DIELLY CATRINA FAVACHO LOPES

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR GPER-1 NA NEUROPROTEÇÃO MEDIADA
POR ESTRÓGENO EM MODELO DE ISQUEMIA POR PRIVAÇÃO DE
GLICOSE/OXIGÊNIO EM CÉLULAS CORTICAIS CEREBRAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências

São Paulo
2014

DIELLY CATRINA FAVACHO LOPES

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR GPER-1 NA NEUROPROTEÇÃO MEDIADA
POR ESTRÓGENO EM MODELO DE ISQUEMIA POR PRIVAÇÃO DE
GLICOSE/OXIGÊNIO EM CÉLULAS CORTICAIS CEREBRAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Carolina Demarchi Munhoz

Co-orientador: Cristoforo Scavone

Versão original

São Paulo
2014

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

reprodução não autorizada pelo autor

Lopes, Dielly Catrina Favacho.

Participação do receptor GPER-1 na neuroproteção mediada por estrógeno em modelo de isquemia por privação de glicose/oxigênio em células corticais cerebrais / Dielly Catrina Favacho Lopes. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Carolina Demarchi Munhoz.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Sinalização estrogênica no sistema nervoso central.

Versão do título para o inglês: Participation of GPER-1, a G-protein coupled estrogen receptor, in the estrogen-mediated neuroprotection of brain cortical primary cells in a glucose/oxygen deprivation model.

1. Estrógeno 2. GPER 3. Neuroproteção 4. Isquemia 5. Privação de glicose/oxigênio 6. Córtex frontal I. Munhoz, Profa. Dra. Carolina Demarchi II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0121/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Dielly Catrina Favacho Lopes.

Título da Tese: Participação do receptor GPER-1 na neuroproteção mediada por estrógeno em modelo de isquemia por privação de glicose/oxigênio em células corticais cerebrais.

Orientador(a): Profa. Dra. Carolina Demarchi Munhoz.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

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) (011) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA. 021.13

São Paulo, 05 de abril de 2013.

REF.: Protocolo nº 050/2010.

"Participação do receptor GPER-1 na neuroproteção mediada por estrógeno em modelo de isquemia por privação de glicose"

Prezada Professora,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 24.05.2016.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador - CEUA-ICB/ /USP

Ilma.Sra.

Profa. Dra. Carolina Demarchi Munhoz de Souza
Departamento de Farmacologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

**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) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **050** nas fls. **87** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Carolina Demarchi Munhoz de Souza, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Participação do receptor GPER-1 na neuroproteção mediada por estrógeno em modelo de isquemia por privação de glicose** do qual participou(aram) o(s) **Dielly Catrina Favacho Lopes, Camila Sayuri Matsubara, Laís Rodrigues, Lucas A.F.Franco e o pesquisador Cristoforo Scavone**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **21.05.2010**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 24 de maio de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

Aos meus pais,
por todo o apoio e incentivo neste caminho...

Aos meus irmãos,
pelo companheirismo nesta jornada...

Ao meu companheiro,
pela dedicação e incentivo nesta jornada...

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por se fazer presente em todos os momentos, permitindo-me ter sabedoria para enfrentar todos os obstáculos e alcançar meus objetivos.

Aos meus pais, Luiz Carlos de Sousa Lopes e Vera Lúcia Favacho Lopes, **em especial**, que com amor, carinho, apoio, incentivo e dedicação abriram as portas para o futuro e me impulsionaram a buscar um ideal.

Aos irmãos, Douglas Lobato Lopes Neto e Danilo Luiz Favacho Lopes, pelo carinho e cumplicidade durante toda esta jornada.

Ao meu companheiro e amigo, Joelton Fernandes Fonseca, que por inúmeras vezes foi deixado de lado durante esta jornada e que, mesmo assim, com muito carinho, compreensão e paciência nunca deixou de me apoiar e incentivar nos momentos de aflição.

À minha orientadora e amiga, Carolina Demarchi Munhoz, a quem admiro pelo profissionalismo, pela oportunidade de crescimento nesta carreira, pela amizade e por estar sempre disponível a me ajudar e aconselhar da melhor forma possível em todos os aspectos.

À doutoranda e amiga, Érica de Almeida Duque, pela parceria e cumplicidade em vários experimentos, pelos ensinamentos técnicos e discussões científicas, pela amizade e por nunca ter se negado a ajudar nos momentos em que precisei.

Aos doutorandos e amigos, Leonardo Santana Novaes e Nilton Barreto dos Santos, pelos ensinamentos técnicos e discussões científicas, pela ajuda imensurável nos experimentos, pela amizade, conselhos e diversão nas horas de lazer.

Aos colegas do Laboratório de Neuroendocrinofarmacologia e Imunomodulação, Guiomar Wiesel, Marília Malta, Jennifer Rocha e Juliano Perffeti por todos os momentos, agradáveis e difíceis, que passamos juntos. E aos amigos que por nele passaram, Nathalia Gobbetti e Camila Matsubara.

Ao professor Cristoforo Scavone e todos os colegas do Laboratório de Farmacologia Molecular, em especial aos amigos Andrea Vasconcelos e Caio Mazucanti, pelo apoio, pelo suporte técnico e inúmeras discussões científicas.

À FAPESP, CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro concedido ao projeto e ao laboratório.

"Além da mente humana e como um impulso livre, cria-se a ciência. Esta se renova, assim como as gerações, frente a uma atividade que constitui o melhor jogo do *homo ludens*: a ciência é, no mais estrito e melhor dos sentidos, uma gloriosa diversão".

Jacques Barzun

RESUMO

Lopes DCF. Participação do receptor GPER-1 na neuroproteção mediada por estrógeno em modelo de isquemia por privação de glicose/oxigênio em células corticais cerebrais. [tese (Doutorado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

O estrógeno desempenha um papel fundamental na reprodução, desenvolvimento das glândulas mamárias, reposição óssea, metabolismo e função cardiovascular. No sistema nervoso central, este hormônio é importante para o desenvolvimento de centros neuroendócrinos e de outras redes neuronais incluindo os sistemas límbico e motor. Dentro deste contexto, buscamos elucidar mecanismos celulares que embasam esta neuroproteção, através da sinalização não-genômica rápida mediada pelo GPER-1 (G-protein coupled estrogen receptor 1) em cultura primária mistas neurônio/células da glia e enriquecida de neurônios derivada de córtex frontal de ratas neonatas submetidas ou não à privação de glicose/oxigênio (PGO). Primeiramente, nossos resultados mostraram que as células corticais em cultura expressam o receptor GPER-1 e esta marcação encontrava-se dispersa tanto no citosol como na região nuclear e perinuclear dessas células na ausência do ligante endógeno (17 β -estradiol, E2). Com 10 minutos de exposição ao E2, a localização perinuclear do GPER-1 encontrava-se diminuída e observamos aumento na localização citoplasmática do GPER-1. Aos 15 minutos de exposição, a marcação para este receptor mostrou-se mais concentrada no citosol e na membrana plasmática, sugerindo que o compartimento perinuclear provavelmente não é o destino final para o GPER-1, e aos 30 minutos de exposição ao E2, o receptor encontrava-se novamente disperso no citosol e regiões nuclear e perinuclear. Quando estas culturas foram estimuladas com G1, o trânsito do GPER-1 ocorreu mais precocemente do que aquele observado ante à exposição ao E2 (aos 5 minutos). Este tráfego intracelular do GPER-1 também foi observado em células C6 de glioma de rato sob os mesmos estímulos. Por fim, ao estudarmos os possíveis efeitos neuroprotetores de E2 e/ou G1 em ambos os fenótipos de culturas expostos à PGO por 15, 30 e 60 minutos e reperfundidas por até 24 horas, nossos resultados mostraram que a proteção, via sinalização estrogênica, foi dependente da composição celular de cada cultura. A ausência da sinalização via GPER-1 previamente à PGO aumentou a morte celular induzida pela PGO em nossas condições experimentais, sugerindo que o bloqueio desta sinalização via GPER-1 pode estar relacionado ao pior prognóstico de lesões isquêmicas, e a suplementação com G1 no meio de cultura durante a privação e reperusão atenuaram estes efeitos induzidos pela PGO. Além disso, nossos resultados apontaram para a influência das células da glia como mediadores do papel neuroprotetor, via sinalização estrogênica não-nuclear, neste contexto de privação de glicose/oxigênio. Porém, estes efeitos neuroprotetores não foram observados em linhagem imortalizada de astrócitos, células C6, sob os mesmos paradigmas. Além disso, nossos resultados mostraram que a neuroproteção via GPER-1 não é mediada pelo *cross-talk* GPER-1/EGFR, uma vez que a inibição dos receptores de EGF não bloquearam ou potencializaram os efeitos deletérios da isquemia, sugerindo que no sistema nervoso central a sinalização estrogênica através do GPER-1 seja diferente daquela em células cancerígenas. Portanto, a participação do GPER-1 na neuroproteção mediada por estrógeno tem implicações práticas importantes, pois abre possibilidades para o desenvolvimento e uso de novos agonistas GPER-1 para elucidar mecanismos de proteção que atuem desde a lesão até o processo de reparo em injúrias isquêmicas.

Palavras-chave: Estrógeno. GPER. Neuroproteção. Isquemia. Privação de Glicose/Oxigênio. Córtex Frontal.

ABSTRACT

Lopes DCF. Participation of GPER-1, a G-protein coupled estrogen receptor, in the estrogen-mediated neuroprotection of brain cortical primary cells in a glucose/oxygen deprivation model. [Ph. D. thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Estrogen plays a key role in reproduction, development of mammary glands, bone turnover, metabolism and cardiovascular function. In the central nervous system, this hormone is important to the development of neuroendocrine nucleus and other neural networks including the limbic and motor systems. Within this context, we aim to elucidate the cellular mechanisms that underlie the potential neuroprotection through rapid non-genomic signaling mediated by GPER-1 (G-protein coupled estrogen receptor 1) in mixed neuron/glia and enriched neurons primary culture derived from frontal cortex submitted or not to glucose/oxygen deprivation (OGD). First, our results showed that cortical cells in cultures expressed GPER-1 and this receptor was dispersed both in the cytoplasm and the perinuclear region of cells in the absence of the ligand (E2). At 10 minutes of E2 exposure, the GPER-1 perinuclear localization was diminished and we observed an increase of GPER-1 in the cytosol. At 15 minutes, the receptor tended to be throughout the cytoplasm and in plasma membrane, suggesting that the perinuclear compartment is likely not the final destination for GPER-1, and at 30 minutes after E2, the GPER-1 was disperse again in cytosol, perinuclear and nuclear regions. When these cultures were stimulated with G1, GPER-1 trafficking occurred earlier than the one induced by E2 exposure (5 minutes). This GPER-1 trafficking also was observed in C6 glioma cells induced by the same stimuli. Finally, we investigated possible neuroprotective effects of E2 and/or G1 in both phenotypes of cultures exposed to OGD for 15, 30 and 60 minutes and reperused for up to 24 hours, our results showed that protection induced by rapid estrogenic signaling was cellular composition-dependent, since only in mixed cultures these effects were evident. The absence of GPER-1 signaling before OGD, using GPER-1 antagonist G15, increased OGD-induced cell death, suggesting that the blockage of this pathway could be associated to a worst prognostic of ischemic damage. On the other hand, media culture supplemented with G1 during OGD and reperfusion attenuated those effects induced by OGD. Moreover, it was observed that glial cells played an important role as neuroprotective mediators via non-nuclear estrogenic signaling in this ischemia model. However, these neuroprotective effects were not observed in immortalized astrocyte lineage, C6 glioma cells, under the same paradigms. In addition, our results showed that neuroprotective via GPER-1 is not mediated by cross-talk GPER-1/EGFR, because EGF receptors inhibition either blocked nor potentiated the deleterious effects of ischemia, suggesting that in the central nervous system, estrogenic signaling through GPER-1 would be different than the one in cancer cells. Therefore, GPER-1 participation in the neuroprotection mediated by estrogen could have important practical implications, since it opens the possibility to development and use of new GPER-1 agonists to elucidate protection mechanisms from injury to repair processes in ischemic conditions.

Keywords: Estrogen. GPER. Neuroprotection. Ischemia. Glucose/Oxygen Deprivation. Frontal Cortex.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Estrógenos	13
1.2 Sinalização celular mediada por 17β-estradiol	13
1.2.1 Sinalização genômica clássica e não-clássica	15
1.2.2 Sinalização rápida	16
1.2.3 Sinalização via GPER-1	17
1.3 Ações do estrógeno no sistema nervoso central	19
1.4 Neuroproteção estrogênica e isquemia cerebral	23
2 OBJETIVO	28
2.1 Geral	28
2.2 Específicos	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Animais	29
3.2 Culturas primárias mistas (neurônios/células da glia) e enriquecidas de neurônios corticais	29
3.3 Imunofluorescência	30
3.4 Tratamento das culturas primárias corticais	31
3.4.1 Modelo de isquemia por privação de glicose/oxigênio	31
3.4.2 Tratamento com 17 β -estradiol, G1 (agonista do receptor GPER-1) e G15 (antagonista do receptor GPER-1)	32
3.4.3 Tratamento com inibidor de tirosina quinase seletivo para o receptor de EGF e NGF	33
3.5 Culturas de astrócitos (linhagem C6 de glioma de rato)	34
3.6 Viabilidade celular	34
3.7 Análise de resultados	35
4 RESULTADOS	36
4.1 Caracterização das culturas celulares e expressão do GPER-1	36
4.1.1 Composição celular de culturas primárias mistas neurônios/células da glia e enriquecidas de neurônios derivadas de córtex frontal de ratas neonatas	36
4.1.2 Expressão do GPER-1 nas células primárias corticais em cultura	38
4.2 Curva de concentração e tempo de exposição ao E2 e ao G1 em culturas primárias derivadas de córtex frontal	39
4.3 Trânsito do GPER-1 da membrana plasmática para o núcleo	41

4.4 Efeitos do 17β-estradiol, G1 e G15 em cultura primárias frontocorticais submetidas ao modelo de isquemia por privação de glicose/oxigênio	45
<i>4.4.1 Modelo de isquemia por privação de glicose/oxigênio</i>	<i>45</i>
<i>4.4.2 Efeitos do 17β-estradiol, G1 e G15 em culturas primárias frontocorticais submetidas a privação de glicose/oxigênio</i>	<i>46</i>
<i>4.4.3 Efeitos do 17β-estradiol e G1 em culturas de glioma de rato (linhagem C6) submetidas à privação de glicose/oxigênio</i>	<i>51</i>
<i>4.4.4 Efeitos da interação entre receptores de fatores de crescimento e a neuroproteção mediada por GPER-1 em culturas primárias mistas derivadas de córtex frontal</i>	<i>53</i>
5 DISCUSSÃO	55
6 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 Estrógenos

Os estrógenos exercem amplo efeito através do corpo e regulam processos fisiológicos e patológicos tanto em mulheres quanto em homens. A baixa prevalência de muitas doenças em mulheres pré-menopausa é atribuída à presença de 17β -estradiol, o estrógeno endógeno predominante e mais potente (1), embora esteroides como o estriol, estrona e sulfato de estradiol/estrona também possam exercer importante resposta biológica na sinalização deste hormônio, por exemplo, em carcinoma mamário (2).

O 17β -estradiol (E2), hormônio sexual feminino, é um esteroide monofenólico e lipofílico sintetizado a partir do colesterol, com importante papel no desenvolvimento dos órgãos reprodutores e nas características sexuais femininas secundárias (1, 3, 4). Em mulheres pré-menopausa e não grávidas, a enzima envolvida na síntese de E2 é a aromatase citocromo P450 ($P450_{AROM}$) que catalisa a conversão de andrógenos em estrógenos. Essa enzima é expressa nos ovários e em tecidos não-endócrinos como fígado, tecido adiposo, ossos, músculos, células endoteliais e encéfalo (5). Em mulheres pós-menopausa e em homens, a maior fonte de E2 se dá pela conversão local de testosterona, o hormônio sexual masculino, e androstenediona, hormônio esteroide intermediário da via metabólica para produção tanto de andrógenos quanto estrógenos, à 17β -estradiol pela enzima conversora aromatase em sítios extragonadais (4-6).

Classicamente, o E2 é considerado um hormônio reprodutivo, devido ao seu papel bem caracterizado na sinalização por retroalimentação (*feedback*) no eixo hipotálamo-hipofisário-ovariano (4), porém, além da sua função na reprodução, o E2 regula uma gama de efeitos nos tecidos corporais, incluindo o encéfalo, mamas, sistema cardiovascular e nos ossos (3, 5). As ações desse hormônio no cérebro são de importância considerável, uma vez que o E2 pode modular a homeostase cerebral tanto através dos seus efeitos neuroendócrinos quanto seus efeitos neuroprotetores, como na melhora de processos cognitivos (1, 3, 4, 7-10).

1.2 Sinalização celular mediada por 17β -estradiol

Os efeitos biológicos do E2 podem ser mediados, via difusão através da membrana plasmática, por receptores nucleares clássicos (ER) ou pela ligação do E2 em receptores acoplados à proteína G (GPER-1, do inglês, *G Protein-coupled Estrogen Receptor 1*). Dois tipos de receptores nucleares clássicos são conhecidos: o receptor de estrógeno α (NR3A1, gene *ESR1*) e o β (NR3A2,

gene *ESR2*). Os dois subtipos nucleares compartilham uma organização estrutural similar em seus domínios, possuem afinidade de ligação ao E2 semelhante, mas revelam diferenças na resposta a esta ligação ao E2 e a ligantes (agonistas e antagonistas) diferentes (3, 5, 11-13) (Figura 1). Em contrapartida, respostas rápidas ao 17 β -estradiol também têm sido associadas ao receptor GPER-1, pertencente à família dos receptores que apresentam sete domínios transmembrana e são associados à proteína G estimulatória (14) e não envolvidos no processo de feminilização (15).

Figura 1. Estruturas de domínios e similaridades na sequência proteica dos receptores ER α e ER β .

O domínio N-terminal A/B (AF-1) codifica a função de ativação transcricional 1 (AF-1) independente de ligante sendo composto por aminoácidos alvos de modificações pós-traducionais por quinases de vias de fatores de crescimento. O domínio C é o domínio de ligação do ER ao DNA em sequências específicas, chamadas elementos responsivos ao E2 (ERE), onde modulam a transcrição de genes alvos. O domínio D contém aminoácidos que promovem a localização nuclear e que também podem ser alvos de modificações pós-traducionais que afetam a atividade e degradação dos ERs. O domínio C-terminal E/F consiste no domínio de ligação do ligante que envolve, além da ligação ao ligante, a dimerização do receptor e a interação com proteínas correguladoras via função de ativação transcricional 2 (AF-2) dependente de ligante, o domínio E/F também está relacionado à atividade de agonista/antagonista de moduladores seletivos de ER (SERMs). Fonte: Nilsson e Gustafsson (5).

Apesar de os receptores ER α e ER β serem expressos de maneira similar em alguns órgãos, algumas vezes sua expressão é diferente em tipos celulares distintos presentes no mesmo órgão, enquanto que em outros, um ou outro subtipo é predominante (5). Por exemplo, o ER α é predominantemente expresso no útero, próstata (estroma), ovário (células da teca), testículos (células de Leydig), em várias regiões do encéfalo, no rim, no epidídimo, na glândula suprarrenal, nos ossos, nas mamas e no fígado; enquanto que o ER β é predominantemente expresso no cólon, na próstata (epitélio), no pulmão, na bexiga, no encéfalo, ovário (células da granulosa), testículo, medula óssea, glândulas salivares e endotélio vascular (5, 16-18). Por outro lado, a expressão de GPER-1 tem sido associada às funções neuroendócrina e cerebral, funções de células imunes, regulação endócrina e metabolismo, função cardiovascular e renal, além de funções reprodutivas (1, 10, 19-21), sendo expresso no encéfalo em áreas importantes para o aprendizado espacial, memória e atenção (1, 4, 9). Este receptor pode ser também um importante regulador das funções colinérgicas basais prosencefálicas (22) e tem sido associado com o desenvolvimento tanto de câncer de mama quanto

endometrial (21, 23-25). Além disso, tem sido demonstrado que o GPER-1 medeia a regulação de genes (tais como, ciclina D2, Bcl-2, CTGF, NGF, TNF α , entre outros) relacionados a migração e proliferação celular induzida por estrógenos (26).

