama S, Sawada H, Kihara T, Nakamizo T, Shibasaki H, Akaike A. Nongenomic antiapoptotic signal transduction by estrogen in cultured cortical neurons. *J Neurosci Res*. 2001;64:466-75.

Hsieh YC, Yu HP, Suzuk, T, Choudhry MA, Schwacha MG, Bland KI, Chaudry IH. Upregulation of mitochondrial respiratory complex IV by estrogen receptor-beta is critical for inhibiting mitochondrial apoptotic signaling and restoring cardiac functions following trauma-hemorrhage. *J Mol Cell.* 2006;41:511-21.

Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:677-736.

Hyman SE, Cole RL, Konradi C, Kosofsky BE. Dopamine regulation of transcription factor-target interactions in rat striatum. *Chem Senses.* 1995;25:7-60.

Imai A, Iida K and Tamaya T. *Phospholipase C in human endometrial fibroblasts and its regulation by estrogens.* *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry,* 1990;97:617-21

Ishunina TA, Swaab DF. Increased expression of estrogen receptor alpha and beta in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2001;22:417-26.

Ishunina TA, Swaab DF. Increased neuronal metabolic activity and estrogen receptors in the vertical limb of the diagonal band of Broca in Alzheimer's disease: relation to sex and aging. *Exp Neurol.* 2003;183:159-72.

Itoi K, Horiba N, Tozawa F, Sakai Y, Sakai K, Abe K, Demura H, Suda T. Major role of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase A pathway in corticotropin-releasing factor gene expression in the rat hypothalamus in vivo. *Endocrinology.* 1996;137:2389-96.

Ivanova T, Mendez P, Garcia-Segura LM, Beyer C. Rapid stimulation of the PI3-kinase/Akt signalling pathway in developing midbrain neurones by oestrogen. *J Neuroendocrinol.* 2002;14:73-9.

Iwase H, Zhang Z, Omoto Y, Sugiura H, Yamashita H, Toyama T, Iwata H, Kobayashi S. Clinical significance of the expression of estrogen receptors alpha and beta for endocrine therapy of breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2003;1:S34-8.

Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2006; 8:1865-79.

Jones KR, Fariñas I, Backus C, Reichardt LF. Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development. *Cell.* 1994;76:989-99.

Kajta M, Trotter A, Lasoń W, Beyer C. Impact of 17beta-estradiol on cytokine-mediated apoptotic effects in primary hippocampal and neocortical cell cultures. *Brain Res.* 2006;1116:64-74.

Kamata H, Hirata H. Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal*. 1999;11:1-14.

Karakaya S, Kipp M, Beyer C. Oestrogen regulates the expression and function of dopamine transporters in astrocytes of the nigrostriatal system. *J Neuroendocrinol*. 2007;19:682-90.

Kawamoto EM, Lepsch LB, Boaventura MF, Munhoz CD, Lima LS, Yshii LM, Avellar MC, Curi R, Mattson MP, Scavone C. Amyloid beta-peptide activates nuclear factor-kappaB through an N-methyl-D-aspartate signaling pathway in cultured cerebellar cells. *J Neurosci Res*. 2008;86:845-60.

Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*. 2000;149:43-50.

Kelly MJ, Rønnekleiv OK. Control of CNS neuronal excitability by estrogens via membrane-initiated signaling. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;308:17-25.

Kieran NE, Rabb H. Immune responses in kidney preservation and reperfusion injury. *J Invest Med*. 2004;52:310-4.

Kim MK, McClaskey JH, Bodenner DL, Weintraub BD. An AP-1-like factor and the pituitary-specific factor Pit-1 are both necessary to mediate hormonal induction of human thyrotropin beta gene expression. *J Biol Chem*. 1993;268:23366-75.

Kipp M, Karakaya S, Johann S, Kampmann E, Mey J, Beyer C. Oestrogen and progesterone reduce lipopolysaccharide-induced expression of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-18 in midbrain astrocytes. *J Neuroendocrinol*. 2007;19:819-22.

Kipp M, Karakaya S, Pawlak J, Araujo-Wright G, Arnold S, Beyer C. Estrogen and the development and protection of nigrostriatal dopaminergic neurons: concerted action of a multitude of signals, protective molecules, and growth factors. *Front Neuroendocrinol*. 2006;27:376-90.

