

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

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 atuam 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 reperfused 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.

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).

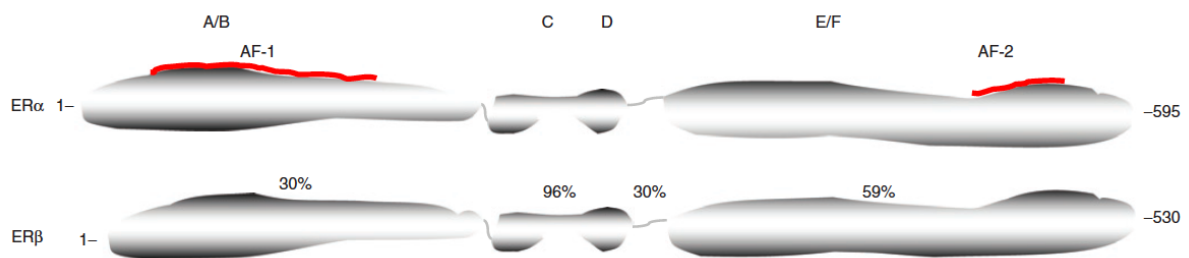
Classicamente, o E2 é considerado um hormônio reprodutivo, devido ao seu papel bem caracterizado na sinalização por retroalimentação (*feedback*) no eixo hipotálamo-hipofisário-ovariano (4), porém, além da sua função na reprodução, o E2 regula uma gama de efeitos nos tecidos corporais, incluindo o encéfalo, 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 correpressores) (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 ($ER\alpha$ e $ER\beta$) 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).

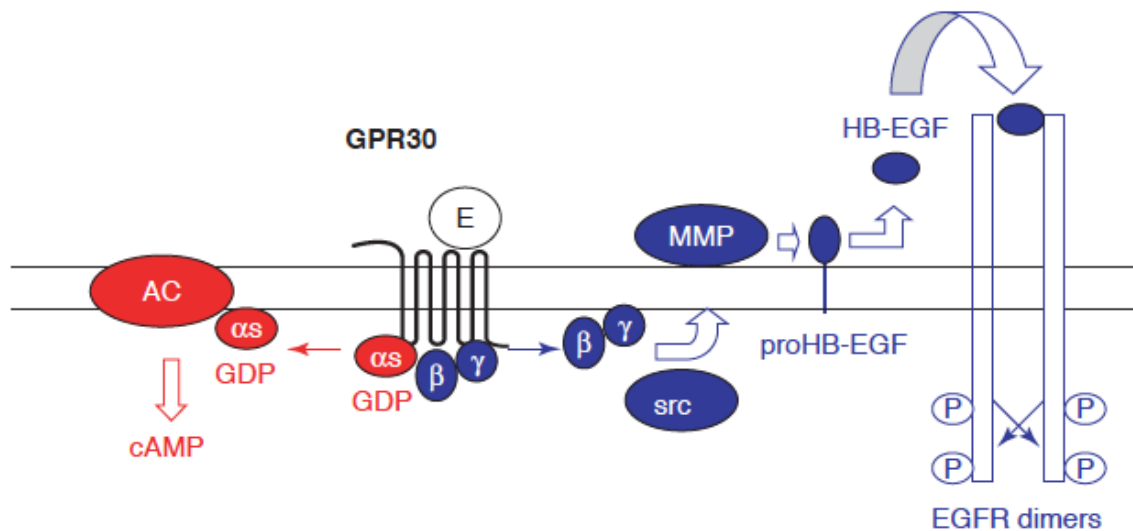
Apesar da controvérsia existente sobre sua localização celular, já que alguns autores sugerem que o GPER-1 esteja localizado no retículo endoplasmático e não na membrana celular (1, 15, 51, 52) e sem função como receptor de estrógeno (15, 52), enquanto outros sugerem que este receptor está localizado 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 α a partir do complexo G $\alpha\beta\gamma$. A atividade G α -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 dessensibilização, 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 α como o ER β 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 esteroideogênica, 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 hipocámpais 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 caínico 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 recaptção 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 182 780 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 β -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 reperfusão impediu as lesões induzidas pelo processo de reperfusão 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.

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, Malaguarnera 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, Kuppens 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, Dellovade 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. Sjostrom M, Hartman L, Grabau D, Fornander T, Malmstrom P, Nordenskjold 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. Degtarev 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.