Desta maneira, três tipos distintos de sinalização mediada pelos receptores de estrógeno podem ser evidenciados, referidos como ações genômicas clássicas (também conhecida como via clássica) que envolve a ligação do complexo hormônio/receptor aos sítios específicos no DNA chamados elementos responsivos ao estrógeno (ERE), ações genômicas não-clássicas (conhecida como via não-clássica) associadas a ativação de outros fatores de transcrição e, mais recentemente, ações rápidas (conhecida como via rápida) através da modulação de segundos mensageiros, por exemplo. (19, 25). Estas ações regulam, direta (via clássica) ou indiretamente (vias não-clássica e rápida), a transcrição de genes alvos, seja ela através da ligação do receptor a sítios específicos no DNA; ou por meio de interação proteína-proteína com outros fatores de transcrição; ou através da ativação de proteínas G, fatores de crescimento, modulação dos níveis intracelulares de segundos mensageiros como AMP_c, IP₃ (trifosfato de inositol) e modulação de cálcio, e da atividade de quinases como a proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), fosfatidilinositol-3 quinase (PI-3K) e serina-treonina quinase (Akt) (3, 12-14, 19, 21, 25, 27-29).

1.2.1 Sinalização genômica clássica e não-clássica

Na ação genômica clássica, o E2 difunde-se através da membrana plasmática e se liga aos ERs presentes no citoplasma e núcleo, embora a maior parte esteja concentrado na região nuclear e perinuclear. No estado inativo, esses receptores são monômeros associados a imunofilinas e proteínas de choque térmico (por exemplo, Hsp90, Hsp70 e Hsp56). Na presença do ligante, ocorre uma mudança conformacional, que causa dissociação dessas chaperonas (complexos multiproteicos), dimerização do receptor e translocação do complexo E2-ER para o núcleo. No núcleo, os ERs se ligam a sequências específicas do DNA (ERE) dentro de regiões promotoras de genes alvos para modular a transcrição gênica através do recrutamento de proteínas cofatoras (por exemplo, coativadores e correpresores) (12, 30).

A ativação de ERs pela via clássica induz a expressão de genes neuroprotetores, como por exemplo: 1) a expressão de Bcl-2 e Bcl-xL, proteínas anti-apoptóticas que atuam na inibição de caspases (do inglês, *cysteine-aspartic-acid-proteases*), proteases essenciais nos processos de apoptose celular (12, 31-37); e 2) aumento da secreção de neurotrofinas como BDNF (do inglês, *brain derived neurotrophic factor*), GDNF (do inglês, *glial derived neurotrophic factor*) e IGF-1 (do inglês, *insulin like growth factor 1*) (38).

Por outro lado, a via genômica não-clássica resulta da interação do E2 e seus receptores nucleares clássicos com outros fatores de transcrição, tais como NF- κ B (do inglês, *nuclear factor kappa B*), AP-1 (do inglês, *activator protein-1*) e SP-1 (do inglês, *specificity protein-1*), modulando outros genes ativados e transcritos pela via clássica (19). Esse efeito se dá através de interação proteína-proteína, onde o monômero ER pode formar complexos com c-Fos/c-Jun B e regular a transcrição nos sítios AP-1; interação com SP-1; interação com fatores de transcrição como o CREB (do inglês, *cAMP response element-binding protein*); ou pela inibição de genes transcritos pelo NF- κ B (12, 39-42), por exemplo.

1.2.2 Sinalização rápida

Além dos efeitos genômicos clássicos e mais lentos do E2 que envolvem a ativação dos ERs e modulação da transcrição gênica, esse hormônio pode agir muito rapidamente através de sua interação/ativação de vias de sinalização intracelulares. Tradicionalmente, respostas celulares rápidas são associadas com receptores de superfície celular, incluindo receptores de fatores de crescimento e receptores acoplados à proteína G, caracterizados por seu início rápido (segundos a minutos) e sua insensibilidade a inibidores transcricionais, que culminam com mobilização de cálcio, ativação de quinases, aumento de via de sinalização através de segundos mensageiros e produção de óxido nítrico (3, 10-12, 27, 43, 44).

Inicialmente, acreditava-se que o E2 se ligaria a ERs associados à membrana plasmática e a subunidades reguladoras de PI-3K, resultando na ativação de AKT e NOS (óxido nítrico sintase). A AKT poderia fosforilar diretamente os ERs, resultando em um aumento da transcrição independente de ligante de genes responsivos ao E2 (45), sugerindo que componentes da mesma via de sinalização intracelular poderiam regular ambas as funções genômicas e não-genômicas deste hormônio. Atualmente, sabe-se que eventos de sinalização rápida ocorrem em um curto período de tempo, porém estes eventos rápidos podem estimular vias que, direta ou indiretamente, modulam a expressão gênica (46).

Receptores de estrógeno clássicos estão localizados em domínios especializados de membrana (por exemplo, *lipid rafts* e cavéolas), ricos em colesterol e ácidos graxos saturados (5, 10, 12, 25, 47, 48), onde podem interagir com proteínas de membrana. Marino e Ascenzi (47) postularam que o ER α e ER β são transportados para a membrana plasmática e se localizam dentro destes domínios através da palmitoilação dos receptores nos resíduos Cys447 e Cys399, respectivamente, presentes no domínio de ligação ao ligante. Assim, na presença do ligante E2, cascatas de sinalização rápidas são iniciadas através da membrana por interação ou com receptores de superfície celular,

como receptores de fatores de crescimento (por exemplo, receptor do fator de crescimento epidermal – receptor EGF; e o receptor do fator de crescimento semelhante a insulina 1 – receptor IGF-1) e receptores de glutamato metabotrópicos, ou com outras proteínas, como proteínas G e proteínas Ras/Src (12, 25, 47, 48), culminando em mudanças na concentração de Ca^{2+} intracelular, aumento no AMP_c , e ativação de vias de sinalização de quinases como AKT, ERK 1/2 (quinase regulada por sinal extracelular 1/2), fosfolipase C (PLC), e proteína de ligação do elemento de resposta ao AMP_c (CREB) (3, 10-14, 19, 21, 25, 27).

Embora tanto eventos de sinalização genômica quanto rápida iniciados por estrógeno tenham sido atribuídos aos receptores clássicos ($\text{ER}\alpha$ e $\text{ER}\beta$) e as ações transcricionais dos ERs clássicos sejam bem definidas, mecanismos pelos quais a sinalização rápida ocorre têm ganhado destaque na literatura corrente. Como já citado, o GPER-1 tem sido apontado como responsável pelas ações rápidas do E2 (14, 21). Este receptor acoplado a proteína G se liga ao E2 com alta afinidade, sendo expresso em células de câncer mamário e em vários tecidos do corpo, incluindo o encéfalo (14, 49, 50).

Apesar da controvérsia existente sobre sua localização celular, já que alguns autores sugerem que o GPER-1 esteja localizado no retículo endoplasmático e não na membrana celular (1, 15, 51, 52) e sem função como receptor de estrógeno (15, 52), enquanto outros sugerem que este receptor está localizado na membrana plasmática, como esperado para um receptor acoplado à proteína G (GPCR) típico (5, 14, 21, 53), ou em trânsito entre a membrana plasmática, citoplasma e compartimento perinuclear (54, 55), é de consenso que a sinalização rápida do E2 é muito importante para a manifestação dos seus efeitos no encéfalo, uma vez que esses sinais modificam a atividade funcional de proteínas (através de fosforilação/desfosforilação), e podem, ainda, modular a expressão gênica independente dos receptores clássicos, ou até mesmo amplificar seus efeitos (56-58).

Todos os mecanismos de ação, em conjunto, podem influenciar, por exemplo, o crescimento celular e a transmissão sináptica. Assim, a interrupção da interação das vias genômica/não-genômica/rápida devido à perda de receptores de E2 e interrupção do ciclo hormonal e/ou desacoplamento do sistema hormônio-receptor associado com a exposição prolongada ao E2 podem contribuir para o declínio dos mecanismos intracelulares da ação do E2 e, conseqüentemente, explicar alguns processos, como por exemplo, as alterações celulares associadas aos déficits ou a maior suscetibilidade de morte celular durante o envelhecimento (59).

1.2.3 Sinalização via GPER-1

Na última década foi mostrado que o estrógeno ativa não somente ER clássicos, mas também receptores de membrana, resultando em sinalização rápida em diversos tipos celulares (60). O GPER-1, é classificado como receptor acoplado à proteína G (GPCR) (Figura 2), e como já descrito, é um receptor com sete domínios transmembrana associado à proteína G estimulatória com síntese de AMP_c através da estimulação da adenilil ciclase (14).

Figura 2. Estrutura esquemática e mecanismo de ação do receptor de estrógeno acoplado à proteína G (GPER-1).

A interação receptor-ligante resulta na dissociação da subunidade $G\alpha$ a partir do complexo $G\alpha\beta\gamma$. A atividade $G\alpha$ -GTPase regula canais iônicos e enzimas associadas a membrana (adenilil ciclase e fosfolipase C, por exemplo) que geram segundos mensageiros clássicos como AMP_c, IP₃ e Ca²⁺. Em contrapartida, o complexo $G\beta\gamma$ pode também agir como efetor que ativa cascatas de sinalização (liberação de cálcio intracelular e ativação de quinases da família Src, por exemplo). Fonte: Filardo e Thomas (14).

Sandén et al. (55) mostraram que tanto o E2 quanto o G1, agonista seletivo GPER-1, além de estimularem a produção de AMP_c, via GPER-1, induziram o recrutamento de β -arrestina 2 para a membrana plasmática e, posteriormente a associação a filamentos intermediários de citoqueratina, sugerindo um mecanismo de redistribuição subcelular do receptor após endocitose. Essas mudanças adaptativas, denominadas de desensibilização, previnem a sinalização excessiva através dos GPCRs, facilitando não somente o desacoplamento do receptor a partir da proteína G, mas também promove o recrutamento de receptores ativados para o interior de vesículas recobertas com clatrina através da interação de arrestina-clatrina (66).

Segundo a literatura, a sinalização através do GPER-1 ocorre via transativação do receptor de EGF e envolve quinases da família Src (61, 62). A estimulação do GPER-1 ativa metaloproteinases e induz a liberação do EGF ligado a heparina, que se liga e ativa o receptor de EGF, conduzindo a ativação de moléculas de sinalização intracelulares, como ERK 1/2 (1, 61, 62). Além disso, a ativação

do GPER-1 estimula a produção de AMP_c (63, 64), mobilização de cálcio intracelular (51, 62, 65) e ativação de PI-3K (51).

Diante do exposto acima, efeitos proliferativos associados ao estrógeno estão intimamente ligados à estimulação da sinalização via EGFR (67). Assim, na sinalização GPER-1/EGFR ocorre rápida fosforilação de ERK1/2, desencadeando resposta genômica ao estrógeno e efeitos proliferativos em células tumorais na ausência de ER clássicos (68).

Em estudos envolvendo pacientes com carcinoma endometrial foi observado que a superexpressão de GPER-1 se correlacionou positivamente com níveis de EGFR. Estes dados são frequentemente observados em subtipos de carcinoma agressivo e foram associados com baixa taxa de sobrevivência (24), o que sugere que o aumento na expressão de GPER-1 pode estar associado à carcinogênese e ao pior prognóstico de pacientes. Por outro lado, Teng et al. (69) mostraram que a estimulação de células uroteliais com G1 inibiu a proliferação celular, em contraste aos efeitos observados com a utilização de 17 β -estradiol. Segundo os autores, a inibição da proliferação pode estar relacionada a sinalização via AP-1 (69).

Assim, talvez o maior papel do GPER-1 no sistema reprodutivo seja promover a sobrevivência celular pelo estrógeno para manutenção homeostática da glândula mamária e esse mesmo mecanismo parece permitir a sobrevivência de células de adenocarcinoma mamário (21). O GPER-1 quando estimulado em células de câncer de mama MCF-7, que expressam ER α e ER β foi anti-proliferativo, porém promoveu proliferação em células de câncer de mama SkBr3, que não expressam esses receptores (70), sugerindo que a função do GPER-1 é dependente do contexto e do ambiente genético da célula.

1.3 Ações do estrógeno no sistema nervoso central

O sistema nervoso é um importante alvo para duas diferentes vias de esteroides, os esteroides hormonais originados nas glândulas periféricas e os neuroesteroides, que são sintetizados diretamente pelas células do sistema nervoso central (SNC). Ambos podem ser incluídos na família de esteroides neuroativos, ou seja, aqueles capazes de regular funções no SNC (71). Dentre eles, inclui-se o E2.

Assim, o E2 mostra-se fundamental para o desenvolvimento e manutenção da integridade funcional do cérebro, porém, diferenças morfológicas, celulares e moleculares existem entre o encéfalo de machos e fêmeas e estas diferenças são evidentes não só para os processos de cognição e memória (como no hipocampo, na amígdala e no córtex) (3, 4, 7, 8, 72), como também para processos de aprendizado, humor e comportamento, neurogênese, modulação da migração celular, crescimento e

proteção neuronal, e plasticidade sináptica (11, 12, 72). Estas diferenças são resultantes do dimorfismo sexual na morfologia, neuroquímica e conexões neuronais manifestadas durante a vida embrionária e logo após o nascimento.

Diferenças notáveis entre os sexos têm sido relatadas acerca de sintomas, prevalência, progressão e severidade de algumas doenças neurodegenerativas. De fato, mulheres pré-menopausa parecem ser menos propensas às doenças de Parkinson e Huntington e quadros de acidentes vasculares cerebrais (AVC) do que homens ou mulheres pós-menopausa (37, 38, 73, 74). Além disso, evidências mostram que tanto o $ER\alpha$ como o $ER\beta$ são suprarregulados em resposta às injúrias cerebrais e/ou biodisponibilidade de E2 (4). O aumento desta biodisponibilidade pode estar associado ao aumento da produção local de E2 em resposta aos diferentes tipos de injúrias cerebrais (4).

Estrógenos também têm sido capazes de modular a intensidade da doença em modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE), o modelo experimental para o estudo de esclerose múltipla (75), consistente com a redução da severidade da doença em mulheres grávidas e piora da doença no período pós-parto (76). Isto pode ser justificado pelos níveis desses hormônios nestas fases, onde, na gestação, observamos níveis elevados (suprafisiológicos) de E2, enquanto que no período pós-parto, estes níveis diminuem consideravelmente.

Adicionalmente, flutuações drásticas nos níveis de E2 têm sido implicadas em risco aumentado de alterações de humor e sintomas depressivos. Segundo Osterlund et al. (77), durante o período de transição entre a pré-menopausa e a pós-menopausa, existe o aumento no risco de aparecimento de desordens afetivas, como de sintomas de depressão, em mulheres sem qualquer sintoma depressivo.

Existem estudos que mostram a produção de E2 especificamente no hipocampo. Prange-Kiel e Rune (78) observaram a presença de marcadores da biossíntese de E2 (StAR, proteína reguladora aguda esteroidogênica, importante para a passagem do colesterol através da mitocôndria, e sua consequente conversão a precursores de esteroides) nesta região, associando esta produção local com a indução da plasticidade sináptica, mostrada através do aumento no número de espinhas dendríticas de neurônios piramidais da região CA1 hipocampal. Ainda, sabe-se que o E2 não apenas protege neurônios em perigo como também promove neurogênese, uma vez que sua suplementação parece estimular a proliferação de células granulares no giro denteado do hipocampo de ratos adultos e a variação da concentração do E2 durante o ciclo estral parece ter o mesmo efeito (79, 80). Além disso, diferentes concentrações de E2 estão associadas ao aumento na diferenciação, sobrevivência e viabilidade celular de neurônios em cultura de diferentes regiões do encéfalo, incluindo neurônios hipotalâmicos (81), da amígdala (82) e neurônios neocorticais (83), além da plasticidade sináptica (84, 85).

Atualmente, parece difícil encontrar uma região do encéfalo que não seja responsiva ao E2 (86). De fato, Harms et al. (87) mostraram um efeito neuroprotetor de E2 contra a indução de morte por apoptose, pela modulação da proteína Bcl-2, com uma forte expressão de ER α em células hipocâmpais *in vitro*. Porém este efeito neuroprotetor não foi observado contra a indução de morte por necrose. Isto sugere que a prevenção de morte neuronal por E2 possivelmente depende da indução de proteínas Bcl-2 e da densidade de receptores ER α na região hipocâmpal. Ainda, a neuroproteção mediada por E2 na indução de morte celular por apoptose também pode ocorrer através da inibição de caspase-3 e calpaína, impedindo também a liberação do fator indutor de apoptose (AIF) pela mitocôndria em culturas de células hipocâmpais (88, 89).

Em outro estudo, Numakawa et al. (35) demonstraram que o estresse oxidativo induzido por H₂O₂ em neurônios corticais *in vitro* foi reduzido após adição de 17 β -estradiol ao meio de cultura, sugerindo ação neuroprotetora através da interação com a via MAPK, envolvida no processo de morte celular por estresse oxidativo.

Diversas observações têm sugerido uma função para os ER do tipo alfa e/ou do tipo beta (90) na neuroproteção mediada por E2. Por exemplo, em uma série de experimentos *in vivo*, observou-se que o tratamento com tamoxifeno (antagonista de ER) diminuiu a eficiência do 17 β -estradiol em promover proteção de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais expostos à MPTP, modelo muito utilizado para estudar doença de Parkinson, sugerindo a participação de receptores ER α e/ou ER β como mediadores deste efeito. Ao mesmo tempo, a utilização de raloxifeno, como modulador seletivo de receptores de estrógeno, preveniu a perda de terminações dopaminérgicas induzida por MPTP no estriado (91). Vale ressaltar que alguns dos antagonistas/inibidores de ER, como o tamoxifeno e o fluvestrano, são descritos como agonistas GPER-1 (1), podendo, estas respostas, estarem associadas a este receptor de estrógeno.

Se por um lado os efeitos neuroprotetores do E2, via ativação dos receptores nucleares clássicos, são bastante estudados, a participação do GPER-1, bem como seus mecanismos de ação, na neuroproteção mediada por E2 são muito pouco explorados. Em um trabalho recente, Blasko et al. (75) mostraram que o tratamento com G1, o agonista do GPER-1, reduziu a severidade das formas ativa e passiva de EAE em camundongos. Ainda, esses autores mostraram que células imunes expressam o GPER-1 e que o tratamento com o G1 diminuiu a produção de citocinas pró-inflamatórias como interferon gama e interleucina-17 nessas células, nos camundongos que desenvolveram EAE, sugerindo não só uma função protetora para o GPER-1 como também um possível alvo efeito imunomodulador (75). Em outro estudo, Harms et al. (87) mostraram que em culturas primárias de córtex, mas não de hipocampo, uma curta exposição (1 hora) ao E2 foi capaz de atenuar a morte neuronal causada por excitotoxicidade ou por hipóxia e que este efeito não foi revertido pelo uso de

tamoxifeno, antagonista dos ER clássicos, sugerindo a participação de receptores não-nucleares nesse efeito.

Em adição ao potencial efeito protetor do E2 em neurônios, há evidências de que o estrógeno pode também ter ações sobre astrócitos e micróglia (3, 4). Células da glia expressam receptores para E2 e esta expressão está aumentada em condições patológicas de dano neuronal (92). Ainda, além das funções clássicas e rápidas descritas para as ações mediadas pelo estrógeno, ações antioxidantes independentes de ER podem reduzir o estresse oxidativo envolvido na ativação glial (93).

De todos os tipos celulares não neuronais do SNC, os astrócitos parecem apresentar o maior potencial para a mediação dos efeitos neuroprotetores do estrógeno. Estes expressam receptores de E2 em uma variedade de regiões do encéfalo. Especificamente, astrócitos hipocâmpais sob condições basais *in vivo* expressam ER β em maior quantidade que ER α , o que dá a estes a possibilidade de mediar, em parte, algumas ações, como regulação da plasticidade sináptica (94). Além disso, astrócitos produzem fatores de crescimento, secretam citocinas e são fundamentais para a captação e metabolismo do glutamato (4). A administração de E2 em astrócitos promove aumento significativo dos níveis de RNA_m e da expressão de proteínas transportadoras de glutamato (95), e aumento na expressão de aquaporina-4, importante para o controle do edema cerebral, em astrócitos parenquimais reativos e processos gliais perivasculares (92). Ainda, o tratamento com E2 *in vivo* apresenta influência na morfologia dos astrócitos em regiões do encéfalo associadas à memória e cognição (96). Garcia-Segura et al. (97) descreveram aumento na atividade da enzima aromatase em astrócitos reativos em áreas cerebrais lesionadas através do tratamento com ácido cáinico ou lesão física, sugerindo a existência de mecanismos fisiológicos para aumentar a concentração de estrógeno local seguido de um dano neuronal.