Kleuser B, Malek D, Gust R, Pertz HH, Potteck H. 17-Beta-estradiol inhibits transforming growth factor-beta signaling and function in breast cancer cells via activation of extracellular signal-regulated kinase through the G protein-coupled receptor 30. *Mol Pharmacol*. 2008;74:1533-43.

Klinge CM, Blankenship KA, Risinger KE, Bhatnagar S, Noisin EL, Sumanasekera WK, Zhao L, Brey DM, Keynton RS. Resveratrol and estradiol rapidly activate MAPK signaling through estrogen receptors alpha and beta in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2005;280:7460-8.

Knott AB, Perkins G, Schwarzenbacher R, Bossy-Wetzel E. Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*. 2008;9:505-18.

Kornhauser JM, Cowan CW, Shaywitz AJ, Dolmetsch RE, Griffith EC, Hu LS, Haddad C, Xia Z, Greenberg ME. CREB transcriptional activity in neurons is regulated by multiple, calcium-specific phosphorylation events. *Neuron*. 2002;34:221-33.

Kumar A, Klinge CM, Goldstein RE. Estradiol-induced proliferation of papillary and follicular thyroid cancer cells is mediated by estrogen receptors alpha and beta. *Int J Oncol*. 2010;280:7460-8

Kuo J, Hariri OR, Bondar G, Ogi J, Micevych P. Membrane estrogen receptor-alpha interacts with metabotropic glutamate receptor type 1a to mobilize intracellular calcium in hypothalamic astrocytes. *Endocrinology*. 2009;150:1369-76.

Kuo DY, Blank SV, Christos PJ, Kim M, Caputo TA, Pothuri B, Hershman D, Goldman N, Ivy PS, Runowicz CD, Muggia F, Goldberg GL, Einstein MH. Paclitaxel plus oxaliplatin for recurrent or metastatic cervical cancer: a New York Cancer Consortium Study. *Gynecol Oncol*. 2010;116:442-6.

Küppers E, Ivanova T, Karolczak M, Lazarov N, Föhr K, Beyer C. Classical and nonclassical estrogen action in the developing midbrain. *Horm Behav*. 2001;40:196-202.

Laemmli UK, Mölbert E, Showe M, Kellenberger E. Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage t4. *J mol biol*. 1970;280:7460-8

Le Bras M, Clement MV, Pervaiz S, Brenner C. Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histol Histopathol*. 2005;20:205-219.

Lebesgue D, Traub M, De Butte-Smith M, Chen C, Zukin RS, Kelly MJ, Etgen AM. Acute administration of non-classical estrogen receptor agonists attenuates ischemia-induced hippocampal neuron loss in middle-aged female rats. *PLoS One*. 2010;5:e8642.

Lee SY, Andoh T, Murphy DL, Chiueh CC. 17beta-estradiol activates ICI 182,780-sensitive estrogen receptors and cyclic GMP-dependent thioredoxin expression for neuroprotection. *FASEB J*. 2003;17:947-8.

Lee YW, Hennig B, Fiala M, Kim KS, Toborek M. Cocaine activates redox-regulated transcription factors and induces TNF-alpha expression in human brain endothelial cells. *Brain Res*. 2001;920:125-33.

Li Y, Birnbaumer L, Teng CT. Regulation of ERalpha gene expression by estrogen receptor agonists and antagonists in SKBR3 breast cancer cells: differential molecular mechanisms mediated by g protein-coupled receptor GPR30/GPER-1. *Mol Endocrinol*. 2010;24:969-80.

Liemann S, Huber R. Three-dimensional structure of annexins. *Cell Mol Life Sci* 1997;53:516-21

Linden A, Gülden M, Martin HJ, Maser E, Seibert H. Peroxide-induced cell death and lipid peroxidation in C6 glioma cells. *Toxicol In Vitro*. 2008;22:1371-6.

Liu H, Lee ES, Gajdos C, Pearce ST, Chen B, Osipo C, Loweth J, McKian K, De Los Reyes A, Wing L, Jordan VC. Apoptotic action of 17beta-estradiol in raloxifene-resistant MCF-7 cells in vitro and in vivo. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95:1586-97.

Liu R, Yang SH, Perez E, Yi KD, Wu SS, Eberst K, Prokai L, Prokai-Tatrai K, Cai ZY, Covey DF, Day AL, Simpkins JW. Neuroprotective effects of a novel non-receptor-binding estrogen analogue: in vitro and in vivo analysis. *Stroke*. 2002;33:2485-91.

Lonze BE, Ginty DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*. 2002;35(4):605-23.

Lopez GN, Turck CW, Schaufele F, Stallcupi MR and Kushner PJ. *Growth factors signal to steroid receptors through mitogen-activated protein kinase regulation of p160 coactivator activity*. The Journal of Biological Chemistry. 2001;276:22177-82

Lösel R, Wehling M. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4:46-56.

Lu YP, Zeng M, Hu XY, Xu H, Swaab DF, Ravid R, Zhou JN. Estrogen receptor alpha-immunoreactive astrocytes are increased in the hippocampus in Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 2003;183:482-8.

Lucas TF, Royer C, Siu ER, Lazari MF, Porto CS. Expression and signaling of G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in rat sertoli cells. *Biol Reprod*. 2010;83:307-17.

Madak-Erdogan Z, Kieser KJ, Kim SH, Komm B, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Nuclear and extranuclear pathway inputs in the regulation of global gene expression by estrogen receptors. *Mol Endocrinol*. 2008;22:2116-27.

Maggiolini M, Vivacqua A, Fasanella G, Recchia AG, Sisci D, Pezzi V, Montanaro D, Musti AM, Picard D, Andò S. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2004;279:27008-16.

Mahesh VB, Dhandapani KM, Brann DW. Role of astrocytes in reproduction and neuroprotection. *Mol Cell Endocrinol*. 2006;246:1-9.

Manavathi B, Kumar R. Steering estrogen signals from the plasma membrane to the nucleus: two sides of the coin. *J Cell Physiol*. 2006;207:594-604.

Marin R, Ramírez C, Morales A, González M, Alonso R, Díaz M. Modulation of Abeta-induced neurotoxicity by estrogen receptor alpha and other associated proteins in lipid rafts. *Steroids*. 2008;99:2-6.

Matthews RP, Guthrie CR, Wailes LM, Zhao X, Means AR, McKnight GS. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase types II and IV differentially regulate CREB-dependent gene expression. *Mol Cell Biol*. 1994;14:6107-16.

Matthews J, Gustafsson JA. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv*. 2003;3:281-92.

Mattson MP, Camandola S. NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *J Clin Invest*. 2001;107:247-54.

Mattson MP, Goodman Y, Luo H, Fu W, Furukawa K. Activation of NF-kappaB protects hippocampal neurons against oxidative stress-induced apoptosis: evidence for induction of manganese superoxide dismutase and suppression of peroxynitrite production and protein tyrosine nitration. *J Neurosci Res*. 1997;49:681-97.

Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2:599-609.

Mena MA, Casarejos MJ, Solano R, Rodríguez-Navarro JA, Gómez A, Rodal I, Medina M, de Yébenes JG. NP7 protects from cell death induced by oxidative stress in neuronal and glial midbrain cultures from parkin null mice. *FEBS Lett*. 2009;583:168-74.

Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 1999;340:1801-11.

Métivier R, Penot G, Hübner MR, Reid G, Brand H, Kos M, Gannon F. Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell*. 2003;115:751-63.

Meyer MR, Baretella O, Prossnitz ER, Barton M. Dilatation of epicardial coronary arteries by the G protein-coupled estrogen receptor agonists G-1 and ICI 182,780. *Pharmacology*. 2010;86:58-64.

Micevych PE, Mermelstein PG. Membrane estrogen receptors acting through metabotropic glutamate receptors: an emerging mechanism of estrogen action in brain. *Mol Neurobiol*. 2008;66:77.

Milner TA, McEwen BS, Hayashi S, Li CJ, Reagan LP, Alves SE. Ultrastructural evidence that hippocampal alpha estrogen receptors are located at extranuclear sites. *J Comp Neurol*. 2001;429:355-71.

Milner TA, Ayoola K, Drake CT, Herrick SP, Tabori NE, McEwen BS, Warriar S, Alves SE. Ultrastructural localization of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat hippocampal formation. *J Comp Neurol.* 2005;491:81-95.

Mhyre AJ, Shapiro RA, Dorsa DM. Estradiol reduces nonclassical transcription at cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response elements in glioma cells expressing estrogen receptor alpha. *Endocrinology.* 2006;147:1796-804.