Já a ação do E2 na micróglia ocorre de forma inversa à hiperativação astrocítica. Este esteroide promove inibição, *in vivo*, da resposta microglial a um insulto, como forma de impedir a reação inflamatória no encéfalo (76). Além disso, o estradiol inibiu a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e outros mediadores inflamatórios em resposta ao lipopolissacarídeo (LPS) e a citocinas pró-inflamatórias em culturas de micróglia (76, 98).

Da mesma maneira, o E2 tem sido apontado como neuroprotetor em várias patologias caracterizadas por forte reação inflamatória, tais como doença de Alzheimer, isquemia e esclerose múltipla, sugerindo que o efeito benéfico do hormônio pode ser dependente da sua atividade anti-inflamatória (38). Liao et al. (99) mostraram que o E2 regula fatores inflamatórios e inibe a migração de células no SNC, assim bloqueando eventos cruciais que sustentam a progressão das doenças neurodegenerativas.

1.4 Neuroproteção estrogênica e isquemia cerebral

Doenças cerebrovasculares, agrupadas dentro das causas circulatórias, são a segunda causa de morte no mundo (5,7 milhões por ano) (100, 101) e se não houver nenhuma intervenção, o número global estimado de óbitos por acidente vascular cerebral (AVC) aumentará para 6,5 milhões em 2015 e para 7,8 milhões em 2030 (102). Entretanto, a distribuição mundial desses eventos é nitidamente desigual, onde 85% desses óbitos são observados em países não desenvolvidos ou em desenvolvimento e um terço atinge pessoas economicamente ativas (103). Sabe-se que, em 2008, os custos totais diretos e indiretos relacionados aos cuidados e perda de produtividade devido às doenças cerebrovasculares nos Estados Unidos foram de 65,5 bilhões de dólares, ressaltando o valor do impacto dessas enfermidades e de necessidades urgentes de saúde pública em melhorar os resultados pós-derrame (104). No Brasil, dados do SUS mostram que os AVCs (isquêmicos e hemorrágicos) representam a maior causa de morte, com cerca de 90 mil casos/ano. Além da elevada mortalidade, o AVC representa a maior causa de incapacitação em adultos, gerando um alto gasto para os sistemas de saúde e prejuízos no setor econômico (105).

O cérebro tem um consumo relativamente elevado de oxigênio e glicose e depende quase que exclusivamente da fosforilação oxidativa para a produção de energia. Evidências mostram que injúrias cerebrais isquêmicas resultam de uma complexa sequência de eventos patológicos que envolvem tempo e espaço. O acidente vascular cerebral resulta de uma redução transitória ou permanente no fluxo sanguíneo cerebral de um território circunvizinho a uma artéria cerebral importante. A redução do fluxo é, na maioria dos casos, causada pela oclusão da artéria cerebral, por um coágulo ou por trombose local, ou estenose grave (106, 107).

Os principais mecanismos patogênicos relacionados ao processo isquêmico incluem acidose, excitotoxicidade por glutamato, despolarização peri-infártica, produção de radicais livres de oxigênio e estresse oxidativo, seguido por inflamação e apoptose (106, 108). O prejuízo do fluxo sanguíneo cerebral restringe a entrega de substratos, em particular, glicose e oxigênio, e prejudica o metabolismo energético necessário para a manutenção do gradiente iônico (108, 109). Com isso, ocorre despolarização neuronal excessiva e prejuízo na recaptação pré-sináptica de aminoácidos excitatórios, causando acúmulo de glutamato no espaço extracelular, que conduz à excitotoxicidade e quebra do balanço osmótico e iônico celular (106). Este quadro leva a inflamação do encéfalo, aumento do infiltrado de células imunológicas periféricas e, conseqüentemente, dano neuronal (107). Radicais livres são produzidos durante a isquemia, podendo aumentar a peroxidação lipídica, induzindo lesões nas membranas celulares e conexões, resultando em morte neuronal. Além disso, podem reduzir a resposta vasoconstritora, conduzindo ao dano vascular a células endoteliais, levando ao aumento da

permeabilidade da barreira hemato-encefálica. Por fim, radicais livres também interferem com e inibem a síntese proteica e causam danos à estrutura do DNA (110).

Diversos trabalhos documentaram que mulheres são mais protegidas contra AVC em relação aos homens – pelo menos até antes da menopausa, quando os níveis de estrógeno (E2) declinam devido à depleção folicular (94, 111-115). Estudos epidemiológicos no Brasil mostram uma maior prevalência de AVC e óbito em decorrência de AVC em mulheres pós-menopausa do que em homens (116), estando esta incidência associada a aspectos como condição socioeconômica, cuidados hospitalares e controle dos fatores de risco, como diabetes, hipertensão, tabagismo e sedentarismo (116).

A isquemia global transitória induz morte celular tardia e seletiva de neurônios piramidais na região CA1 do hipocampo (117) e causa déficits cognitivos em roedores, primatas e humanos (118, 119). Em modelos animais, evidências mostram que o E2 possui características neuroprotetoras diferentes em machos, fêmeas e fêmeas ovariectomizadas submetidos a diferentes modelos de morte neuronal (4, 112, 114, 115, 120-122). Recentemente, o GPER-1 vem ganhando espaço na literatura pertinente no que diz respeito a neuroproteção em modelos de isquemia. Mesmo que ainda controverso, estudos apontam para um aumento na expressão de GPER-1 apenas em camundongos machos na região peri-infártica pós-isquemia (123), mas não em fêmeas intactas ou ovariectomizadas. Porém, a administração de G1, agonista seletivo de GPER-1, mostrou melhora na recuperação funcional e diminuição do volume de infarto em camundongos fêmeas ovariectomizadas (124). Esta regulação sexo-dependente dos efeitos mediados por GPER-1 após isquemia cerebral pode ajudar a explicar os mecanismos do estrógeno no encéfalo, além de fornecer base para o desenvolvimento de terapias específicas para isquemia.

Com isso, está claro que o dano isquêmico é menos severo em fêmeas antes da menopausa (4, 72), o que fortalece o papel neuroprotetor do E2 e a busca por ferramentas para tratamentos em machos. Hu et al. (121) utilizando machos Sprague-Dawley em modelo de lesão da medula espinal, mostraram que o tratamento com E2 preveniu morte celular por apoptose e melhorou a recuperação funcional neste modelo e que, esta proteção foi similar quando utilizado o agonista seletivo do GPER-1, G1, e inibida pela utilização de oligonucleotídeo antisense específico para GPER-1, porém não pelo uso do antagonista seletivo para ER nucleares clássicos (ICI 162,780 ou fulvestranto). Em modelo de lesão traumática do encéfalo, Day et al. (122) mostraram que tanto o tratamento intravenoso com E2 quanto com G1 administrados 1h pós-lesão conferiu proteção em ratos machos adultos, aumentando significativamente a sobrevivência neuronal no hipocampo e diminuindo a degeneração neuronal e morte por apoptose tanto no córtex quanto no hipocampo, com redução da astrogliose. Em contrapartida, Broughton et al. (124) mostraram que o tratamento com G1 piorou a recuperação

funcional e aumentou o volume de infarto em machos pós-isquemia, ao passo que o bloqueio deste receptor foi capaz de melhorar os resultados funcionais bem como reduzir o volume de infarto em macho.

A perda do estrógeno endógeno em fêmeas elimina a proteção conferida a este grupo ante ao dano neuronal induzido por privação de glicose e oxigênio e, por outro lado, a reposição com níveis fisiológicos, parece conferir novamente esta neuroproteção (112, 113, 115, 125, 126). Em experimentos *in vivo*, Lebesgue et al. (127) demonstraram que injeção central do modulador seletivo de receptor de estrógeno (SERM) STX, um composto difenilacrilamida que não se liga ao ER α e ER β , e de G1 forneceram níveis similares de neuroproteção, comparados ao estrógeno natural, quando administrados imediatamente após a isquemia global em ratas ovariectomizadas (com 8 semanas de privação de hormônio). Neste mesmo caminho, em contraste aos achados em camundongos machos, Broughton et al. (124) mostraram que o tratamento com G1 reduziu os déficits neurológicos pós-infarto, bem como o volume do infarto em fêmeas ovariectomizadas, porém sem nenhum efeito benéfico observado em fêmeas intactas.

Em revisão sistemática, Gibson et al. (128) descrevem que a administração de E2, de maneira dependente de dose, foi capaz de reduzir o volume da lesão presente após isquemia transitória ou permanente. Reforçando o papel neuroprotetor do E2 frente a insultos isquêmicos, Yang et al. (129) demonstraram que tanto o pré-tratamento com E2 quanto seu enantiômero (17 α -estradiol) conferiram neuroproteção do córtex cerebral frente à isquemia. Além disso, os autores mostraram que a neuroproteção mediada pelo E2 foi dependente de tempo de administração, em que 0,1 mg/kg de E2 foi capaz de conferir neuroproteção mesmo quando administrado até 3h pós-isquemia e, doses de E2 tão elevadas quanto 0,5 e 1 mg/kg reduziram o volume de infarto mais do que 50% mesmo quando administradas 6h pós-isquemia quando comparados com fêmeas ovariectomizadas.

Diferenças de gênero na sobrevivência neuronal *in vitro* também foram observadas onde células hipocámpais de ratos macho foram mais resistentes sob condições de normoxia, porém mais vulneráveis sob condições de hipóxia do que células de fêmeas (130). Neste estudo, o efeito neuroprotetor do 17 β -estradiol em machos pode estar associado ao aumento na expressão dos receptores ER α /ER β induzido pela hipóxia, observado apenas em células de ratos machos. Em estudos *in vivo*, Broughton et al. (123) mostraram aumento na distribuição de GPER-1 em regiões encefálicas peri-infárticas de camundongos machos, porém não em fêmeas intactas ou ovariectomizadas. Dados preliminares publicados neste mesmo trabalho indicam que a expressão de GPER-1 em encéfalos humanos foram similares aos encontrados em camundongos, podendo ser maior em homens do que em mulheres após AVC (123). Hu et al. (121) também observaram aumento

na expressão de GPER-1 seguido do tratamento com estrógeno ou G1 durante lesão da medula espinal.

Gulinello et al. (126) observaram que níveis de estrógeno próximos aos fisiológicos, quando presentes por um período prolongado tanto antes quanto depois da isquemia, protegeram ratas de déficits induzidos pela isquemia na memória de trabalho visual e espacial. Além disso, dose suprafisiológica de estradiol administrada imediatamente após a indução da isquemia melhorou significativamente os achados apenas para memória visual (126).

In vitro, Harms et al. (87) mostraram que um pré-tratamento longo (20 horas) com 0,1 μ M de 17 β -estradiol não foi efetivo contra os danos neuronais causados por morte celular por exposição ao glutamato ou por privação de glicose/oxigênio. Em contraste a estes resultados, um pré-tratamento curto (1 hora) em concentrações variando de 0,5 a 1 μ M de 17 β -estradiol protegeu contra morte celular em culturas corticais expostas a ambos os modelos, efeito que não foi perdido através do bloqueio de receptores clássicos de estrógeno (87). Estes achados reforçam o envolvimento de receptores de E2 na membrana plasmática como mediadores desta neuroproteção conferida por 17 β -estradiol.

Estudos acerca dos mecanismos moleculares são importantes para o entendimento das melhorias funcionais e cognitivas induzidas por E2. Alguns estudos *in vitro* têm mostrado que o pré-tratamento e a expressão gênica aumentada são necessários para se observar os efeitos neuroprotetores do E2 na isquemia cerebral (117, 131, 132). Por outro lado, outros estudos conferem neuroproteção mediada por E2 via sinalização rápida mediada por receptores de membrana (9, 87, 125, 127, 133).

Liu et al. (133) mostraram em cultura de neurônios corticais que tanto o tratamento com E2 quanto com G1 por 45 minutos atenuaram a excitotoxicidade induzida por exposição a NMDA e que esta neuroproteção foi dependente de ativação de ERK 1/2 e independente de transcrição. Neste mesmo trabalho, os autores mostraram que a infusão de G1 imediatamente após o início da reperusão impediu as lesões induzidas pelo processo de reperusão pós-isquemia em modelo de oclusão da artéria cerebral média em camundongos fêmeas e, mais uma vez, a sinalização através de ERK 1/2 estava envolvida.

Em outra vertente, o dano neuronal isquêmico regional ou total foi reportado ser maior em camundongos fêmeas ArKO (*knockout* para a enzima aromatase) quando comparado com camundongos fêmeas tipo selvagem ovariectomizadas ou intactas (4), sugerindo que a produção de estrógeno local desempenha um papel crítico contra isquemia em fêmeas. A reposição com níveis fisiológicos de E2 revertem a vulnerabilidade de fêmeas ArKO ao dano neuronal induzido por isquemia (4).

Atualmente, dois pontos são considerados cruciais para o tratamento de AVC: (a) a janela limitada de tempo para intervenção terapêutica que resulte em redução dos efeitos deletérios decorrentes do processo isquêmico devido à rápida progressão das lesões (janela temporal de aproximadamente 3-4 horas) e, (b) a ausência de estratégias terapêuticas que atuem, de fato, no cerne da lesão, atenuando ou mesmo impedindo morte neuronal.

Neste cenário onde estratégias terapêuticas alternativas direcionadas à lesão em curtos períodos de tempo e o efeito do estrógeno como agente neuroprotetor é evidente, entendemos que a modulação da expressão e sinalização do GPER-1, pode representar uma ferramenta importante para a terapia em pacientes em que a farmacoterapia com estrógeno é inapropriada, além de minimizar os efeitos sistêmicos deste hormônio.

2 OBJETIVO

2.1 Geral

- Avaliar a participação do GPER-1 na neuroproteção exercida pelo estrógeno em modelo *in vitro* de morte neuronal induzida por privação de glicose/oxigênio.

2.2 Específicos

- Identificar qual a localização deste receptor em células derivadas de córtex frontal através de imunofluorescência de dupla marcação;

- Avaliar a participação do GPER-1 na neuroproteção mediada pela sinalização estrogênica em modelo *in vitro* de morte celular induzida por privação de glicose/oxigênio;

- Avaliar o *cross-talk* entre o GPER-1 e o receptor de fator de crescimento epidermal (EGF) e receptor de fator de crescimento neural (NGF) na neuroproteção mediada pela sinalização estrogênica em modelo *in vitro* de morte celular induzida por privação de glicose/oxigênio.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratas neonatas da linhagem Wistar, entre 1 e 4 dias de idade (P1-P4), provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP). Os procedimentos experimentais seguiram todas as exigências descritas no Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade de São Paulo (certificado em anexo).

3.2 Culturas primárias mistas (neurônios/células da glia) e enriquecidas de neurônios corticais

Neste projeto usamos cultura primária de córtex frontal de ratas neonatas como modelo experimental. A escolha desta área é importante uma vez que ela faz parte de redes neuronais que fazem conexões com várias áreas do SNC (hipocampo, amígdala, hipotálamo), as quais estão associadas à modulação de uma série de funções importantes, tais como: memória, processamento de informação, alterações do humor, apetite e sono.

As culturas primárias de tecido cortical foram preparadas a partir do protocolo descrito por Ahlemeyer e Baumgart-Vogt (134), com algumas modificações. Os animais foram eutanasiados por decapitação, seguido de microdissecção do córtex frontal em tampão Hanks (160 mM de NaCl; 5,3 mM de KCl; 0,44 mM de KH_2PO_4 ; 0,33 mM de Na_2HPO_4 ; 4 mM de NaHCO_3 ; 5,5 mM de glicose acrescido de 1% de penicilina/estreptomicina e 0,1% de fungizona) estéril e gelado. O córtex frontal isolado foi incubado por cerca de 10 minutos a 37 °C em solução de tripsina/EDTA a 0,05% (Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) e DNase a 0,001% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em tampão Hanks, para digestão enzimática e depois transferido para o meio de cultura (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Gibco-Invitrogen) contendo antibióticos (penicilina/estreptomicina, Gibco-Invitrogen) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco-Invitrogen), 10% de soro de cavalo (SC, Gibco-Invitrogen) e 2 mM de glutamina (Amresco, Solon, OH, EUA) e gentilmente triturado mecanicamente com o auxílio de pipeta Pasteur. As células contidas no sobrenadante foram filtradas em membrana de 70 μm e plaqueadas em placas de cultura multipoços cobertas por poli-L-lisina e mantidas a 37 °C com 5% CO_2 em atmosfera umidificada (umidade relativa do ar de 80%) na incubadora. A fim de assegurar maior uniformidade na densidade de células por poço, foi realizada a contagem do número de células antes do plaqueamento, utilizando-se o método de exclusão por Azul Tripán e a densidade celular foi determinada conforme cada tipo de experimento descrito a seguir.

Culturas mistas de neurônios/células gliais foram mantidas em DMEM suplementado com SFB e SC, ambos a 10%. Para manutenção deste tipo de cultura o meio foi trocado por meio fresco no 2º e 5º dia, sendo, neste último, substituído por DMEM sem fenol acrescido de 10% de SFB tratado com carvão ativado (Fetal Bovine Serum Charcoal Stripped, Sigma-Aldrich). O uso deste soro fetal bovino livre de hormônios foi para excluir qualquer influência de hormônios contidos no soro fetal bovino normal sobre o nosso modelo e para que garantíssemos que qualquer efeito observado, fosse derivado do tratamento com 17 β -estradiol ou G1. Para as culturas enriquecidas de neurônios, após 24 horas do plaqueamento, o meio de cultura foi substituído por meio DMEM suplementado com antibióticos, 2 mM de glutamina e 2% de suplemento B27 (Gibco-Invitrogen), um suplemento que favorece o crescimento de neurônios em detrimento de células da glia. Para manutenção deste fenótipo, no quinto dia *in vitro* o meio foi substituído por meio fresco (DMEM sem fenol + 2% B27). No 8º dia *in vitro*, ambos os fenótipos de cultura foram submetidos aos nossos protocolos de tratamento descritos a seguir.

3.3 Imunofluorescência

Para caracterização fenotípica das culturas e localização do GPER-1, as células corticais foram plaqueadas em densidade aproximada de $2,0 \times 10^4$ células/mL em placas 24-well contendo lamínulas de borosilicato com 13 mm de diâmetro recobertas com poli-L-lisina, onde foi realizado ensaio de imunofluorescência conforme descrito por Piccioli et al. (135), com modificações.

Os neurônios corticais frontais foram marcados com o anticorpo contra proteína associada à microtúbulos 2 (anti-MAP2, 1:500, Sigma-Aldrich). Os astrócitos foram marcados contra a proteína ácida fibrilar glial, uma proteína do filamento intermediário restrita aos astrócitos, com o anticorpo anti-GFAP (1:1.000, Sigma-Aldrich). A micróglia foi marcada através do anticorpo contra molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizado 1 (anti-IBA-1, 1:1.000, Abcam, Cambridge, MA, EUA) ou com lectina de tomate (Lectin from *Lycopersicon esculentum* (tomato)-FITC conjugated, 1:2.000, Sigma-Aldrich). Ainda, foram utilizados anticorpos específicos para o receptor GPER-1 (1:1.000, Rheabiotech, Campinas, SP, Brasil) e contra pan-caderina (1:500, Santa Cruz, Dallas, TX, EUA).

No oitavo dia *in vitro*, tanto culturas primárias não destinadas à caracterização fenotípica foram tratadas com E2 (10 nM) ou G1 (10 nM) por 5, 15, 30, 60 e 180 minutos para que pudéssemos localizar e acompanhar o trânsito do GPER-1 frente ao estímulo fisiológico, com E2, e direcionado, através do G1, em diferentes períodos de tempo.