Morale MC, Serra PA, L'episcopo F, Tirollo C, Caniglia S, Testa N, Gennuso F, Giaquinta G, Rocchitta G, Desole MS, Miele E, Marchetti B. Estrogen, neuroinflammation and neuroprotection in Parkinson's disease: glia dictates resistance versus vulnerability to neurodegeneration. *Neuroscience.* 2006;138:869-78.

Morissette M, Le Saux M, D'Astous M, Jourdain S, Al Sweidi S, Morin N, Estrada-Camarena E, Mendez P, Garcia-Segura LM, Di Paolo T. Contribution of estrogen receptors alpha and beta to the effects of estradiol in the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008;108:327-38.
Moodbidri MS, Shirsat NV. Activated JNK brings about accelerated apoptosis of Bcl-2-overexpressing C6 glioma cells on treatment with tamoxifen. *J Neurochem.* 2005;92:1-9.

Morley P, Whitfield JF, Vanderhyden BC, Tsang BK and Schwartz JL. *A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium.* *Endocrinology,* 1992. 131:1305-12

Munhoz CD, Lepsch LB, Kawamoto EM, Malta MB, Lima Lde S, Avellar MC, Sapolsky RM, Scavone C. Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor-kappaB in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion. *J Neurosci.* 2006;26:3813-20.

Mussunoor S, Murray GI. The role of annexins in tumour development and progression. *J Pathol* 2008;216:131-40

Nehra R, Riggins RB, Shajahan AN, Zwart A, Crawford AC, Clarke R. Bcl2 and casp8 regulation by nf-kappab differentially affect mitochondrial function and cell fate in antiestrogen-sensitive and -resistant breast cancer cells. *Faseb J.* 2010;24:2040-55.

Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1991;139:271-9.

Nilsen J, Brinton RD. Mitochondria as therapeutic targets of estrogen action in the central nervous system. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2004;3:297-313.

Nilsen J, Brinton RD. Mechanism of estrogen-mediated neuroprotection: regulation of mitochondrial calcium and Bcl-2 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003;100:2842-7.

Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev.* 2001;81:1535-65.

O'Lone R, Frith MC, Karlsson EK and Hansen U. *Genomic targets of nuclear estrogen receptors.* *Molecular Endocrinology*, 2006;18:1859-75

Olson VG, Zabetian CP, Bolanos CA, Edwards S, Barrot M, Eisch AJ, Hughes T, Self DW, Neve RL, Nestler EJ. Regulation of drug reward by cAMP response element-binding protein: evidence for two functionally distinct subregions of the ventral tegmental area. *J Neurosci.* 2005;25:5553-62.

Otto C, Rohde-Schulz B, Schwarz G, Fuchs I, Klewer M, Brittain D, Langer G, Bader B, Prelle K, Nubbemeyer R, Fritzemeier KH. G protein-coupled receptor 30 localizes to the endoplasmic reticulum and is not activated by estradiol. *Endocrinology.* 2008; 24:2040-55.

Pandey SC, Zhang H, Roy A, Misra K. Central and medial amygdaloid brain-derived neurotrophic factor signaling plays a critical role in alcohol-drinking and anxiety-like behaviors. *J Neurosci.* 2006 Aug 9;26(32):8320-31. Erratum in: *J Neurosci.* 2010;30:7447-8.

Panet H, Barzilai A, Daily D, Melamed E, Offen D. Activation of nuclear transcription factor kappa B (NF-kappaB) is essential for dopamine-induced apoptosis in PC12 cells. *J Neurochem.* 2001;77:391-8.

Pawlak KJ, Zhang G, Wiebe JP. Membrane 5alpha-pregnane-3,20-dione (5alphaP) receptors in MCF-7 and MCF-10A breast cancer cells are up-regulated by estradiol and 5alphaP and down-regulated by the progesterone metabolites, 3alpha-dihydroprogesterone and 20alpha-dihydroprogesterone, with associated changes in cell proliferation and detachment. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005;97:278-88.

Peri A, Serio M. Estrogen receptor-mediated neuroprotection: The role of the Alzheimer's disease-related gene seladin-1. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2008;4:817-24.

Pedram A, Razandi M, Levin ER. Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Mol Endocrinol.* 2006;20:1996-2009.