Após os tratamentos, as células corticais foram lavadas com PBS (135 mM de NaCl; 1,3 mM de KCl; 0,5 mM de KH₂PO₄; 3,2 mM de Na₂HPO₄) e então fixadas com formaldeído 4% ou metanol

100% por 20 minutos à temperatura ambiente. Após sucessivas lavagens com PBS, as mesmas foram incubadas com 40 mM de glicina-PBS por 5 minutos, e novamente lavadas com PBS. A seguir, as células foram incubadas com soro de bloqueio (5% de soro de jumento + 0,05% de Triton X-100 em PBS) durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram incubadas com anticorpo primário (MAP2, GFAP, IBA1, lectin-FITC, GPER-1 ou pan-caderina) diluído em soro de bloqueio e deixadas *overnight* sob agitação mínima a 4 °C ao abrigo da luz. No dia seguinte, as células foram lavadas com PBS (3 vezes por 10 minutos com PBS) e incubadas por 2 hora à temperatura ambiente e ao abrigo da luz com anticorpo secundário (AlexaFluor 594; AlexaFluor 488; 1:2.000, Gibco-Invitrogen) diluído em PBS + 0,05% Triton X-100. Finalmente, as lamínulas contendo as células foram incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente com DAPI (Sigma-Aldrich) (1:100.000, diluído em PBS + 0,05% de Triton X-100), lavadas novamente com PBS, montadas em lâmina com Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, AL, EUA) e seladas com esmalte.

As células foram observadas com auxílio de 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 fotografados trinta campos visuais em três culturas diferentes para amostragem e contados com auxílio do programa ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, NIH, MD, USA).

A porcentagem de cada tipo celular (neurônios, astrócitos e micróglia) foi calculada pela razão entre a média do número de células positivas para seus respectivos anticorpos e a média do número total de núcleos celulares, marcados com DAPI dos trinta campos visuais contados provenientes de três culturas diferentes. Para a localização do GPER-1, foi feita a co-localização desta proteína com proteínas específicas de cada tipo celular que compõe a membrana celular e/ou o citoesqueleto das células.

3.4 Tratamento das culturas primárias corticais

3.4.1 Modelo de isquemia por privação de glicose/oxigênio

Como modelo de isquemia, utilizamos o método de privação de glicose/oxigênio (PGO), que induz morte neuronal tanto por apoptose (pela ativação de cascatas de sinalização e consequentemente alterações mitocondriais e ativação de caspase-3) como por necrose. Nestes experimentos, as culturas celulares continham uma densidade de $5,0 \times 10^4$ células/poço em placas 48-

well recobertas com poli-L-lisina e submetidas aos procedimentos experimentais no 8º dia *in vitro*. Estas condições foram seguidas para todos os experimentos de PGO seguintes.

Para induzir o modelo de PGO, as culturas foram incubadas com solução de Earle livre de glicose (143 mM de NaCl; 5,4 mM de KCl; 1 mM de MgSO₄; 1 mM de NaH₂PO₄; 1,8 mM de CaCl₂; 2,4 mM de NaHCO₃] acrescido de ditionito de sódio (Na₂O₄S₂, 0,5 mmol/L), um reagente desoxigenante para privação de oxigênio (136), seladas com filme plástico autoadesivo e mantidas em incubadora a 37 °C por 15, 30 e 60 minutos. Poços-controles foram incubados com meio de cultura, visto que não houve diferença entre células incubadas com meio de cultura e solução de Earle contendo 20 mM de glicose (dados não mostrados). Após o término da PGO, culturas mista e enriquecidas de neurônios foram reperfundidas com meio fresco (DMEM + 5% de SFB tratado com carvão ativado ou DMEM + 2% B27, respectivamente) por até 24 horas e a viabilidade celular foi mensurada através da quantificação da liberação de lactato desidrogenase (LDH) pelo kit CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, Madison, WI, EUA) conforme instruções do fabricante, em vários períodos (imediatamente após a privação, 3, 8 e 24 horas). A coleta do imediatamente após a privação foi considerada tempo 0h de reperfusão e foi realizada com o meio de PGO, para não se perder LDH liberada durante o período de privação.

3.4.2 Tratamento com 17 β -estradiol, G1 (agonista do receptor GPER-1) e G15 (antagonista do receptor GPER-1)

Para avaliarmos os possíveis efeitos neuroprotetores do E2 via receptores não-nucleares GPER-1 neste modelo experimental e verificarmos a influência que o mesmo possui nesta função, as culturas primárias foram tratadas com 17 β -estradiol (E2, Sigma-Aldrich), G1 (agonista GPER-1, Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido) ou G15 (antagonista GPER-1, Santa Cruz) após 8 dias *in vitro*. Foram realizados experimentos de curva concentração- e tempo-resposta para o 17 β -estradiol e para o agonista GPER-1, G1, em que as culturas primárias foram tratadas com veículo (etanol ou dimetilsulfóxido (DMSO), 0,001% v/v) ou 17 β -estradiol (1, 10 e 100 nM, e 1 e 10 μ M) e G1 (10 e 100 pM, 1, 10 e 100 nM) por 5, 10, 15 e 30 minutos e 24 horas e avaliado os possíveis efeitos do E2 e G1 sob nossas condições experimentais (curva dependente de concentração e de tempo de exposição). Após curvas-controle de concentração- e tempo-resposta, as concentrações selecionadas foram 10 nM de E2 e 10 nM de G1. Para o antagonista G15, selecionamos uma concentração cinco vezes maior que a do agonista, 50 nM, baseados em experimentos pilotos (dados não mostrados). Estas concentrações de E2, G1 e G15 foram utilizadas em todos os experimentos a seguir.

Em função dos experimentos iniciais de padronização do modelo de privação de glicose/oxigênio, decidimos investigar quais efeitos seriam observados se os tratamentos farmacológicos fossem administrados em diferentes momentos frente ao insulto isquêmico. Dessa maneira, escolhemos, a partir das curvas de PGO realizadas, o tempo de privação e de reperfusão que não promovesse morte celular acima de 30% (15 minutos de PGO seguido de 3 horas de reperfusão para ambos os fenótipos de cultura), cujo efeito de morte celular pudesse ser prevenida ou atenuada pelos tratamentos farmacológicos. Para tanto, empregamos quatro paradigmas diferentes de intervenção farmacológica.

Assim, as culturas primárias foram compostas pelos seguintes grupos: (1) controle (tratado com veículo, DMSO (0,001% v/v)); (2) E2 (10 nM); (3) G1 (10 nM); (4) G15 (50 nM); (5) G15+E2; (6) PGO; (7) PGO+E2; (8) PGO+G1; (9) PGO+G15; e (10) PGO+G15+E2. E os paradigmas empregados foram: (1) PGO seguido de 3h de reperfusão com os tratamentos farmacológicos; (2) PGO seguido de reperfusão com 15 minutos de tratamento farmacológico e 2h45 com meio fresco; (3) tratamento farmacológico concomitante à PGO seguido de 3h de reperfusão com os tratamentos farmacológicos; e (4) tratamento farmacológico concomitante à PGO seguido de reperfusão com 15 minutos de tratamento farmacológico e 2h45 com meio fresco (Figura 3). Vale salientar que para melhor antagonismo do receptor GPER-1, a adição de G15 nos paradigmas 1 e 2 foi feita ao sistema juntamente à PGO e mantida conforme o tratamento farmacológico, totalizando exposição de 3h15 para o paradigma 1 e de 30 minutos para o paradigma 2, enquanto que para os paradigmas 3 e 4, o tratamento com G15 foi realizado 15 minutos previamente à PGO, totalizando exposição de 3h30 para o paradigma 3 e de 45 minutos para o paradigma 4.

Figura 3. Modelo esquemático para os quatro paradigmas testados.

3.4.3 Tratamento com inibidor de tirosina quinase seletivo para o receptor de EGF e NGF

Para avaliarmos a interação da sinalização via GPER-1 com os receptores de fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento neural (NGF) nos efeitos rápidos do E2, as células foram tratadas com AG1478 (Sigma-Aldrich), um inibidor de tirosina quinase seletivo para o receptor de

EGF (AG1478), na concentração de 10 μ M (137) ou veículo (DMSO) concomitante ao tratamento com E2 ou G1. De maneira similar, as culturas também foram tratadas com K252a (Sigma-Aldrich), um inibidor dose dependente do receptor de NGF, na concentração de 100 nM (138) ou veículo (DMSO) concomitante ao tratamento com E2 ou G1.

3.5 Culturas de astrócitos (linhagem C6 de glioma de rato)

Experimentos complementares aos realizados com culturas primárias foram necessários para investigarmos o papel de astrócitos na possível neuroproteção mediada pelo GPER-1. Para isto, utilizamos culturas de células da linhagem C6 de glioma de rato.

As células foram descongeladas em garrafa de cultura com 175 cm² de área em meio DMEM/F2 (Gibco-Invitrogen) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB) e 0,2% de penicilina/estreptomicina. No dia seguinte, o meio foi trocado por meio fresco para a retirada do dimetilsulfóxido (DMSO) presente no meio de congelamento. Após 2-3 dias de crescimento, as células foram tripsinizadas e transferidas para: (1) placa de cultura 48-well com densidade de 5 x 10⁴ células por poço para experimentos de privação de glicose/oxigênio e, (2) placa de cultura 24-well com densidade de 2 x 10⁴ células por poço para experimentos de imunofluorescência, em meio DMEM/F12 sem fenol suplementado com 5% de soro fetal bovino tratado com carvão ativado. No dia seguinte ao plaqueamento, as células foram submetidas à PGO e reperfundidas com DMEM/F12 + 2% SFB tratado com carvão ativado, e/ou tratadas com E2 ou G1, conforme descrito anteriormente em experimentos que respondessem as questões relacionadas a neuroproteção e localização celular do GPER-1.

3.6 Viabilidade celular

A viabilidade celular na PGO foi avaliada utilizando-se o kit CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega), seguindo-se as recomendações do fabricante. Este ensaio colorimétrico permite a quantificação de morte/lise celular, baseado na mensuração da atividade da lactato desidrogenase (LDH) liberada do citosol de células com a membrana danificada para o meio de cultura, através da conversão do substrato (lactato) em piruvato na presença de NAD⁺. A absorbância resultante dos nossos experimentos foi interpretada como morte celular.

O ensaio de viabilidade celular após a PGO e tratamentos farmacológicos foi realizado através do ensaio colorimétrico do MTT (139). O método é baseado na adição de solução de MTT (3-(4,5-cimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromide, 5 mg/ml) (Sigma-Aldrich) ao meio de cultura, 2-4 horas antes da leitura, para subsequente clivagem do sal de tetrazolium (cor amarelo) em cristais de

formazan (coloração púrpura), por células metabolicamente ativas. Os cristais de formazan do MTT foram solubilizados pela adição de 300 μ L de álcool isopropílico e quantificados por espectrofotometria no comprimento de onda de 570 nm. A absorbância resultante dos nossos experimentos representou a redução da atividade metabólica total, interpretada como redução no número de células viáveis ou vivas.

Para a análise de absorbância foi utilizado o equipamento Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek, Winooski, VT, USA). Cada condição experimental foi apresentada, no mínimo, em quadriplicatas de poços para cada experimento, resultante de 4 a 6 experimentos independentes. A viabilidade celular foi calculada como percentagem dos poços-controles (MTT) ou poços totalmente lisados (LDH) e os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

3.7 Análise de resultados

Nos experimentos de curva de padronização de privação de glicose/oxigênio as diferenças entre os grupos experimentais foram detectadas através de análise de variância (ANOVA) de dois critérios, seguido de pós-teste Bonferroni. As diferenças entre os grupos experimentais e os grupos controles nos ensaios de neuroproteção foram detectadas por ANOVA de um critério seguido de pós-teste Tukey. As diferenças entre os mesmos grupos experimentais de fenótipos de culturas diferentes foram analisadas pelo teste *t Student*. Em toda a estatística foram adotados valores para $p < 0,05$ como estatisticamente significativos. Todas as análises foram realizadas no programa GraphPad Prism, versão 6.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização das culturas celulares e expressão do GPER-1

4.1.1 Composição celular de culturas primárias mistas neurônios/células da glia e enriquecidas de neurônios derivadas de córtex frontal de ratas neonatas

Utilizando protocolo descrito anteriormente, as culturas mistas neurônios/células da glia derivadas de córtex frontal foram compostas fenotipicamente por $6,2 \pm 0,44\%$ de neurônios, $22,65 \pm 0,91\%$ de micróglia e $72,6 \pm 5,63\%$ de astrócitos. Nas culturas doravante denominadas enriquecidas de neurônios, a população celular apresentava $75,47 \pm 2,79\%$ de células imunorreativas para MAP-2 (neurônios), $8,04 \pm 0,51\%$ para IBA-1 (micróglia) e $15,77 \pm 0,43\%$ para GFAP (astrócitos) (Figura 4, 5 e 6).

Figura 4. Composição fenotípica das culturas primárias mistas e enriquecidas de neurônios derivadas de córtex frontal.

Resultados expressos em número de células imunorreativas (% do total marcado com DAPI) $\pm$ média erro padrão. **p < 0,01, comparação dos marcadores entre os fenótipos de culturas (teste *t Student*).

Figura 5. Fotomicrografias ilustrando o padrão fenotípico de culturas primárias.

Culturas primárias mistas neurônios/células da glia (A, C e E) e culturas primárias enriquecidas de neurônios (B, D e F) derivadas de córtex frontal de ratas neonatas Wistar. Padrão de marcação imunofluorescente com anticorpos anti-MAP2 (A e B, vermelho), anti-GFAP (A e B, verde; E e F, vermelho), anti-IBA-1 (C e D, vermelho) e anti-lectina (E e F, verde), além da fluorescência marcada por DAPI (azul). As setas indicam neurônios (A, E e F). Escala = 100 μ m.

Figura 6. Fotomicrografias ilustrando a interação astrócitos-neurônios provenientes de culturas primárias.

Culturas primárias mistas neurônios/células da glia (A) e culturas primárias enriquecidas de neurônios (B) derivadas de córtex frontal de ratas neonatas Wistar. Padrão de marcação imunofluorescente com anticorpos anti-MAP2 (vermelho), anti-GFAP (verde). Escala = 100 µm.

4.1.2 Expressão do GPER-1 nas células primárias corticais em cultura

Para confirmar que as células corticais em cultura expressam o GPER-1, realizamos ensaios de imunofluorescência para este receptor. Na figura 7, podemos observar que as células corticais em cultura expressam o receptor GPER-1, com grande parte desta marcação localizada na membrana, embora haja marcação nuclear e perinuclear para este receptor. A especificidade do anticorpo foi comprovada pelo bloqueio da marcação na presença do peptídeo bloqueador (dados não mostrados). Dessa maneira, mostramos que o modelo escolhido é um bom modelo para a caracterização deste receptor e suas funções no córtex cerebral de ratos.

Figura 7. Fotomicrografias ilustrando a expressão do GPER-1.

Receptor GPER-1 (verde), além da fluorescência marcada por DAPI (azul) em culturas primárias mistas (A) e enriquecidas de neurônios (B) derivadas de córtex frontal de ratas neonatos. Escala = 100 µm.

4.2 Curva de concentração e tempo de exposição ao E2 e ao G1 em culturas primárias derivadas de córtex frontal

Após a caracterização de nossas culturas e confirmação da expressão do GPER-1 em culturas primárias derivadas de córtex frontal, realizamos experimentos de curva de concentração e tempo resposta tanto para o E2 (1 nM até 10 μ M) quanto para o G1 (1 pM a 100 nM) a fim de investigar se o agonista natural e/ou sintético do GPER-1 promoveriam proliferação ou toxicidade celular em nosso modelo.

Assim, concentração de E2 maior ou igual a 100 nM em culturas mistas (Figura 8A) e mesmo tão pequenas quanto 1 nM em culturas enriquecidas de neurônios (Figura 8B) foram capazes de promover aumento de viabilidade celular apenas quando expostas por 24 horas a este hormônio, mostrando um padrão dependente de concentração. Por outro lado, concentrações pequenas de G1, 10 pM, foram capazes de promover aumento na viabilidade de neurônios em cultura quando expostos por 24 horas ao agonista do GPER-1. De maneira inesperada, 100 nM de G1 foi capaz de aumentar a viabilidade tanto em culturas mistas (a partir de 10 minutos – Figura 8C) quanto em culturas enriquecidas de neurônios (desde o menor tempo testado, 5 minutos – Figura 8D). Entendemos que a ocorrência de proliferação celular em culturas que não sejam derivadas de tumores em períodos de tempo tão curtos é não é factível e que ensaios de viabilidade celular baseados na função mitocondrial podem ser interpretados como aumento de metabolismo celular, sugerimos que os valores observados em curtos períodos de exposição ao G1 em nossas culturas seja aumento de metabolismo celular e não proliferação celular.

Figura 8. Curva de concentração e tempo resposta para o E2 e G1 em culturas primárias mistas e enriquecidas de neurônios.

(A) culturas primárias mistas e (B) enriquecidas de neurônios expostas ao E2. (C) culturas primárias mistas e (D) enriquecidas de neurônios expostas ao G1. Os dados mostrados são expressos como porcentagem do grupo controle (considerados como 100% de viabilidade celular, ilustrado no gráfico pela linha pontilhada) $\pm$ erro padrão da média, a partir de 4 experimentos independentes. *p < 0,05 e **p < 0,01 em relação ao grupo controle (ANOVA um critério, seguido de pós-teste Tukey).

4.3 Trânsito do GPER-1 da membrana plasmática para o núcleo

Diante das controvérsias sobre a localização deste receptor, em que já foi postulado que o mesmo poderia se localizar no retículo endoplasmático, na membrana celular e em trânsito entre a membrana plasmática e o núcleo, buscamos investigar a localização subcelular do GPER-1 e como ele se comportaria em nossas culturas primárias frente à estímulos com E2 ou G1 em diferentes tempos de exposição.

No oitavo dia *in vitro*, culturas primárias mistas e enriquecidas de neurônios foram tratadas com E2 ou G1, ambos na concentração de 10 nM por diferentes tempos de exposição (5, 10, 15 e 30 minutos). Como já mostrado anteriormente, culturas de células corticais expressam GPER-1 e este receptor mostra-se disperso tanto no citoplasma quanto na região perinuclear destas células na ausência do ligante. Com 10 minutos de exposição ao E2, a localização perinuclear do GPER-1 encontra-se diminuída e observamos aumento da marcação de GPER-1 no citosol. Em 15 minutos, o receptor tem tendência de se concentrar no citoplasma e na membrana plasmática, sugerindo que o compartimento perinuclear provavelmente não é o destino final do GPER-1 e, após 30 minutos de exposição ao E2, o GPER-1 mostra-se novamente disperso no citosol, região perinuclear e nuclear (Figura 9). Quando estas culturas foram estimuladas com G1, o tráfego intracelular do GPER-1 aconteceu precocemente quando comparado à exposição frente ao E2, ocorrendo desde os 5 minutos de exposição (Figura 9 e 10).

Figura 9. Fotomicrografias mostrando o trânsito do GPER-1 em culturas primárias de córtex frontal.

Receptor GPER-1 (vermelho), além da fluorescência marcada por DAPI (azul) em culturas primárias mistas (colunas da esquerda) e enriquecidas de neurônios (colunas da direita). Escala de 100 μm .

Figura 10. Imagem de microscopia de fluorescência da expressão do GPER-1.

Co-localização do receptor GPER-1 (verde), com a membrana plasmática (pan-caderina, vermelho), além da fluorescência marcada por DAPI (azul) em culturas primárias mistas derivadas de córtex frontal estimuladas por 5 minutos com G1. Magnificação de 100x.

Para entender melhor o tráfego intracelular deste receptor, repetimos estes experimentos de estimulação com E2 ou G1 em cultura de células da linhagem C6 de glioma de rato. Esta linhagem possui $\leq 99\%$ de células positivas para GFAP, que é um marcador de subunidade dos filamentos intermediários do citoesqueleto celular presente em astrócitos. Assim, culturas de células C6 foram estimuladas com E2 ou G1 por 5, 15, 30, 60 e 180 minutos.

Nestas células, a localização do GPER é semelhante ao observado em células primárias, estando este receptor localizado por toda células, desde a membrana até o núcleo. Em relação ao trânsito do receptor, este mais uma vez comporta-se de maneira similar ao observado em culturas primárias derivadas de córtex frontal, onde em 5 minutos de exposição ao E2, a marcação para o GPER-1 encontra-se dispersa no citoplasma e na região perinuclear. Aos 15 minutos de exposição, grande parte da marcação para GPER-1 encontra-se na região nuclear e perinuclear. Com 30, 60 e 180 minutos notamos que a marcação para o receptor encontra-se dispersa em toda a célula, sugerindo ativação cíclica deste receptor durante todo o período de estimulação. Quando estas células foram estimuladas com G1, o trânsito do receptor se deu de forma mais rápida, com grande parte da marcação na região nuclear e perinuclear aos 5 minutos (Figura 11).

Figura 11. Fotomicrografias mostrando o trânsito do GPER-1 em culturas de células da linhagem C6 de glioma de rato.

Co-localização e trânsito do receptor GPER-1 (vermelho), com a marcação da proteína ácido fibrilar glial (GFAP, verde), além da fluorescência marcada por DAPI (azul) em culturas de células da linhagem C6 de glioma de rato. (A e B) controle, (C e D) 5 minutos, (E e F) 15 minutos, (G e H) 30 minutos, (I e J) 60 minutos e (K e L) 180 minutos de estimulação por E2 (coluna da esquerda) ou G1 (coluna da direita). Escala de 100 μ m.

4.4 Efeitos do 17 β -estradiol, G1 e G15 em cultura primárias frontocorticais submetidas ao modelo de isquemia por privação de glicose/oxigênio

4.4.1 Modelo de isquemia por privação de glicose/oxigênio

Como modelo de isquemia *in vitro*, utilizamos o método de privação de glicose/oxigênio (PGO), que induz morte neuronal tanto por apoptose como por necrose, seguido de reperfusão. Em nossos experimentos, a perda de viabilidade foi interpretada como morte celular.

Nestes experimentos, ambos os fenótipos de culturas foram expostos a PGO por 15, 30 e 60 minutos e reperfundidos por até 24 horas, porém apenas nas culturas enriquecidas de neurônios observamos morte celular imediatamente após a PGO quando comparadas ao controle (5,61%, 13,41%, 11,51% e 11,56%, para controle, PGO 15 min, PGO 30 min e PGO 60 min, respectivamente). Durante a reperfusão, em culturas mistas, houve aumento de morte celular logo no primeiro tempo de reperfusão observado (3 h) para todos os três tempos de PGO (19,09%, 19,23% e 22,25%, para 15, 30 e 60 minutos de PGO, respectivamente), atingindo máximo de 21,19%, 22,99% e 24,59% para 15, 30 e 60 minutos de PGO seguido de 24 h de reperfusão, respectivamente (Figura 12A). Por outro lado, em culturas enriquecidas de neurônios, mais suscetíveis à PGO ($p < 0,001$, teste *t Student*), observamos valores máximos de morte celular em 24 h de reperfusão (36,54%, 39,22% e 35,86%, para 15, 30 e 60 minutos de PGO, respectivamente) (Figura 12B). Mostramos que, em nosso modelo experimental de PGO, os padrões de morte celular são dependentes do tempo de reperfusão.

Figura 12. Efeito do curso temporal de morte celular em culturas primárias frontocorticais submetidas à modelo de isquemia induzida por privação de glicose/oxigênio.

Neste modelo induzimos PGO de 15 a 60 minutos em (A) culturas mistas neurônios/células da glia e (B) enriquecida de neurônios derivadas de córtex frontal de ratas neonatas Wistar. Os dados mostrados são expressos como porcentagem do grupo controle de lise total (considerados como 100% de morte celular) $\pm$ erro padrão da média, a partir de 5 experimentos independentes. *** $p < 0,01$ em relação ao controle (ANOVA dois critério, seguido de pós-teste Bonferroni).

4.4.2 Efeitos do 17β -estradiol, G1 e G15 em culturas primárias frontocorticais submetidas a privação de glicose/oxigênio

Após demonstrar que nosso modelo é viável, nós objetivamos avaliar possíveis efeitos neuroprotetores via receptores de estrógeno, mais especificamente via GPER-1, ante ao insulto isquêmico de hipoglicemia/hipóxia. Em função disso, utilizamos tratamentos farmacológicos (E2, G1 e G15) em diferentes momentos de privação, como já descrito na seção de métodos.

Para todos os experimentos a seguir, escolhemos o modelo de privação de glicose/oxigênio por 15 minutos seguidos de 3 horas de reperfusão, descrito acima. Logo, em culturas mistas obtivemos

um percentual de morte celular de 19,1% ($\pm 1,4\%$), ao passo que em culturas enriquecidas de neurônios esse valor foi de 24,05% ($\pm 0,6\%$) (Figura 12A e B).

O primeiro paradigma testado foi utilizar os tratamentos farmacológicos com E2, G1 ou G15 durante a reperusão. Dessa maneira, privamos nossas culturas por 15 minutos e em seguida as reperfundimos por 3 horas com meio fresco acrescido dos tratamentos farmacológicos e associações. Neste modelo, a PGO reduziu a viabilidade celular para 90,8% e nenhum tratamento foi capaz de atenuar este efeito (Figura 13A). Culturas enriquecidas de neurônios foram mais sensíveis à PGO (75,8%, $p < 0,001$; teste t *Student*, quando comparado ao grupo PGO de culturas mistas), destacando-se que o tratamento isolado com G15 (PGO+G15) potencializou o efeito observado na viabilidade celular frente ao estímulo isolado da privação (75,87% PGO contra 62,42% PGO+G15) (Figura 13B).

Figura 13. Efeitos da administração do E2, G1 e G15 por 3 horas (paradigma 1), após 15 minutos de privação de glicose/oxigênio em culturas primárias derivadas de córtex frontal.

(A) culturas mistas e (B) culturas enriquecidas de neurônios. Os dados mostrados são expressos como percentagem do grupo controle (considerados como 100% de viabilidade celular) $\pm$ erro padrão da média, a partir de 5 experimentos independentes. ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ em relação ao grupo pareado; && $p < 0,01$ em relação ao grupo PGO (ANOVA um critério, seguido de pós-teste Tukey).

A partir deste primeiro ensaio, investigamos se a rápida ativação da via estrogênica, mais precisamente via GPER-1, resultaria em neuroproteção neste modelo de isquemia. Dessa forma, submetemos as culturas à PGO seguida de reperusão sendo os 15 minutos primeiros minutos na presença dos tratamentos farmacológicos e o restante (2 horas e 45 minutos) da reperusão com meio fresco apenas. Neste segundo paradigma, culturas mistas apresentaram redução nos grupos E2 (89,3%), G1 (87,6%) e G15+E2 (83,3%) em comparação ao grupo controle, ao passo que, nos grupos submetidos à PGO, observamos que a interação por 30 minutos de G15 (administração concomitante e posterior à PGO) atenuou a redução de viabilidade promovida pela PGO de 18,4%, para 7,4% (Figura 14A). Em culturas enriquecidas de neurônios, observamos redução de viabilidade celular em todos os grupos submetidos à PGO (Figura 14B).

Para avaliarmos o momento em que qualquer intervenção farmacológica pudesse ter algum efeito neuroprotetor sobre a viabilidade celular ante ao insulto isquêmico, adicionamos ao primeiro paradigma, os tratamentos farmacológicos também durante a PGO, perfazendo-se uma possível neuroproteção de 3 horas e 15 minutos. Em culturas mistas, a utilização do G15, antagonista do receptor GPER-1, *per se*, reduziu a viabilidade celular para 85,2% em relação ao grupo controle e, quando administrado na vigência da PGO, potencializou o efeito da PGO (69,2% comparado a 85,2%, PGO). Em contrapartida, a suplementação do meio com E2, G1 e a associação de G15+E2 concomitante e posterior à PGO, foi capaz de proteger as células contra o insulto isquêmico, gerando valores iguais aos do controle (98,1%, 99,0% e 99,6%, respectivamente), ressaltando a importância do tratamento durante a reperusão das células (Figura 15A). Em culturas enriquecidas de neurônios não foram observados nenhum efeito protetor dos tratamentos farmacológicos frente à PGO (Figura 15B).

Figura 14. Efeitos da administração do E2, G1 e G15 por 15 minutos seguido de 2 horas e 45 minutos de reperusão com meio fresco (paradigma 2), após 15 minutos de privação de glicose/oxigênio em culturas primárias derivadas de córtex frontal.

(A) culturas mistas e (B) culturas enriquecidas de neurônios. Os dados mostrados são expressos como percentagem do grupo controle (considerados como 100% de viabilidade celular) $\pm$ erro padrão da média, a partir de 4-5 experimentos independentes. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ em relação ao grupo pareado; & $p < 0,05$ em relação ao grupo PGO (ANOVA um critério, seguido de pós-teste Tukey).

Figura 15. Efeitos da administração do E2, G1 e G15 por 3 horas e 15 minutos (paradigma 3), durante e após 15 minutos de privação de glicose/oxigênio em culturas primárias derivadas de córtex frontal.

(A) culturas mistas e (B) culturas enriquecidas de neurônios. Os dados mostrados são expressos como percentagem do grupo controle (considerados como 100% de viabilidade celular) $\pm$ erro padrão da média, a partir de 4-6 experimentos independentes. ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle; ## $p < 0,01$ em relação ao grupo pareado; & $p < 0,05$ e && $p < 0,01$ em relação ao grupo PGO (ANOVA um critério, seguido de pós-teste Tukey).

Em nosso último paradigma testado, modificamos o segundo paradigma, acrescentando os tratamentos farmacológicos durante a PGO, além dos 15 minutos seguintes e iniciais da reperfusão, perfazendo-se 30 minutos de uma possível neuroproteção. Assim, em culturas mistas, a associação G15+E2 reverteu os efeitos promovidos pela PGO (97,4% contra 81,2%) (Figura 16A). Já em culturas enriquecidas, observamos redução significativa somente nos grupos submetidos à PGO (Figura 16B).

Figura 16. Efeitos da administração do E2, G1 e G15 por 30 minutos (paradigma 4), durante e após 15 minutos de privação de glicose/oxigênio em culturas primárias derivadas de córtex frontal.

(A) culturas mistas e (B) culturas enriquecidas de neurônios. Os dados mostrados são expressos como percentagem do grupo controle (considerados como 100% de viabilidade celular) $\pm$ erro padrão da média, a partir de 4-6 experimentos independentes. ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle; ## $p < 0,01$ em relação ao grupo pareado; & $p < 0,05$ em relação ao grupo PGO (ANOVA um critério, seguido de pós-teste Tukey).

4.4.3 Efeitos do 17β -estradiol e G1 em culturas de glioma de rato (linhagem C6) submetidas à privação de glicose/oxigênio

Diante dos resultados apresentados acima e da evidência mostrada nestes de que as células da glia exercem função importante no modelo de privação de glicose/oxigênio sob nossas condições experimentais, investigamos o papel dos astrócitos neste cenário, uma vez que, como descrito (Figura 4), nossas culturas mistas são compostas por aproximadamente 73% de astrócitos. Assim, utilizamos de culturas de células imortalizadas de glioma de rato, linhagem C6, cuja composição apresenta $\leq 99\%$ de reatividade positiva para GFAP (Figura 11).

Culturas de linhagem C6 foram expostas à PGO por 15, 30 e 60 minutos e reperfundidas por até 24 horas, conforme experimentos realizados para culturas primárias. Igualmente como observado para culturas primárias mistas, culturas de linhagem C6 apresentaram valores máximos de morte celular já durante o primeiro período de reperfusão testado (3 h), com morte celular em torno de 27,74%, 26,55% e 30,26% para 15, 30 e 60 minutos de PGO (Figura 17).

Figura 17. Efeito do curso temporal de morte celular em culturas de linhagem C6 submetidas à modelo de isquemia induzida por privação de glicose/oxigênio.

Neste modelo induzimos PGO de 15 a 60 minutos em culturas de glioma de rato (linhagem C6) compostas predominantemente de astrócitos. Os dados mostrados são expressos como porcentagem do grupo controle de lise total (considerados como 100% de morte celular) $\pm$ erro padrão da média, a partir de 5 experimentos independentes. *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (ANOVA dois critérios, seguido de pós-teste Bonferroni).

A partir destes experimentos, submetemos culturas de linhagem C6 ao paradigma 3 de PGO (15 minutos de PGO acrescido de E2 ou G1, seguido de 3h de reperfusão com os tratamentos farmacológicos) descritos na seção de métodos. A escolha deste foi devido à observação de neuroproteção mediada pelos tratamentos farmacológicos em culturas mistas frente ao insulto isquêmico. Contudo, contrariamente ao esperado, não observamos neuroproteção mediada por E2 ou G1 em culturas de linhagem C6 submetidas à PGO (Figura 18).

Figura 18. Efeitos da administração de E2 e G1 por 3 horas e 15 minutos (paradigma 3), durante e após 15 minutos de privação de glicose/oxigênio em culturas de glioma de rato (linhagem C6).

Os dados mostrados são expressos como percentagem do grupo controle (considerados como 100% de viabilidade celular) $\pm$ erro padrão da média, a partir de 5 experimentos independentes. *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle; ### $p < 0,001$ em relação ao grupo pareado (ANOVA um critério, seguido de pós-teste Tukey).

4.4.4 Efeitos da interação entre receptores de fatores de crescimento e a neuroproteção mediada por GPER-1 em culturas primárias mistas derivadas de córtex frontal

Na literatura, a sinalização via GPER-1 em alguns tecidos vem sendo descrita como associada a sinalização através do receptor de EGF. Neste aspecto, buscamos investigar se a neuroproteção observada em nosso modelo poderia ser devido ao *cross-talk* entre estas duas vias de sinalização para promover sobrevivência celular. Ainda, por se tratar de cultura primária de células derivadas de córtex frontal, investigamos se poderia estar ocorrendo interação da sinalização via GPER-1 com o receptor de NGF. Nestes experimentos, utilizamos apenas o paradigma 3 em virtude da observação de efeito neuroprotetor via GPER-1 em nosso modelo.

Assim, a inibição do receptor de EGF, *per se*, mostrou tendência de aumentar a viabilidade celular em culturas primárias mistas e a associação do inibidor com E2 ou G1, de fato, resultou em proliferação celular, o que podemos inferir que, nestas células e sob nossas condições experimentais, a sinalização via EGF funciona como freio para a proliferação celular mediada pela via estrogênica. Nossos resultados sugerem que o efeito neuroprotetor observado através da inibição do receptor de EGF pode ser interpretado como uma resposta de proliferação/sobrevivência celular associada ao estímulo deletério da PGO (Figura 19).

Figura 19. Efeitos da interação entre o receptor de EGF com a sinalização estrogênica no paradigma 3 de privação de glicose/oxigênio em culturas primárias mistas.

Os dados mostrados são expressos como percentagem do grupo controle (considerados como 100% de viabilidade celular) $\pm$ erro padrão da média, a partir de 5 experimentos independentes. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ em relação ao grupo pareado; & $p < 0,05$ e & $p < 0,01$ em relação ao grupo PGO (ANOVA um critério, seguido de pós-teste Tukey; AG1478 e AG: inibidor do receptor de EGF).

Por outro lado, a inibição dos receptores de NGF não protegeu as células contra os efeitos deletérios da PGO, mostrando que em células primárias derivadas de córtex frontal este receptor de tirosina quinase não interage com a sinalização estrogênica, e principalmente com o GPER-1, neste modelo de injúria isquêmica (Figura 20).

Figura 20. Efeitos da interação entre o receptor de NGF com a sinalização estrogênica no paradigma 3 de privação de glicose/oxigênio em culturas primárias mistas.

Os dados mostrados são expressos como percentagem do grupo controle (considerados como 100% de viabilidade celular) $\pm$ erro padrão da média, a partir de 5 experimentos independentes. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle; ## $p < 0,01$ em relação ao grupo pareado (ANOVA um critério, seguido de pós-teste Tukey; K252a e K: inibidor do receptor de NGF).

5 DISCUSSÃO

Diversos protocolos para obtenção de culturas primárias neuronais estão disponíveis na literatura científica, capazes de gerar diferentes padrões (fenótipos) em termos de composição de neurônios, células da glia e seus subtipos.

O protocolo desenvolvido e utilizado neste trabalho apresentou constituição de neurônios e gliócitos relativamente diferente da encontrada em outros estudos. Ahlemeyer e Baumgart-Vogt (134) usando protocolo para obtenção de cultura primária cortical de camundongo da linhagem C57Bl/6J obtiveram no 6º dia de cultura apenas 5% células imunorreativas para astrócitos e menos que 1% de células imunorreativas para oligodendrócitos utilizando meio de cultura neurobasal livre de soro suplementado apenas com B27. De maneira similar, Wang et al. (140) obtiveram > 95% de pureza para marcação positiva para neurônios em cultura no 9º a 10º dia *in vitro* cultivadas em DMEM/F12 suplementado com 15% de soro fetal bovino, 5% de soro de cavalo e adição no 3º dia de 1 μ M de citosina arabinosídeo, por 48 horas, em culturas primárias derivadas de córtex frontal de ratos neonatos da linhagem Sprague-Dawley. Por outro lado, Numakawa et al. (35) utilizando ratos com dois dias pós-natais obtiveram culturas com 80% de células positivas para MAP2 no 5º dia *in vitro* em culturas corticais mantidas em DMEM/F12 suplementado com 5% de soro de bezerro neonato pré-colostro e 5% de soro de cavalo. Este último, com dados semelhantes aos obtidos em nosso modelo experimental (Figura 4).

A despeito do que fora mencionado anteriormente e da heterogeneidade entre os resultados obtidos por outros autores, podemos afirmar que existe grande variabilidade entre protocolos e seus resultados, especialmente no que se refere ao dia *in vitro* em que as culturas são utilizadas, meio essencial utilizado para a proliferação celular (BME, BME suplementado, Neurobasal, DMEM, entre outros), ao inibidor de crescimento glial (Ara-C, B27), à densidade de plaqueamento de células, que, somadas, podem gerar as discrepâncias aqui apresentadas, mas que de nenhuma forma invalidam nosso modelo experimental.

Com isso, baseados na literatura acima e na morfologia das células em cultura, concluímos que o protocolo de cultura aqui descrito é capaz de gerar células viáveis. Ainda, para avaliar a participação dos neurônios na manifestação dos efeitos mediados pelo GPER-1, resolvemos seguir com os dois tipos de cultura, mista e enriquecida de neurônios que, ressaltando nosso modelo, compunham-se por 6,2% de neurônios, 22,65% de micróglia e 72,6% de astrócitos para culturas mistas e 75,47% de neurônio, 8,04% de micróglia e 15,77% de astrócitos para culturas enriquecidas de neurônios (Figura 4).

Neste trabalho mostramos que as células corticais em cultura expressam o receptor GPER-1 e, embora grande parte de sua expressão se localize na membrana das células, observamos também marcação nuclear para este receptor (Figura 7).

A localização deste receptor, classificado como um receptor de membrana, membro da superfamília dos receptores 7-TM (sete domínios transmembrana), vem sendo bastante discutida na literatura, uma vez que diferentes grupos de pesquisa já identificaram o GPER-1 em diversos compartimentos celulares em linhagens derivadas de carcinoma mamário humano, onde este receptor é amplamente estudado (15, 52, 141-144).

Recentemente, estudos clínicos tentam associar a presença ou ausência do GPER-1, além de sua localização subcelular com as propriedades do tumor e o prognóstico de sobrevivência de pacientes com câncer de mama que, embora ainda inconclusivos, sugerem que a expressão nuclear ou citoplasmática do GPER-1 possam refletir características biológicas diferentes do tumor, resistência ao tratamento com antagonistas de ER clássicos e de evolução da doença (143, 144).

Alguns grupos descreveram a localização do GPER-1 no núcleo de fibroblastos associados ao câncer (CAFs) derivados de carcinomas mamários humanos e mostraram que esta localização nuclear estava relacionada com a transcrição de genes de expressão imediata como *c-fos*, *ciclina D1* e *CTGF* (fator de crescimento de tecido conjuntivo), que estão diretamente envolvidos na proliferação e migração celular induzidas por E2 (141, 142), além de mostrar um *cross-talk* funcional entre o GPER-1 e o EGFR ativado na região promotora da ciclina D1, implicando em uma localização nuclear para ambos os receptores (141). A transcrição de genes de expressão imediata poderia justificar o aumento no metabolismo celular observado com o tratamento com G1, em concentrações elevadas (100 μ M) e após 24 horas de tratamento em nosso modelo experimental (Figura 8C e 8D).