Platania P, Seminara G, Aronica E, Troost D, Vincenza Catania M, Angela Sortino M. 17beta-estradiol rescues spinal motoneurons from AMPA-induced toxicity: a role for glial cells. *Neurobiol Dis.* 2005;20:461-70.

Poon HF, Calabrese V, Scapagnini G, Butterfield DA. Free radicals: key to brain aging and heme oxygenase as a cellular response to oxidative stress. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2004;59:478-93.

Prencipe M, Ferretti C, Casini AR, Santini M, Giubilei F, Culasso F. Stroke, disability, and dementia: results of a population survey. *Stroke*, 1997;28:531-6

Rand JH. The annexinopathies: a new category of diseases. *Biochim Biophys Acta* 2000;1498:169-73.

Raz L, Khan MM, Mahesh VB, Vadlamudi RK, Brann DW. Rapid estrogen signaling in the brain. *Neurosignals*. 2008;16:140-53.

Rescher U, Gerke V. Annexins – unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci*. 2004;117:2631-9

Rong Y, Baudry M. Seizure activity results in a rapid induction of nuclear factor-kappa B in adult but not juvenile rat limbic structures. *J Neurochem*. 1996;67:662-8.

Roquer J, Campello AR and Gomis M. Sex differences in first-ever acute stroke. *Stroke*. 2003;34:1581-5.

Sawada H, Ibi M, Kihara T, Urushitani M, Akaike A, Shimohama S. Estradiol protects mesencephalic dopaminergic neurons from oxidative stress-induced neuronal death. *J Neurosci Res*. 1998;54:707-19.

Schwend T, Gustafsson JA. False positives in MALDI-TOF detection of ERbeta in mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2006;343:707-11

Segars JH, Driggers PH. Estrogen action and cytoplasmic signaling cascades. part i: membrane-associated signaling complexes. *Trends Endocrinol Metab*. 2002;13:349-54.

Shaywitz AJ, Greenberg ME. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:821-61.

Sies H, Cadenas E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1985;311:617-31.

Simoncini T, Mannella P, Genazzani AR. Rapid estrogen actions in the cardiovascular system. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1089:424-30,

Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature*. 2000;407:538-41.

Segars JH, Driggers PH. Estrogen action and cytoplasmic signaling cascades. Part I: membrane-associated signaling complexes. *Trends Endocrinol Metab.* 2002;13:349-54.

Silva AR, Menezes PF, Martinello T, Novakovich GF, Praes CE, Feferman IH. Antioxidant kinetics of plant-derived substances and extracts. *Int J Cosmet Sci.* 2009; [Epub ahead of print]. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1468-2494.2008.00483.x/abstract;jsessionid=44A22DBAFFA277FD56E45DFECE85E298.d01t02?systemMessage=Due+to+essential+maintenance%2C+access+to+Wiley+Online+Library+will+be+disrupted+on+Sunday%2C+19th+Dec+between+10%3A00-12%3A00+GMT>

Simpkins JW, Wen Y, Perez E, Yang S, Wang X. Role of nonfeminizing estrogens in brain protection from cerebral ischemia: an animal model of Alzheimer's disease neuropathology. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1052:233-42.

Simpkins JW, Wang J, Wang X, Perez E, Prokai L, Dykens JA. Mitochondria play a central role in estrogen-induced neuroprotection. *Curr. Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2005;4:69-83.

Simpkins JW, Yang SH, Sarkar SN, Pearce V. Estrogen actions on mitochondria physiological and pathological implications. *Mol Cell. Endocrinol.* 2008;290:51—9.

Simpkins JW, Singh M. More than a decade of estrogen neuroprotection. *Alzheimers Dement.* 2008;4:S131-6.

Song RX, Santen RJ. Membrane initiated estrogen signaling in breast cancer. *Biol Reprod.* 2006;75:9-16.

Sortino MA, Chisari M, Merlo S, Vancheri C, Caruso M, Nicoletti F, Canonico PL, Copani A. Glia mediates the neuroprotective action of estradiol on beta-amyloid-induced neuronal death. *Endocrinology.* 2004;145:5080-6.

Srinivasan A, Lehmler HJ, Robertson LW, Ludewig G. Production of DNA strand breaks in vitro and reactive oxygen species in vitro and in HL-60 cells by PCB metabolites. *Toxicol Sci.* 2001;60:92-102.

Suzuki S, Brown CM, Wise PM. Neuroprotective effects of estrogens following ischemic stroke. *Front Neuroendocrinol.* 2009;30:201-11.