Cheng et al. (54) avaliaram a distribuição subcelular do GPER-1 em diferentes tecidos e mostraram que, no epitélio normal e neoplásico de tecido ovariano e mamário e em neurônios hipotalâmicos, o GPER-1 concentra-se no espaço intracelular, enquanto que, no epitélio renal de ratos machos da linhagem Wistar, por exemplo, este receptor encontra-se na membrana plasmática. Além disso, os autores sugerem que exista um tráfego intracelular deste receptor, semelhante ao processo de endocitose que ocorre com os receptores β -adrenérgicos, porém no caso do GPER-1, ele pode ocorrer mesmo na ausência do seu ligante (G1 ou E2). Em outro trabalho, estes autores demonstraram dois padrões distintos de distribuição do GPER-1 no epitélio renal de camundongos machos, onde o GPER-1 estava primariamente localizado na superfície basolateral do epitélio cortical e expresso tanto intracelularmente quanto na membrana plasmática no epitélio medular renal (145). Além disso, os autores mostraram que a expressão e localização subcelular do receptor no tecido renal varia conforme o ciclo estral, com elevados níveis de expressão durante o proestro e estro, enquanto baixos níveis de

GPÉR-1 foram observados durante o metaestro ou diestro, sugerindo diferentes funções fisiológicas mediadas pela concentração circulante de E2 por este receptor no epitélio renal (145). Dessa maneira, as células que expressam o GPÉR-1 poderiam regular a atividade deste receptor por modular sua quantidade presente na membrana plasmática, fato este que pode explicar nossos achados com marcação para o GPÉR-1 observada na membrana plasmática e em trânsito para as regiões nuclear e perinuclear quanto tratadas com E2 ou G1.

Em células nervosas, Almey et al. (146) descreveram a topografia dos receptores de estrógeno no estriado de ratas adultas Sprague-Dawley e evidenciaram a presença do GPÉR-1 no sítios extranucleares tanto de neurônios quanto de células da glia, predominantemente nos axônios e pequenas vesículas sinápticas nos terminais axonais pré-sinápticos ou na membrana plasmática. No soma neuronal, o GPÉR-1 encontrava-se disperso no citoplasma, no aparato de Golgi e mitocôndria, e na membrana celular, também sendo observada a presença do receptor nas membranas dos dendritos e espinhas dendríticas, particularmente próximo a densidade pós-sináptica (146).

Diante do fato acima, em que, em nosso modelo, a distribuição do GPÉR-1 mostra-se citoplasmática e de membrana, corroborando a ideia proposta por Cheng et al. (54) acerca do tráfego intracelular e com os achados de Almey et al. (146) quanto a localização subcelular deste receptor, poucos estudos mostram cascatas de sinalização, no âmbito fisiológico, que confirmam mecanismos ativados pelo GPÉR-1. Assim, respostas fisiológicas ao estrógeno são iniciadas por receptores celulares que alteram sua conformação quando se ligam ao ligante, resultando em interação proteína-proteína e ativação das vias de sinalização celulares (147). Embora estas respostas sejam categorizadas ou como não-genômica rápida, ocorrendo dentro de minutos da estimulação celular, ou genômica, caracterizada por mudanças na transcrição de genes que ocorre dentro de horas, eventos de sinalização rápidos podem estimular vias que direta ou indiretamente modulam a expressão gênica (148, 149).

Neste contexto de sinalização celular, dados preliminares de nosso laboratório acerca da sinalização fisiológica do GPÉR-1 em culturas primárias derivadas de córtex frontal, apresentaram padrões de ativação diferentes das vias de sinalização celular MEK-ERK, p38-MAPK e AKT conforme a composição das culturas estudadas. Estes resultados sugerem também a existência de um *cross-talk* GPÉR-1/EGFR, onde a sinalização via EGF foi passo-limitante para o desencadeamento de alguns eventos fisiológicos do GPÉR-1, sugerindo que a sinalização através do EGFR possa atuar como “freio” das vias de sinalização mencionadas, uma vez que a utilização do inibidor dos receptores EGF potencializou a fosforilação tempo- e via-dependente do G1 (dados não mostrados).

Embora bastante estudada em várias linhagens tumorais, principalmente àquelas associadas ao câncer de mama, as vias de sinalização desencadeadas pelo GPÉR-1 no sistema nervoso central

ainda são pouco conhecidas. Nas linhagens, é bem estabelecido que a sinalização através do GPER-1 ocorre via transativação do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) e envolve receptor de tirosina quinase e proteínas da família Src (1, 44, 61, 150, 151). O GPER-1 também está envolvido na atividade transcricional por ativar mecanismos de sinalização que envolve AMP_c, ERK e PI-3K/AKT (152). Além disso, a ativação do GPER-1 por seu ligante pode aumentar níveis intracelulares de cálcio e ativar a via PI-3K/AKT. A ativação dessas diferentes cascatas intracelulares culminaria, então, na ativação de fatores de transcrição tais como AP-1 e CREB, regulando a expressão de vários genes e proteínas (68, 152).

O encéfalo é um dos órgãos mais importantes do corpo humano, correspondendo cerca de 2% do peso corporal, e sendo o responsável pelo consumo de até 25% de todo o oxigênio que o corpo necessita (108). Como já mencionado, as doenças cerebrovasculares, agrupadas dentro das causas circulatórias, são a segunda causa de morte no mundo (100, 101), sendo considerada também uma doença sexualmente dimórfica (153).

A evolução clássica do AVC envolve múltiplos mecanismos que vão desde a injúria de privação de oxigênio/glicose (hipóxia/hipoglicemia) até a inflamação que culmina com apoptose celular, resultando em danos neuronais (106). A existência de uma região de penumbra, área com redução branda ou moderada do fluxo sanguíneo, implica que estratégias terapêuticas são possíveis após o AVC, e que a necessidade de se selecionar o tipo apropriado e o tempo de intervenção são importantes para a fisiopatologia do AVC (154, 155). Lo (154) define uma “nova” região de penumbra sendo uma zona que engloba a transição entre a lesão e o reparo, importante para novos alvos terapêuticos, uma vez que a maioria dos alvos moleculares são bifásicos, atuando ou na fase aguda, diretamente na lesão, ou durante a fase de reparo, contribuindo para o remodelamento neurovascular.

Neste trabalho mostramos que, em nosso modelo experimental, *in vitro*, que mimetiza uma situação de isquemia/reperfusão, o padrão de morte celular observado foi dependente do tempo de privação e do tempo de reperfusão. Ainda, conforme demonstrado, culturas enriquecidas de neurônios foram mais sensíveis ($p < 0,001$, teste *t Student*) do que as culturas mistas neurônios/células da glia, sugerindo que as células da glia podem desempenhar alguma função neuroprotetora, com redução dos danos causados pela privação de glicose/oxigênio (PGO) em ambos os modelos (Figuras 12-16).

De fato, a literatura aponta que células da glia, principalmente os astrócitos, parecem ser mais resistentes que neurônios frente ao insulto isquêmico. Nesta vertente, Yu et al. (156) encontraram mudanças morfológicas em astrócitos em cultura somente após 2 horas de privação de glicose/oxigênio e, mais tardiamente, perda de integridade da membrana, a partir de 4 horas. Guo et al. (157) mostraram, em modelo de cultura de astrócitos, perda de viabilidade de 36,5% e marcação de 33% de células apoptóticas após 6 horas de PGO seguido de 24 horas de reperfusão. Takano et al.

(158) ressaltam a importância dos astrócitos frente ao insulto isquêmico, destacando que as injúrias desse processo são consequência da falência dos astrócitos em tamponar as necessidades metabólicas essenciais dos neurônios. Assim, culturas mistas, com maior porcentagem de células da glia, e predominância de astrócitos, parecem ser mais resistentes à isquemia que aquelas enriquecidas de neurônios, o que nos leva a pensar que em nosso modelo, o que observamos de morte celular em culturas mistas, provavelmente pode refletir morte neuronal.

Diversos padrões de morte celular frente à insultos isquêmicos já foram descritos na literatura. Por exemplo, Meloni et al. (159) utilizando modelo de cultura cortical primária de ratos embrionários Sprague-Dawley (E18-19), caracterizaram dois modelos *in vitro* de isquemia por privação de glicose/oxigênio que induziram padrões de morte celular aguda ou tardia. Este grupo observou que o padrão de morte celular estava diretamente ligado à duração do insulto e o curso temporal posterior ao insulto, e que os biomarcadores para as quatro vias de morte celular (necrose, apoptose, autofagia e necroptose) estavam presentes em ambos os modelos, embora o tempo de início e a proporção relativa de cada via de morte celular diferissem entre os modelos (159).

Lai e Todd (160), utilizando modelo de cultura neuronal de córtex de ratos embrionários Sprague-Dawley (E18), mostraram que diferentes grau de hipóxia seguidos por 24 horas de reperfusão geraram diferentes padrões de morte celular, onde 30 minutos de hipóxia (leve) gerou menos que 20% de morte celular, 2 horas de hipóxia (moderada) gerou 40-60% de morte celular e 6 horas de hipóxia (severa) gerou mais que 70% de morte celular. Se comparados a este estudo no que refere-se à morte celular, nossos resultados comportam-se como modelo de isquemia moderada, onde culturas mistas apresentaram 21,19%, 22,99% e 24,59% de morte celular para 15, 30 e 60 minutos de PGO seguida de 24 horas de reperfusão, enquanto que estes valores para culturas enriquecidas de neurônios foram de 36,54%, 39,22% e 35,86%, respectivamente (Figura 12). Neste trabalho, tanto os tempos de privação quanto de reperfusão foram escolhidos de modo a provocar a diminuição de viabilidade celular entre 20 e 30%, para que pudéssemos, assim, investigar as características neuroprotetores, uma vez que perdas acima de 30% poderiam comprometer nossos estudos.

Durante a isquemia cerebral, a morte neuronal varia com a severidade do insulto (131, 159), podendo, portanto, ocorrer durante uma ampla janela temporal e pode apresentar características de necrose, apoptose, autofagia e necroptose (161-166). É bem estabelecido que mulheres pré-menopausa estão mais protegidas que os homens frente ao insulto isquêmico, implicando o hormônio 17 β -estradiol como o principal mediador desta neuroproteção, além da sabida influência do E2 no rápido efeito vasodilatador na circulação sistêmica (76, 92, 153, 167, 168). Com a indicação do GPER-1 como sinalizador não-nuclear do estrógeno, neste trabalho estudamos o papel deste receptor como possível mediador desta neuroproteção.

Neste cenário de hipóxia/hipoglicemia, em recente revisão, Scott et al. (169) sugerem que exista um “período crítico” para os efeitos benéficos do estradiol no encéfalo e que esta neuroproteção pode ocorrer via mecanismos multimodais que envolvem (1) sinalização genômica, (2) sinalização não-genômica, (3) ações antioxidantes, e (4) regulação da bioenergética mitocondrial.

Vários trabalhos também evidenciam a sinalização rápida do estrógeno no encéfalo (1, 10, 20, 169-172) e alguns outros mostram a importância desta sinalização em modelo de isquemia (9, 123, 125, 157, 169, 173). Estudos *in vivo* mostraram que uma única injeção de E2 administrada intracerebroventricular imediatamente após o evento isquêmico reduz tanto a morte neuronal quanto os déficits cognitivos (9), e que o GPER-1 medeia resposta vasodilatadora na microvasculatura cerebral após isquemia (174). Assim, investigamos quais efeitos seriam observados se os tratamentos farmacológicos com E2, G1 (agonista GPER-1) e G15 (antagonista GPER-1) fossem administrados em diferentes momentos em nosso modelo experimental (Figura 3).

Nossos resultados mostraram que os efeitos neuroprotetores via sinalização estrogênica foram dependentes da composição celular de cada cultura. Além disso, nossos resultados apontam para a influência das células da glia como mediadores do papel neuroprotetor, via sinalização estrogênica não-nuclear, neste contexto de privação de glicose/oxigênio.

Está bem estabelecido que células da glia expressam receptores de estrógeno clássicos (ERs) (175) e sobre condições patológicas, esta expressão se encontra aumentada (176-179). Astrócitos apresentam mudanças morfológicas e funcionais em resposta ao E2 e participam da regulação hormonal na plasticidade sináptica e eventos neuroendócrinos (171). O E2 também pode diminuir a produção de quimiocinas por estas células, afetando, de maneira tardia, a função e recrutamento de células microgliais para regiões infartadas do sistema nervoso central (SNC) (180).

Por outro lado, evidências *in vitro* (75, 98, 181, 182) e *in vivo* (76, 183-185) demonstram que o principal papel do E2 na micróglia baseia-se em propriedades anti-inflamatórias. Em modelo de inflamação induzido por lipopolissacarídeo (LPS), a utilização de moduladores seletivos de receptores de estrógeno (SERMs) foi capaz de diminuir a ativação microglial tanto *in vitro* (186) quanto *in vivo* (187).

Ainda, Lepore et al. (188) demonstraram em cultura de astrócitos fetais de ovelha que nestas células, o insulto oxidativo induzido por 3-nitro-L-tirosina, aumenta a expressão da enzima aromatase e que este dano oxidativo pode induzir produção local de E2 pelos astrócitos reativos via a aromatização de testosterona. Além disso, o aumento da expressão de aromatase em áreas cerebrais lesionadas sugere que esta enzima esteja envolvida na reorganização do tecido nervoso através do aumento dos níveis de E2 local (171). Como a expressão de ERs está também aumentada em astrócitos reativos após lesões cerebrais (177), o E2 produzido por estas células pode agir como um fator autócrino,

diminuindo a liberação de moléculas pró-inflamatórias e induzindo a síntese de fatores tróficos que irão promover a sobrevivência neuronal.

Em virtude de nossos resultados, como a neuroproteção via GPER-1 foi observada apenas em culturas mistas, estudamos em linhagem de células C6 derivadas de glioma de rato, se, de fato, a neuroproteção observada seria mediada pelos astrócitos. Contrário ao relatado na literatura acerca da participação dos astrócitos, como descrito acima, nestas culturas nem o E2 e nem o G1 foram capazes de reverter ou mesmo atenuar os efeitos deletérios promovidos pela PGO neste modelo experimental (Figura 18). Pelo fato destes experimentos terem sido executados em células imortalizadas, hipotetizamos que os mecanismos de morte celular desencadeados pela PGO sejam minimamente diferentes.

De acordo com a literatura, modelos de isquemia em células C6 são direcionados para o estudo de mecanismos relacionados ao estresse oxidativo (189, 190). Como já mencionado, o E2 possui propriedades antioxidantes, porém, devido ao curto período de tratamento e a concentração utilizada em nossos experimentos, não foi possível observarmos efeitos neuroprotetores nestas culturas. Se por um lado, linhagens celulares garantem maior reprodutibilidade de resultados, por outro podem levar a resultados com pouca aplicabilidade, talvez por não apresentarem características naturais importantes para os processos de lesão e reparo celular observados em culturas primárias.

Na literatura pertinente, ainda é pouco estudado os mecanismos neuroprotetores do E2 via GPER-1 *in vitro*. Nossos resultados sugerem que os efeitos deletérios hipóxicos/hipoglicêmicos são mais acentuados quando o receptor GPER-1 é antagonizado antes do insulto isquêmico (Figura 15 e 16). Podemos, dessa forma, inferir que o GPER-1 esteja associado não com a melhora de quadros isquêmicos, mas sim, em aspectos relacionados à severidade dessas lesões. Esta nossa hipótese é reforçada pelo fato de que mulheres na menopausa ou em longos períodos de privação de estrógeno, como no caso da menopausa cirúrgica (castração), possuem risco aumentado de desenvolvimento de déficit cognitivo moderado (191-193) e derrame (111, 113, 194-197) em relação a homens. Isto se dá pelo fato de que os níveis circulantes de E2 estão diminuídos (1, 111-113, 198).

Os efeitos rápidos de sinalização do E2 estão relacionados com a regulação de vias de sinalização de quinases, sinalização mediada por cálcio e ativação/inativação de proteínas celulares chaves (4, 10, 169). Estudos feitos por Lebesgue et al. (9) mostraram que a administração aguda de E2 promoveu neuroproteção celular e comportamental após isquemia global e que a administração aguda de G1 em *slíces* hipocámpais de ratas ovariectomizadas aumentou a amplitude de correntes pós-sinápticas excitatórias similarmente ao observado em resposta ao E2. Os autores sugerem que se, neste modelo, a neuroproteção aguda pelo E2 envolve rápida ativação das vias MAPK e/ou PI3K/Akt, o GPER-1 pode desempenhar um papel crucial neste efeito.

Como mencionado anteriormente, a rápida ativação de vias de sinalização através do GPER-1 possuem efeitos benéficos não só na neuroproteção em modelo de isquemia, mas também na neuritogênese de neurônios hipocâmpais (199). Mecanismos de proliferação, diferenciação e migração celular envolvendo sinalização mediada por GPER-1 foram descritos em células de carcinoma mamário e este efeito foi associado ao *cross-talk* do GPER-1 ao receptor de EGF nestas células (141, 142, 200). Assim, fatores neurotróficos possuem vias de transdução de sinal similares que estão relacionados não somente a sobrevivência, mas também a manutenção dos neurônios, podendo estimular o crescimento axonal, a plasticidade sináptica, bem como a síntese e liberação de neurotransmissores (201). Neste caminho, fatores de crescimento como EGF e o IGF estimulam a proliferação de células precursoras neuronais na zona subventricular e promovem regeneração tecidual em modelo de isquemia tanto *in vivo* quando *in vitro* (155, 202).

Devido a todas estas evidências, investigamos em nosso modelo, se a neuroproteção mediada por E2 e G1 observada em culturas primárias mistas submetidas à PGO, seriam resultantes do *cross-talk* GPER-1/EGFR. Sob nossas condições experimentais, a inibição da sinalização via EGFR, *per se*, induziu aumento de metabolismo/viabilidade celular em nossas culturas. Quando associado ou ao E2 ou ao G1, este efeito foi ainda mais pronunciado (Figura 19). Neste contexto, por se tratar de células nervosas cujo potencial proliferativo é reduzido comparado a outras células, sugerimos que a sinalização via EGFR funcione como freio para as ações proliferativas mediadas pela via estrogênica e quando estas culturas são desafiadas, neste caso pela privação de glicose/oxigênio, a associação da inibição do receptor de EGF com os estímulos de E2 ou G1, desencadeiem processos de sobrevivência e proliferação, aumentando ainda mais o metabolismo celular.

Nossos resultados vão de encontro aos achados por Recchia et al (137). Estes autores mostraram que o fator induzível por hipóxia (HIF-1 α) ativa vias de sinalização que conduzem ao mecanismo adaptativo em células tumorais, além de suprarregular a expressão de GPER-1 bem como de CTGF, e este efeito foi bloqueado pela inibição do EGFR, sugerindo que a transativação de EGRF age como um mediador da sinalização induzida por hipóxia (137). Vale ressaltar, que nosso modelo de isquemia diverge bastante do modelo utilizado por estes autores.

Ainda são poucos os trabalhos que associam o NGF ao efeito deletério induzido por isquemia. Utilizando coelhos machos da linhagem New Zealand, Yang et al. (203) mostraram que o tratamento com NGF até 5 horas após oclusão da artéria cerebral média reduziu o volume de infarto, a apoptose em células neuronais e a expressão de caspase-3, além de suprerregular a expressão de Bcl-2. Comparado a nestes efeitos, a inibição da sinalização mediada pelo receptor de NGF não mostrou qualquer prejuízo, efeito esperado devido a neuroproteção observada por Yang et al. (2011),

nem tão pouca interação com a neuroproteção mediada pela sinalização estrogênica em nosso modelo experimental (Figura 20).

Estudos recentes mostram o papel do GPER-1 nos efeitos neuroprotetores mediados pelo E2 na neurotoxicidade induzida por glutamato em linhagem de células hipocâmpais (170). Neste trabalho, a exposição a concentrações relativamente elevadas de E2 (10 μ M) por 1 hora conduziram a neuroproteção neste modelo, ao passo que, 1 hora de exposição ao G1 (100 nM), agonista do receptor GPER-1, foi suficiente para atenuar os efeitos excitotóxicos induzidos por glutamato. Por outro lado, quando o G1 foi mantido por 24 horas, este efeito foi perdido (170). Liu et al. (36) mostraram que tanto o tratamento com E2 (1 nM) quanto o G1 (1 nM) por 15 minutos foram capazes de atenuar apoptose induzida por peróxido de hidrogênio em culturas primárias de neurônios corticais de camundongo, e que o uso de antagonista dos receptores clássicos de estrógeno, ICI 162 780, não bloqueou totalmente os efeitos neuroprotetores do E2 e não teve nenhum efeito sob a neuroproteção mediada por G1. Broughton et al. (123) mostraram que a distribuição e expressão de GPER-1 estava aumentada em cérebro de machos, enquanto que pouca ou nenhuma mudança foi observada em fêmeas intactas ou ovariectomizadas após um insulto isquêmico. Todos esses dados juntos evidenciam a importância da sinalização estrogênica rápida via GPER-1 e, uma corrente crescente na literatura destaca o GPER-1 como um alvo terapêutico importante após injúrias isquêmicas, especialmente em machos, onde a terapia estrogênica ainda não é factível.