Sur P, Sribnick EA, Wingrave JM, Nowak MW, Ray SK, Banik NL. Estrogen attenuates oxidative stress-induced apoptosis in C6 glial cells. *Brain Res.* 2003;971:178-88.

Tao X, Finkbeiner S, Arnold DB, Shaywitz AJ, Greenberg ME. Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron.* 1998 Jun;20:1297.

Thanos D, Maniatis T. NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell*. 1995;80:529-32.

Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*. 2005;146:624-32.

Tora L, White J, Brou C, Tasset D, Webster N, Scheer E, Chambon P. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell*. 1989;59:477-87.

Tripanichkul W, Gerdprasert O, Jaroensuppaperch EO. Estrogen reduces BDNF level, but maintains dopaminergic cell density in the striatum of MPTP mouse model. *Int J Neurosci*. 2010;120:489-95.

Vasudevan N, Pfaff DW. *Membrane-initiated actions of estrogens in neuroendocrinology: emerging principles*. *Endocrine Reviews*. 2007;28:1-19

Vegeto E, Benedusi V, Maggi A. Estrogen anti-inflammatory activity in brain: a therapeutic opportunity for menopause and neurodegenerative diseases. *Front Neuroendocrinol*. 2008;29:507-19.

Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci*. 2002;59:1428-59.

Wang C, Yu J, Kallen CB. Two estrogen response element sequences near the PCNA gene are not responsible for its estrogen-enhanced expression in MCF7 cells. *PLoS One*. 2008;3:e3523.

Wenger NK, Speroff L and Packard B. *Cardiovascular health and disease in women*. *The New England Journal of Medicine*, 1993;329:247-56

Williams DL, Ozment-Skelton T, Li C. Modulation of the phosphoinositide 3- kinase signaling pathway alters host response to sepsis, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Shock* 2006;25:432–9.

Wilson ME, Westberry JM, Trout AL. Estrogen receptor-alpha gene expression in the cortex: Sex differences during development and in adulthood. *Horm Behav*. 2010; [Epub ahead of print]. Available from: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WGC-50SGPJ3&_user=5674931&_coverDate=08%2F14%2F2010&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_origin=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000049650&_version=1&_urlVersion=0&_userid=5674931&md5=9a6e45987f581420cdc218f385dac20a&searchtype=a

Wise PM, Dubal DB, Rau SW, Brown CM, Suzuki S. Are estrogens protective or risk factors in brain injury and neurodegeneration? 2002;26:308-12.

Woolley CS. Acute effects of estrogen on neuronal physiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007;47:657-80.

Xing J, Ginty DD, Greenberg ME. Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science*. 1996;273:959-63.

Yaffe K. Hormone therapy and the brain: déjà vu all over again? *JAMA*. 2003; 289:2717-9.

Yang SJ, Chen HM, Hsieh CH, Hsu JT, Yeh CN, Yeh TS, Hwang TL, Jan YY, Chen MF. Akt pathway is required for oestrogen-mediated attenuation of lung injury in a rodent model of cerulein-induced acute pancreatitis. *Injury*. 2010; [Epub ahead of print]. Available from: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T78-50SGB2W-2&_user=5674931&_coverDate=08%2F14%2F2010&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_origin=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000049650&_version=1&_urlVersion=0&_userid=5674931&md5=85f5329df1f9c6ad2e3a8e0887c84107&searchtype=a

Yang SH, Liu R, Perez EJ, Wen Y, Stevens SM, Valencia T, Brun-Zinkernagel AM, Prokai L, Will Y, Dykens J, Koulen P, Simpkins JW. Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004;101:4130—5.

Yang SH, Prokai L, Simpkins JW. Correspondence regarding Schwend and Gustafsson, “False positives in MALDI-TOF detection of ERbeta in mitochondria”. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;345:917—8.

Zheng FF, Wu R-C, Smith CL and O'Malley BW. *Rapid estrogen-induced phosphorylation of the SRC-3 coactivator occurs in an extranuclear complex containing estrogen receptor*. *Molecular and Cellular Biology*, 2005; 25:8273-84

Zhou Y, Watters JJ and Dorsa DM. *Estrogen rapidly induces the phosphorylation of the cAMP response element binding protein in rat brain*. *Endocrinology*, 1996;137:2163-6