Em suma, revelamos um efeito biológico funcional para o GPER-1 na neuroproteção mediada pela sinalização estrogênica e sua importância no processo de reperfusão, com consequente diminuição nos danos isquêmicos, uma vez que a ausência da sinalização via GPER-1 piorou o quadro de isquemia *in vitro*. Nossos resultados também mostraram que este efeito parece ser dependente de células da glia e sugerem que, em células neuronais, a sinalização EGFR funcione como “freio” para as ações proliferativas induzidas por estrógeno. Portanto, a participação do GPER-1 na neuroproteção mediada por estrógeno pode ter implicações práticas importantes, abrindo possibilidades para o desenvolvimento e uso de novos agonistas GPER-1 para elucidar mecanismos de proteção que atuem desde a lesão até o processo de reparo em injúrias isquêmicas.

6 CONCLUSÃO

- Em culturas primárias derivadas de córtex frontal de ratas neonatas da linhagem Wistar o GPER-1 encontra-se disperso por toda células, incluindo a membrana plasmática, regiões nuclear e perinuclear. A mesma localização e distribuição foi encontrada em células C6 derivadas de glioma de rato. Ainda, de acordo com nossos experimentos, este receptor apresenta trânsito celular da membrana para o núcleo conforme o tempo de exposição ao agonista, sendo a velocidade de tráfego dependente do tipo de estímulo, se com E2 ou G1.

- O GPER-1 participa da neuroproteção mediada pela sinalização estrogênica em modelo *in vitro* de morte celular induzida por privação de glicose/oxigênio. Este efeito parece ser dependente de células da glia em culturas primárias e a ausência desta sinalização, através do antagonismo do receptor, piorou o quadro de isquemia *in vitro*.

- Sob nossas condições experimentais, o *cross-talk* GPER-1/EGFR parece não estar envolvido na neuroproteção mediada pela via estrogênica, visto que a inibição *per se* do EGFR promoveu aumento do metabolismo celular, sugerindo que esta via tenha a função de “freio” para a sinalização estrogênica. Ainda, a inibição dos receptores de NGF não potencializou e/ou protegeu estas culturas dos efeitos deletérios da injúria isquêmica.

REFERÊNCIAS*

1. Prossnitz ER, Barton M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology*. 2011;7(12):715-26.
2. Pasqualini JR, Gelly C, Nguyen BL, Vella C. Importance of estrogen sulfates in breast cancer. *Journal of Steroid Biochemistry*. 1989;34(1-6):155-63.
3. McEwen BS, Alves SE. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocrine Reviews*. 1999;20(3):279-307.
4. Brann DW, Dhandapani K, Wakade C, Mahesh VB, Khan MM. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications. *Steroids*. 2007;72(5):381-405.
5. Nilsson S, Gustafsson JA. Estrogen receptors: therapies targeted to receptor subtypes. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2011;89(1):44-55.
6. Williams G. Aromatase up-regulation, insulin and raised intracellular oestrogens in men, induce adiposity, metabolic syndrome and prostate disease, via aberrant ER-alpha and GPER signalling. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2012;351(2):269-78.
7. Castoria G, Barone MV, Di Domenico M, Bilancio A, Ametrano D, Migliaccio A, et al. Non-transcriptional action of oestradiol and progestin triggers DNA synthesis. *The EMBO Journal*. 1999;18(9):2500-10.
8. 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. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(20):19704-10.
9. Lebesgue D, Chevalleyre V, Zukin RS, Etgen AM. Estradiol rescues neurons from global ischemia-induced cell death: multiple cellular pathways of neuroprotection. *Steroids*. 2009;74(7):555-61.
10. Raz L, Khan MM, Mahesh VB, Vadlamudi RK, Brann DW. Rapid estrogen signaling in the brain. *Neuro-Signals*. 2008;16(2-3):140-53.
11. Beyer C, Pawlak J, Karolczak M. Membrane receptors for oestrogen in the brain. *Journal of Neurochemistry*. 2003;87(3):545-50.
12. Fiocchetti M, Ascenzi P, Marino M. Neuroprotective effects of 17beta-estradiol rely on estrogen receptor membrane initiated signals. *Frontiers in Physiology*. 2012;3:73.
13. Kato S. Estrogen receptor-mediated cross-talk with growth factor signaling pathways. *Breast Cancer*. 2001;8(1):3-9.
14. Filardo EJ, Thomas P. GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*. 2005;16(8):362-7.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

15. Otto C, Rohde-Schulz B, Schwarz G, Fuchs I, Klewer M, Brittain D, et al. G protein-coupled receptor 30 localizes to the endoplasmic reticulum and is not activated by estradiol. *Endocrinology*. 2008;149(10):4846-56.
16. Shughrue PJ, Komm B, Merchenthaler I. The distribution of estrogen receptor-beta mRNA in the rat hypothalamus. *Steroids*. 1996;61(12):678-81.
17. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. 1997;138(3):863-70.
18. Kuiper GG, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Gustafsson JA. The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 1998;19(4):253-86.
19. Blaustein JD. The year in neuroendocrinology. *Molecular Endocrinology*. 2010;24(1):252-60.
20. Olde B, Leeb-Lundberg LM. GPR30/GPER1: searching for a role in estrogen physiology. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*. 2009;20(8):409-16.
21. Filardo EJ, Thomas P. Minireview: G protein-coupled estrogen receptor-1, GPER-1: its mechanism of action and role in female reproductive cancer, renal and vascular physiology. *Endocrinology*. 2012;153(7):2953-62.
22. Hammond R, Gibbs RB. GPR30 is positioned to mediate estrogen effects on basal forebrain cholinergic neurons and cognitive performance. *Brain Research*. 2011;1379:53-60.
23. Filardo EJ, Graeber CT, Quinn JA, Resnick MB, Giri D, DeLellis RA, et al. Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(21):6359-66.
24. Smith HO, Leslie KK, Singh M, Qualls CR, Revankar CM, Joste NE, et al. GPR30: a novel indicator of poor survival for endometrial carcinoma. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2007;196(4):386 e1-9; discussion e9-11.
25. Bartella V, De Marco P, Malaguamera R, Belfiore A, Maggiolini M. New advances on the functional cross-talk between insulin-like growth factor-I and estrogen signaling in cancer. *Cellular Signalling*. 2012;24(8):1515-21.
26. Maggiolini M, Picard D. The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor. *The Journal of Endocrinology*. 2010;204(2):105-14.
27. Green PS, Simpkins JW. Neuroprotective effects of estrogens: potential mechanisms of action. *International Journal of Developmental Neuroscience : The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 2000;18(4-5):347-58.
28. Clark S, Rainville J, Zhao X, Katzenellenbogen BS, Pfaff D, Vasudevan N. Estrogen receptor-mediated transcription involves the activation of multiple kinase pathways in neuroblastoma cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2014;139:45-53.

29. Tang H, Zhang Q, Yang L, Dong Y, Khan M, Yang F, et al. GPR30 mediates estrogen rapid signaling and neuroprotection. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2014;387(1-2):52-8.
30. O'Lone R, Frith MC, Karlsson EK, Hansen U. Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Molecular Endocrinology*. 2004;18(8):1859-75.
31. Pike CJ. Estrogen modulates neuronal Bcl-xL expression and beta-amyloid-induced apoptosis: relevance to Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*. 1999;72(4):1552-63.
32. Singer CA, Rogers KL, Dorsa DM. Modulation of Bcl-2 expression: a potential component of estrogen protection in NT2 neurons. *Neuroreport*. 1998;9(11):2565-8.
33. Behl C, Widmann M, Trapp T, Holsboer F. 17-beta estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1995;216(2):473-82.
34. Behl C, Skutella T, Lezoualc'h F, Post A, Widmann M, Newton CJ, et al. Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Molecular Pharmacology*. 1997;51(4):535-41.
35. Numakawa Y, Matsumoto T, Yokomaku D, Taguchi T, Niki E, Hatanaka H, et al. 17beta-estradiol protects cortical neurons against oxidative stress-induced cell death through reduction in the activity of mitogen-activated protein kinase and in the accumulation of intracellular calcium. *Endocrinology*. 2007;148(2):627-37.
36. Liu SB, Han J, Zhang N, Tian Z, Li XB, Zhao MG. Neuroprotective effects of oestrogen against oxidative toxicity through activation of G-protein-coupled receptor 30 receptor. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*. 2011;38(9):577-85.
37. McEwen BS. Invited review: Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. *Journal of Applied Physiology*. 2001;91(6):2785-801.
38. Amantea D, Russo R, Bagetta G, Corasaniti MT. From clinical evidence to molecular mechanisms underlying neuroprotection afforded by estrogens. *Pharmacological Research : The Official Journal of The Italian Pharmacological Society*. 2005;52(2):119-32.
39. DeNardo DG, Kim HT, Hilsenbeck S, Cuba V, Tsimelzon A, Brown PH. Global gene expression analysis of estrogen receptor transcription factor cross talk in breast cancer: identification of estrogen-induced/activator protein-1-dependent genes. *Molecular Endocrinology*. 2005;19(2):362-78.
40. Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiau AK, Uht RM, et al. Estrogen receptor pathways to AP-1. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2000;74(5):311-7.
41. Ray A, Prefontaine KE, Ray P. Down-modulation of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol in the absence of high affinity DNA binding by the estrogen receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(17):12940-6.
42. Safe S. Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions. *Vitamins and Hormones*. 2001;62:231-52.

43. Prossnitz ER, Barton M. Signaling, physiological functions and clinical relevance of the G protein-coupled estrogen receptor GPER. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 2009;89(3-4):89-97.
44. Prossnitz ER, Maggiolini M. Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2009;308(1-2):32-8.
45. Moggs JG, Orphanides G. Estrogen receptors: orchestrators of pleiotropic cellular responses. *EMBO Reports*. 2001;2(9):775-81.
46. Bjornstrom L, Sjoberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Molecular Endocrinology*. 2005;19(4):833-42.
47. Marino M, Ascenzi P. Membrane association of estrogen receptor alpha and beta influences 17beta-estradiol-mediated cancer cell proliferation. *Steroids*. 2008;73(9-10):853-8.
48. Wu Q, Chambliss K, Umetani M, Mineo C, Shaul PW. Non-nuclear estrogen receptor signaling in the endothelium. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(17):14737-43.
49. Carmeci C, Thompson DA, Ring HZ, Francke U, Weigel RJ. Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics*. 1997;45(3):607-17.
50. Prossnitz ER, Sklar LA, Oprea TI, Arterburn JB. GPR30: a novel therapeutic target in estrogen-related disease. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2008;29(3):116-23.
51. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*. 2005;307(5715):1625-30.
52. Langer G, Bader B, Meoli L, Isensee J, Delbeck M, Noppinger PR, et al. A critical review of fundamental controversies in the field of GPR30 research. *Steroids*. 2010;75(8-9):603-10.
53. Filardo E, Quinn J, Pang Y, Graeber C, Shaw S, Dong J, et al. Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. *Endocrinology*. 2007;148(7):3236-45.
54. Cheng SB, Graeber CT, Quinn JA, Filardo EJ. Retrograde transport of the transmembrane estrogen receptor, G-protein-coupled-receptor-30 (GPR30/GPER) from the plasma membrane towards the nucleus. *Steroids*. 2011;76(9):892-6.
55. Sanden C, Broselid S, Cornmark L, Andersson K, Daszkiewicz-Nilsson J, Martensson UE, et al. G protein-coupled estrogen receptor 1/G protein-coupled receptor 30 localizes in the plasma membrane and traffics intracellularly on cytokeratin intermediate filaments. *Molecular Pharmacology*. 2011;79(3):400-10.
56. Lopez GN, Turck CW, Schaufele F, Stallcup MR, 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(25):22177-82.

57. Zheng FF, Wu RC, Smith CL, 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(18):8273-84.
58. Vasudevan N, Pfaff DW. Membrane-initiated actions of estrogens in neuroendocrinology: emerging principles. *Endocrine Reviews*. 2007;28(1):1-19.
59. Foster TC. Interaction of rapid signal transduction cascades and gene expression in mediating estrogen effects on memory over the life span. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2005;26(2):51-64.
60. Moriarty K, Kim KH, Bender JR. Minireview: estrogen receptor-mediated rapid signaling. *Endocrinology*. 2006;147(12):5557-63.
61. 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. *Molecular Endocrinology*. 2000;14(10):1649-60.
62. Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, Oprea TI, Sklar LA, Hathaway HJ. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annual Review of Physiology*. 2008;70:165-90.
63. 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. *Molecular Endocrinology*. 2002;16(1):70-84.
64. 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(2):624-32.
65. Brailoiu E, Dun SL, Brailoiu GC, Mizuo K, Sklar LA, Oprea TI, et al. Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. *The Journal of Endocrinology*. 2007;193(2):311-21.
66. Luttrell LM. Reviews in molecular biology and biotechnology: transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Molecular Biotechnology*. 2008;39(3):239-64.
67. Albanito L, Sisci D, Aquila S, Brunelli E, Vivacqua A, Madeo A, et al. Epidermal growth factor induces G protein-coupled receptor 30 expression in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Endocrinology*. 2008;149(8):3799-808.
68. Maggiolini M, Vivacqua A, Fasanella G, Recchia AG, Sisci D, Pezzi V, et al. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(26):27008-16.
69. Teng J, Wang ZY, Jarrard DF, Bjorling DE. Roles of estrogen receptor alpha and beta in modulating urothelial cell proliferation. *Endocrine-related Cancer*. 2008;15(1):351-64.
70. Ariazi EA, Brailoiu E, Yerrum S, Shupp HA, Slifker MJ, Cunliffe HE, et al. The G protein-coupled receptor GPR30 inhibits proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Cancer Research*. 2010;70(3):1184-94.

71. Melcangi RC, Mensah-Nyagan AG. Neurosteroids: measurement and pathophysiologic relevance. *Neurochemistry International*. 2008;52(4-5):503-5.
72. Gillies GE, McArthur S. Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: a case for sex-specific medicines. *Pharmacological Reviews*. 2010;62(2):155-98.
73. Brinton RD, Chen S, Montoya M, Hsieh D, Minaya J. The estrogen replacement therapy of the Women's Health Initiative promotes the cellular mechanisms of memory and neuronal survival in neurons vulnerable to Alzheimer's disease. *Maturitas*. 2000;34 Suppl 2:S35-52.
74. Dluzen DE, McDermott JL. Gender differences in neurotoxicity of the nigrostriatal dopaminergic system: implications for Parkinson's disease. *The Journal of Gender-Specific Medicine : JGSM : The Official Journal of the Partnership for Women's Health at Columbia*. 2000;3(6):36-42.
75. Blasko E, Haskell CA, Leung S, Gualtieri G, Halks-Miller M, Mahmoudi M, et al. Beneficial role of the GPR30 agonist G-1 in an animal model of multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*. 2009;214(1-2):67-77.
76. Vegeto E, Benedusi V, Maggi A. Estrogen anti-inflammatory activity in brain: a therapeutic opportunity for menopause and neurodegenerative diseases. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2008;29(4):507-19.
77. Osterlund MK. Underlying mechanisms mediating the antidepressant effects of estrogens. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010;1800(10):1136-44.
78. Prange-Kiel J, Rune GM. Direct and indirect effects of estrogen on rat hippocampus. *Neuroscience*. 2006;138(3):765-72.
79. Gould E, Gross CG. Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 2002;22(3):619-23.
80. Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, Gould E. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 1999;19(14):5792-801.
81. Chowen JA, Torres-Aleman I, Garcia-Segura LM. Trophic effects of estradiol on fetal rat hypothalamic neurons. *Neuroendocrinology*. 1992;56(6):895-901.
82. Arimatsu Y, Hatanaka H. Estrogen treatment enhances survival of cultured fetal rat amygdala neurons in a defined medium. *Brain Research*. 1986;391(1):151-9.
83. Brinton RD, Tran J, Proffitt P, Montoya M. 17 beta-Estradiol enhances the outgrowth and survival of neocortical neurons in culture. *Neurochemical Research*. 1997;22(11):1339-51.
84. Parducz A, Hajszan T, Maclusky NJ, Hoyk Z, Csakvari E, Kurunczi A, et al. Synaptic remodeling induced by gonadal hormones: neuronal plasticity as a mediator of neuroendocrine and behavioral responses to steroids. *Neuroscience*. 2006;138(3):977-85.

85. Foy MR. 17beta-estradiol: effect on CA1 hippocampal synaptic plasticity. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2001;76(3):239-52.
86. McEwen BS. Invited review: Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. *Journal of Applied Physiology*. 2001;91(6):2785-801.
87. Harms C, Lautenschlager M, Bergk A, Katchanov J, Freyer D, Kapinya K, et al. Differential mechanisms of neuroprotection by 17 beta-estradiol in apoptotic versus necrotic neurodegeneration. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 2001;21(8):2600-9.
88. Kajta M, Trotter A, Lason W, Beyer C. Impact of 17beta-estradiol on cytokine-mediated apoptotic effects in primary hippocampal and neocortical cell cultures. *Brain Research*. 2006;1116(1):64-74.
89. Zhang Y, Zhou G, Wang H, Zhang X, Wei F, Cai Y, et al. Transcriptional upregulation of breast cancer resistance protein by 17beta-estradiol in ERalpha-positive MCF-7 breast cancer cells. *Oncology*. 2006;71(5-6):446-55.
90. Shughrue PJ. Estrogen attenuates the MPTP-induced loss of dopamine neurons from the mouse SNc despite a lack of estrogen receptors (ERalpha and ERbeta). *Experimental Neurology*. 2004;190(2):468-77.
91. Grandbois M, Morissette M, Callier S, Di Paolo T. Ovarian steroids and raloxifene prevent MPTP-induced dopamine depletion in mice. *Neuroreport*. 2000;11(2):343-6.
92. Arevalo MA, Santos-Galindo M, Bellini MJ, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. Actions of estrogens on glial cells: Implications for neuroprotection. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010;1800(10):1106-12.
93. Wang JY, Wen LL, Huang YN, Chen YT, Ku MC. Dual effects of antioxidants in neurodegeneration: direct neuroprotection against oxidative stress and indirect protection via suppression of glia-mediated inflammation. *Current Pharmaceutical Design*. 2006;12(27):3521-33.
94. Dhandapani KM, Brann DW. Role of astrocytes in estrogen-mediated neuroprotection. *Experimental Gerontology*. 2007;42(1-2):70-5.
95. Pawlak J, Brito V, Kuppers E, Beyer C. Regulation of glutamate transporter GLAST and GLT-1 expression in astrocytes by estrogen. *Brain Research Molecular Brain Research*. 2005;138(1):1-7.
96. Wilson ME, Dubal DB, Wise PM. Estradiol protects against injury-induced cell death in cortical explant cultures: a role for estrogen receptors. *Brain Research*. 2000;873(2):235-42.
97. Garcia-Segura LM, Wozniak A, Azcoitia I, Rodriguez JR, Hutchison RE, Hutchison JB. Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience*. 1999;89(2):567-78.
98. Bruce-Keller AJ, Keeling JL, Keller JN, Huang FF, Camondola S, Mattson MP. Antiinflammatory effects of estrogen on microglial activation. *Endocrinology*. 2000;141(10):3646-56.
99. Liao SL, Chen WY, Chen CJ. Estrogen attenuates tumor necrosis factor-alpha expression to provide ischemic neuroprotection in female rats. *Neuroscience Letters*. 2002;330(2):159-62.

100. Murray CJ, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 1997;349(9061):1269-76.
101. Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 1997;349(9064):1498-504.
102. Strong K, Mathers C, Bonita R. Preventing stroke: saving lives around the world. *Lancet Neurology*. 2007;6(2):182-7.
103. Lopez AD, Mathers CD. Measuring the global burden of disease and epidemiological transitions: 2002-2030. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 2006;100(5-6):481-99.
104. Gorelick PB, Ruland S. Cerebral vascular disease. *Disease-a-Month : DM*. 2010;56(2):39-100.
105. Andre C, Curioni CC, Braga da Cunha C, Veras R. Progressive decline in stroke mortality in Brazil from 1980 to 1982, 1990 to 1992, and 2000 to 2002. *Stroke; A Journal of Cerebral Circulation*. 2006;37(11):2784-9.
106. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in Neurosciences*. 1999;22(9):391-7.
107. Shichita T, Sakaguchi R, Suzuki M, Yoshimura A. Post-ischemic inflammation in the brain. *Frontiers in Immunology*. 2012;3:132.
108. Guo MF, Yu JZ, Ma CG. Mechanisms related to neuron injury and death in cerebral hypoxic ischaemia. *Folia Neuropathologica / Association of Polish Neuropathologists and Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences*. 2011;49(2):78-87.
109. Martin RL, Lloyd HG, Cowan AI. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends in Neurosciences*. 1994;17(6):251-7.
110. Srivastava AK, Kalita J, Dohare P, Ray M, Misra UK. Studies of free radical generation by neurons in a rat model of cerebral venous sinus thrombosis. *Neuroscience letters*. 2009;450(2):127-31.
111. Roquer J, Campello AR, Gomis M. Sex differences in first-ever acute stroke. *Stroke; A Journal of Cerebral Circulation*. 2003;34(7):1581-5.
112. Alkayed NJ, Harukuni I, Kimes AS, London ED, Traystman RJ, Hurn PD. Gender-linked brain injury in experimental stroke. *Stroke; A Journal of Cerebral Circulation*. 1998;29(1):159-65; discussion 66.
113. Park EM, Cho S, Frys KA, Glickstein SB, Zhou P, Anrather J, et al. Inducible nitric oxide synthase contributes to gender differences in ischemic brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2006;26(3):392-401.
114. Koellhoffer EC, McCullough LD. The effects of estrogen in ischemic stroke. *Translational Stroke Research*. 2013;4(4):390-401.

115. Schreihof DA, Ma Y. Estrogen receptors and ischemic neuroprotection: who, what, where, and when? *Brain Research*. 2013;1514:107-22.
116. de Carvalho JJ, Alves MB, Viana GA, Machado CB, dos Santos BF, Kanamura AH, et al. Stroke epidemiology, patterns of management, and outcomes in Fortaleza, Brazil: a hospital-based multicenter prospective study. *Stroke; A Journal of Cerebral Circulation*. 2011;42(12):3341-6.
117. Jover T, Tanaka H, Calderone A, Oguro K, Bennett MV, Etgen AM, et al. Estrogen protects against global ischemia-induced neuronal death and prevents activation of apoptotic signaling cascades in the hippocampal CA1. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 2002;22(6):2115-24.
118. Block F, Schwarz M. Correlation between hippocampal neuronal damage and spatial learning deficit due to global ischemia. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*. 1997;56(4):755-61.
119. Tanabe M, Watanabe T, Ishibashi M, Hirano N, Tabuchi S, Takigawa H. Hippocampal ischemia in a patient who experienced transient global amnesia after undergoing cerebral angiography. Case illustration. *Journal of Neurosurgery*. 1999;91(2):347.
120. Merchenthaler I, Delovade TL, Shughrue PJ. Neuroprotection by estrogen in animal models of global and focal ischemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003;1007:89-100.
121. Hu R, Sun H, Zhang Q, Chen J, Wu N, Meng H, et al. G-protein coupled estrogen receptor 1 mediated estrogenic neuroprotection against spinal cord injury. *Critical care medicine*. 2012;40(12):3230-7.
122. Day NL, Floyd CL, D'Alessandro TL, Hubbard WJ, Chaudry IH. 17beta-estradiol confers protection after traumatic brain injury in the rat and involves activation of G protein-coupled estrogen receptor 1. *Journal of Neurotrauma*. 2013;30(17):1531-41.
123. Broughton BR, Brait VH, Guida E, Lee S, Arumugam TV, Gardiner-Mann CV, et al. Stroke increases g protein-coupled estrogen receptor expression in the brain of male but not female mice. *Neuro-Signals*. 2013;21(3-4):229-39.
124. Broughton BR, Brait VH, Kim HA, Lee S, Chu HX, Gardiner-Mann CV, et al. Sex-dependent effects of G protein-coupled estrogen receptor activity on outcome after ischemic stroke. *Stroke; A Journal of Cerebral Circulation*. 2014;45(3):835-41.
125. Brann D, Raz L, Wang R, Vadlamudi R, Zhang Q. Oestrogen signalling and neuroprotection in cerebral ischaemia. *Journal of Neuroendocrinology*. 2012;24(1):34-47.
126. Gulinello M, Lebesgue D, Jover-Mengual T, Zukin RS, Etgen AM. Acute and chronic estradiol treatments reduce memory deficits induced by transient global ischemia in female rats. *Hormones and Behavior*. 2006;49(2):246-60.
127. Lebesgue D, Traub M, De Butte-Smith M, Chen C, Zukin RS, Kelly MJ, et al. Acute administration of non-classical estrogen receptor agonists attenuates ischemia-induced hippocampal neuron loss in middle-aged female rats. *PloS one*. 2010;5(1):e8642.

128. Gibson CL, Gray LJ, Murphy SP, Bath PM. Estrogens and experimental ischemic stroke: a systematic review. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2006;26(9):1103-13.
129. Yang SH, Liu R, Wu SS, Simpkins JW. The use of estrogens and related compounds in the treatment of damage from cerebral ischemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003;1007:101-7.
130. Heyer A, Hasselblatt M, von Ahsen N, Hafner H, Siren AL, Ehrenreich H. In vitro gender differences in neuronal survival on hypoxia and in 17beta-estradiol-mediated neuroprotection. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2005;25(4):427-30.
131. Dubal DB, Kashon ML, Pettigrew LC, Ren JM, Finklestein SP, Rau SW, et al. Estradiol protects against ischemic injury. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 1998;18(11):1253-8.
132. Plamondon H, Morin A, Charron C. Chronic 17beta-estradiol pretreatment and ischemia-induced hippocampal degeneration and memory impairments: a 6-month survival study. *Hormones and Behavior*. 2006;50(3):361-9.
133. Liu SB, Zhang N, Guo YY, Zhao R, Shi TY, Feng SF, et al. G-protein-coupled receptor 30 mediates rapid neuroprotective effects of estrogen via depression of NR2B-containing NMDA receptors. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 2012;32(14):4887-900.
134. Ahlemeyer B, Baumgart-Vogt E. Optimized protocols for the simultaneous preparation of primary neuronal cultures of the neocortex, hippocampus and cerebellum from individual newborn (P0.5) C57Bl/6J mice. *Journal of Neuroscience Methods*. 2005;149(2):110-20.
135. Piccioli P, Porcile C, Stanzione S, Bisaglia M, Bajetto A, Bonavia R, et al. Inhibition of nuclear factor-kappaB activation induces apoptosis in cerebellar granule cells. *Journal of Neuroscience Research*. 2001;66(6):1064-73.
136. Lin YH, Liu AH, Pan Y, Westenbroek C, Ter Horst GJ, Yu HM, et al. Reduction in the in vitro expression of Brain-Pancreas Relative Protein by oxygen and glucose-deprivation. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2007;295(1-2):199-204.
137. Recchia AG, De Francesco EM, Vivacqua A, Sisci D, Panno ML, Ando S, et al. The G protein-coupled receptor 30 is up-regulated by hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) in breast cancer cells and cardiomyocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(12):10773-82.
138. Koizumi S, Contreras ML, Matsuda Y, Hama T, Lazarovici P, Guroff G. K-252a: a specific inhibitor of the action of nerve growth factor on PC 12 cells. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 1988;8(2):715-21.
139. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983;65(1-2):55-63.

140. Wang Q, Gong Q, Wu Q, Shi J. Neuroprotective effects of Dendrobium alkaloids on rat cortical neurons injured by oxygen-glucose deprivation and reperfusion. *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*. 2010;17(2):108-15.
141. Madeo A, Maggiolini M. Nuclear alternate estrogen receptor GPR30 mediates 17beta-estradiol-induced gene expression and migration in breast cancer-associated fibroblasts. *Cancer Research*. 2010;70(14):6036-46.
142. Pupo M, Vivacqua A, Perrotta I, Pisano A, Aquila S, Abonante S, et al. The nuclear localization signal is required for nuclear GPER translocation and function in breast Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs). *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2013;376(1-2):23-32.
143. Samartzis EP, Noske A, Meisel A, Varga Z, Fink D, Imesch P. The G protein-coupled estrogen receptor (GPER) is expressed in two different subcellular localizations reflecting distinct tumor properties in breast cancer. *PloS One*. 2014;9(1):e83296.
144. Sjöström M, Hartman L, Grabau D, Fornander T, Malmström P, Nordenskjöld B, et al. Lack of G protein-coupled estrogen receptor (GPER) in the plasma membrane is associated with excellent long-term prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2014;145(1):61-71.
145. Cheng SB, Dong J, Pang Y, LaRocca J, Hixon M, Thomas P, et al. Anatomical location and redistribution of G protein-coupled estrogen receptor-1 during the estrus cycle in mouse kidney and specific binding to estrogens but not aldosterone. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2014;382(2):950-9.
146. Almey A, Filardo EJ, Milner TA, Brake WG. Estrogen receptors are found in glia and at extranuclear neuronal sites in the dorsal striatum of female rats: evidence for cholinergic but not dopaminergic colocalization. *Endocrinology*. 2012;153(11):5373-83.
147. Edwards DP. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annual Review of Physiology*. 2005;67:335-76.
148. Fu XD, Simoncini T. Extra-nuclear signaling of estrogen receptors. *IUBMB Life*. 2008;60(8):502-10.
149. Ma L, Pei G. Beta-arrestin signaling and regulation of transcription. *Journal of Cell Science*. 2007;120(Pt 2):213-8.
150. Ignatov A, Ignatov T, Roessner A, Costa SD, Kalinski T. Role of GPR30 in the mechanisms of tamoxifen resistance in breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2010;123(1):87-96.
151. Vivacqua A, Lappano R, De Marco P, Sisci D, Aquila S, De Amicis F, et al. G protein-coupled receptor 30 expression is up-regulated by EGF and TGF alpha in estrogen receptor alpha-positive cancer cells. *Molecular Endocrinology*. 2009;23(11):1815-26.
152. Meyer MR, Haas E, Prossnitz ER, Barton M. Non-genomic regulation of vascular cell function and growth by estrogen. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2009;308(1-2):9-16.

153. Persky RW, Turtzo LC, McCullough LD. Stroke in women: disparities and outcomes. *Current Cardiology Reports*. 2010;12(1):6-13.
154. Lo EH. A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nature Medicine*. 2008;14(5):497-500.
155. Pillai DR, Shanbhag NC, Dittmar MS, Bogdahn U, Schlachetzki F. Neurovascular protection by targeting early blood-brain barrier disruption with neurotrophic factors after ischemia-reperfusion in rats*. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of The International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2013;33(4):557-66.
156. Yu AC, Wong HK, Yung HW, Lau LT. Ischemia-induced apoptosis in primary cultures of astrocytes. *Glia*. 2001;35(2):121-30.
157. Guo J, Duckles SP, Weiss JH, Li X, Krause DN. 17beta-Estradiol prevents cell death and mitochondrial dysfunction by an estrogen receptor-dependent mechanism in astrocytes after oxygen-glucose deprivation/reperfusion. *Free Radical Biology & Medicine*. 2012;52(11-12):2151-60.
158. Takano T, Oberheim N, Cotrina ML, Nedergaard M. Astrocytes and ischemic injury. *Stroke; A Journal of Cerebral Circulation*. 2009;40(3 Suppl):S8-12.
159. Meloni BP, Meade AJ, Kitikomolsuk D, Knuckey NW. Characterisation of neuronal cell death in acute and delayed in vitro ischemia (oxygen-glucose deprivation) models. *Journal of Neuroscience Methods*. 2011;195(1):67-74.
160. Lai AY, Todd KG. Differential regulation of trophic and proinflammatory microglial effectors is dependent on severity of neuronal injury. *Glia*. 2008;56(3):259-70.
161. Carswell HV, Macrae IM, Gallagher L, Harrop E, Horsburgh KJ. Neuroprotection by a selective estrogen receptor beta agonist in a mouse model of global ischemia. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2004;287(4):H1501-4.
162. Dubal DB, Shughrue PJ, Wilson ME, Merchenthaler I, Wise PM. Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 1999;19(15):6385-93.
163. Miller NR, Jover T, Cohen HW, Zukin RS, Etgen AM. Estrogen can act via estrogen receptor alpha and beta to protect hippocampal neurons against global ischemia-induced cell death. *Endocrinology*. 2005;146(7):3070-9.
164. Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology*. 2005;1(2):112-9.
165. Rami A, Kogel D. Apoptosis meets autophagy-like cell death in the ischemic penumbra: Two sides of the same coin? *Autophagy*. 2008;4(4):422-6.
166. Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke; A Journal of Cerebral Circulation*. 2009;40(5):e331-9.

167. Kipp M, Berger K, Clarner T, Dang J, Beyer C. Sex steroids control neuroinflammatory processes in the brain: relevance for acute ischaemia and degenerative demyelination. *Journal of Neuroendocrinology*. 2012;24(1):62-70.
168. Garcia-Segura LM, Balthazart J. Steroids and neuroprotection: New advances. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2009;30(2):v-ix.
169. Scott E, Zhang QG, Wang R, Vadlamudi R, Brann D. Estrogen neuroprotection and the critical period hypothesis. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2012;33(1):85-104.
170. Gingerich S, Kim GL, Chalmers JA, Koletar MM, Wang X, Wang Y, et al. Estrogen receptor alpha and G-protein coupled receptor 30 mediate the neuroprotective effects of 17beta-estradiol in novel murine hippocampal cell models. *Neuroscience*. 2010;170(1):54-66.
171. Azcoitia I, Santos-Galindo M, Arevalo MA, Garcia-Segura LM. Role of astroglia in the neuroplastic and neuroprotective actions of estradiol. *The European Journal of Neuroscience*. 2010;32(12):1995-2002.
172. Ritzel RM, Capozzi LA, McCullough LD. Sex, stroke, and inflammation: the potential for estrogen-mediated immunoprotection in stroke. *Hormones and Behavior*. 2013;63(2):238-53.
173. Strom JO, Theodorsson A, Theodorsson E. Mechanisms of estrogens' dose-dependent neuroprotective and neurodamaging effects in experimental models of cerebral ischemia. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011;12(3):1533-62.
174. Murata T, Dietrich HH, Xiang C, Dacey RG, Jr. G protein-coupled estrogen receptor agonist improves cerebral microvascular function after hypoxia/reoxygenation injury in male and female rats. *Stroke; A Journal of Cerebral Circulation*. 2013;44(3):779-85.
175. Garcia-Ovejero D, Azcoitia I, DonCarlos LL, Melcangi RC, Garcia-Segura LM. Glia-neuron crosstalk in the neuroprotective mechanisms of sex steroid hormones. *Brain Research Reviews*. 2005;48(2):273-86.
176. Blurton-Jones M, Tuszynski MH. Reactive astrocytes express estrogen receptors in the injured primate brain. *The Journal of Comparative Neurology*. 2001;433(1):115-23.
177. Garcia-Ovejero D, Veiga S, Garcia-Segura LM, DonCarlos LL. Glial expression of estrogen and androgen receptors after rat brain injury. *The Journal of Comparative Neurology*. 2002;450(3):256-71.
178. Lu YP, Zeng M, Hu XY, Xu H, Swaab DF, Ravid R, et al. Estrogen receptor alpha-immunoreactive astrocytes are increased in the hippocampus in Alzheimer's disease. *Experimental Neurology*. 2003;183(2):482-8.
179. Carbonaro V, Caraci F, Giuffrida ML, Merlo S, Canonico PL, Drago F, et al. Enhanced expression of ERalpha in astrocytes modifies the response of cortical neurons to beta-amyloid toxicity. *Neurobiology of Disease*. 2009;33(3):415-21.
180. Dang J, Mitkari B, Kipp M, Beyer C. Gonadal steroids prevent cell damage and stimulate behavioral recovery after transient middle cerebral artery occlusion in male and female rats. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2011;25(4):715-26.

181. Baker AE, Brautigam VM, Watters JJ. Estrogen modulates microglial inflammatory mediator production via interactions with estrogen receptor beta. *Endocrinology*. 2004;145(11):5021-32.
182. Vegeto E, Bonincontro C, Pollio G, Sala A, Viappiani S, Nardi F, et al. Estrogen prevents the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in microglia. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 2001;21(6):1809-18.
183. Kipp M, Beyer C. Impact of sex steroids on neuroinflammatory processes and experimental multiple sclerosis. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2009;30(2):188-200.
184. Gilliver SC. Sex steroids as inflammatory regulators. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2010;120(2-3):105-15.
185. Barreto G, Veiga S, Azcoitia I, Garcia-Segura LM, Garcia-Ovejero D. Testosterone decreases reactive astroglia and reactive microglia after brain injury in male rats: role of its metabolites, oestradiol and dihydrotestosterone. *The European Journal of Neuroscience*. 2007;25(10):3039-46.
186. Suuronen T, Nuutinen T, Huuskonen J, Ojala J, Thornell A, Salminen A. Anti-inflammatory effect of selective estrogen receptor modulators (SERMs) in microglial cells. *Inflammation Research : Official Journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2005;54(5):194-203.
187. Tapia-Gonzalez S, Carrero P, Pernia O, Garcia-Segura LM, Diz-Chaves Y. Selective oestrogen receptor (ER) modulators reduce microglia reactivity in vivo after peripheral inflammation: potential role of microglial ERs. *The Journal of Endocrinology*. 2008;198(1):219-30.
188. Lepore G, Gadau S, Peruffo A, Mura A, Mura E, Floris A, et al. Aromatase expression in cultured fetal sheep astrocytes after nitrosative/oxidative damage. *Cell and Tissue Research*. 2011;344(3):407-13.
189. Shi H, Liu S, Miyake M, Liu KJ. Ebselen induced C6 glioma cell death in oxygen and glucose deprivation. *Chemical Research in Toxicology*. 2006;19(5):655-60.
190. Ringel F, Bieringer F, Baethmann A, Plesnila N. Effect of oxidative stress on glial cell volume. *Journal of Neurotrauma*. 2006;23(11):1693-704.
191. Daniel JM, Bohacek J. The critical period hypothesis of estrogen effects on cognition: Insights from basic research. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010;1800(10):1068-76.
192. Henderson VW, Sherwin BB. Surgical versus natural menopause: cognitive issues. *Menopause*. 2007;14(3 Pt 2):572-9.
193. Morrison JH, Brinton RD, Schmidt PJ, Gore AC. Estrogen, menopause, and the aging brain: how basic neuroscience can inform hormone therapy in women. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26(41):10332-48.
194. Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, Flegal K, et al. Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2009;119(3):e21-181.

195. Murphy SJ, McCullough LD, Smith JM. Stroke in the female: role of biological sex and estrogen. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*. 2004;45(2):147-59.
196. Niewada M, Kobayashi A, Sandercock PA, Kaminski B, Czlonkowska A, International Stroke Trial Collaborative G. Influence of gender on baseline features and clinical outcomes among 17,370 patients with confirmed ischaemic stroke in the international stroke trial. *Neuroepidemiology*. 2005;24(3):123-8.
197. Prencipe M, Ferretti C, Casini AR, Santini M, Giubilei F, Culasso F. Stroke, disability, and dementia: results of a population survey. *Stroke; A Journal of Cerebral Circulation*. 1997;28(3):531-6.
198. Kato I, Toniolo P, Akhmedkhanov A, Koenig KL, Shore R, Zeleniuch-Jacquotte A. Prospective study of factors influencing the onset of natural menopause. *Journal of Clinical Epidemiology*. 1998;51(12):1271-6.
199. Ruiz-Palmero I, Hernando M, Garcia-Segura LM, Arevalo MA. G protein-coupled estrogen receptor is required for the neuritogenic mechanism of 17beta-estradiol in developing hippocampal neurons. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2013;372(1-2):105-15.
200. Lappano R, De Marco P, De Francesco EM, Chimento A, Pezzi V, Maggiolini M. Cross-talk between GPER and growth factor signaling. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2013;137:50-6.
201. Hefti F. Pharmacology of neurotrophic factors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 1997;37:239-67.
202. Alagappan D, Ziegler AN, Chidambaram S, Min J, Wood TL, Levison SW. Insulin-Like Growth Factor Receptor Signaling is Necessary for Epidermal Growth Factor Mediated Proliferation of SVZ Neural Precursors in vitro Following Neonatal Hypoxia-Ischemia. *Frontiers in Neurology*. 2014;5:79.
203. Yang JP, Liu HJ, Yang H, Feng PY. Therapeutic time window for the neuroprotective effects of NGF when administered after focal cerebral ischemia. *Neurological Sciences : Official Journal of The Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*. 2011;32(3):433-41.